

**Charakterisierung der kardialen Funktion von Calsequestrin Knock-Out Mäusen
im Kontext von Immunologie und Alterung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Konrad Bödicker
geboren am 08. Juni 1993 in Göttingen

Betreuer:

Prof. Dr. med. Joachim Neumann
Prof. Dr. med. Ulrich Hofmann

Gutachter*innen:

Prof. Dr. Daniel Sedding, Halle
Prof. Dr. Aida Salameh, Leipzig

Datum der Verteidigung: 02.11.2023

Referat

Die kardiale Isoform des Calsequestrins (CSQ2) ist das Haupt-Ca²⁺-bindende Protein in Säugetierherzen. Eine physiologische Calciumhomöostase ist unabdingbar für eine elektromechanisch unbeeinträchtigte Herzfunktion. Treten jedoch CSQ2-Deletionen bei Menschen auf, sind diese bereits in jungem Lebensalter gefährdet, catecholaminsensitive polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT) zu entwickeln, die mit dem Risiko eines plötzlichen Herztodes bei Absenz systolischer Herzinsuffizienz in Zusammenhang stehen. Die in dieser Dissertation präsentierten Resultate zur Charakterisierung von Calsequestrin Knock-Out Mäusen erweitern die Erkenntnisse über die Pathomechanismen von Kardiomyopathien. Besondere Bedeutung kam der Überprüfung der These zu, die altersabhängige Progression der Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell gehe mit Autoimmunphänomenen gegen myokardiales Gewebe einher.

Mithilfe des Western Blots wurde nachgewiesen, dass das Protein CSQ2 in den CSQ2^{-/-} (HOM) nicht, in den CSQ2^{+/-} (HET) verringert und vollständig in den CSQ2^{+/+} (WT) Mäusen der Altersgruppen Jung (2-10 Monate) und Alt (11-23 Monate) vorhanden war. Die CSQ2^{-/-} wurden mit CSQ2^{+/-} und CSQ2^{+/+} Geschwistertieren verglichen. Für diese Arbeit wurden in-vivo-Versuche durchgeführt mit Echo- und Elektrokardiographie vor und nach β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalininjektion. An isolierten spontan schlagenden rechten und elektrisch gereizten linken Vorhöfen wurden in-vitro-Hypoxieversuche vorgenommen. Außerdem erfolgten Messungen des Körper-, Herz-, Lungen-, Leber-, Milz- und Nierengewichtes. Folgende biochemische Untersuchungen wurden durchgeführt: Genotypisierung, Western Blot, Histologie sowie Experimente zur Erforschung inflammatorischer Phänomene mittels FACS-Analysen des Herzens, der herzdrainierenden mediastinalen sowie der subiliakalen Lymphknoten und der Milz, zudem mittels Immunfluoreszenz-Histologie auf IgM-, IgG-Antikörper und dsDNA-Färbung und schließlich mittels Panamá-Blot auf sekundäre IgM- und IgG-Antikörper gegen Black-six Maus-naives Herzextrakt.

Die alten CSQ2^{-/-} Mäuse beider Geschlechter wiesen ein erhöhtes absolutes Herzgewicht auf, welches mit Myokardfibrose, reduzierter Ejektionsfraktion, verminderter basaler Herzfrequenz sowie mit vergrößertem linksventrikulärem endsystolischem Durchmesser und reduzierter basaler VTI der Arteria pulmonalis einherging. Mittels Speckle Tracking Imaging konnten hingegen bereits bei jungen CSQ2^{-/-} Tieren Veränderungen der regionalen Wandbewegungen des linken Ventrikels detektiert werden, welche neben reduziertem Spitzenfluss in der Arteria pulmonalis existierten. Zusätzlich zeigte sich bei den Versuchen an isolierten Vorhöfen eine verminderte relative Kontraktionskraft der jungen CSQ2^{-/-} in der Hypoxiephase sowie eine reduzierte Schlagfrequenz nach Hypoxie in der Reoxygenierungsphase. Trotz der vielfältigen beschriebenen Defizite der CSQ2^{-/-} Tiere konnten weder bei den alten noch bei den jungen Mäusen Beweise für eine gesteigerte inflammatorische Aktivität geschweige denn für Autoimmunphänomene gefunden werden.

Die Resultate dieser Arbeit deuten somit darauf hin, dass die bei CSQ2-Defizienz entstehenden (kardialen) Aberrationen nicht durch inflammatorische und/oder Autoimmunphänomene gegen myokardiales Gewebe im Mausmodell und in Extrapolation in Menschen erklärt werden können. Folglich sind andere Mechanismen zu beleuchten.

Bödicker, Konrad: Charakterisierung der kardialen Funktion von Calsequestrin Knock-Out Mäusen im Kontext von Immunologie und Alterung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Calciumhomöostase im Herzen und CPVT	1
1.2	Kardiales Calsequestrin und weitere Calciumionenbindende Proteine	3
1.3	Hypoxie und Reoxygenierung	5
1.4	Immunreaktionen auf myokardiales Gewebe.....	6
1.5	Alterungsprozess	6
2	Zielstellung	8
3	Material und Methoden.....	9
3.1	Tiermodell	9
3.2	Herzfunktion in vivo.....	10
3.2.1	Narkotisierung und Präparation der Mäuse	10
3.2.2	Durchführung der Echokardiographie.....	12
3.3	Organentnahmen	12
3.4	Herzfunktion in vitro	13
3.4.1	Organbad.....	13
3.4.2	Messanlage für die Kontraktionsversuche	13
3.4.3	Vorhofpräparation	14
3.4.4	Durchführung der Kontraktionsversuche	15
3.5	Molekularbiologische Methoden	16
3.5.1	DNA Isolation	16
3.5.2	PCR	16
3.5.3	Agarosegelelektrophorese	16
3.6	Western-Blot	17
3.6.1	Homogenisation der Proben.....	17
3.6.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	17
3.6.3	Gelelektrophorese.....	17
3.6.4	Proteintransfer	18
3.6.5	Calsequestrin-Nachweis im Western-Blot	18
3.6.6	Färbungen.....	18

3.6.7	Stripping	19
3.7	Panamá-Blot	19
3.7.1	Proteinmessung	19
3.7.2	Western Blot (Tank-Blot)	19
3.7.3	Panamá	20
3.8	Durchflusszytometrie (FACS)	20
3.8.1	Organ-Präparation	20
3.8.2	FACS-Färbung	20
3.8.3	FACS-Analyse	21
3.9	Immunhistochemie	21
3.9.1	Immunfluoreszenz-Histologie	21
3.9.2	Histologie	22
3.10	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	23
4.1	CSQ2 Knock-Out	23
4.2	Gravimetrie	23
4.3	Herzfunktion in vivo	25
4.3.1	Echokardiographie – Pumpfunktion	25
4.3.2	Echokardiographie – Ventrikel-Durchmesser	29
4.3.3	Echokardiographie – regionale Wandbewegungen	30
4.3.4	Echokardiographie – Flüsse in Gefäßen	33
4.3.5	Elektrokardiographie – Arrhythmien	35
4.3.6	Elektrokardiographie – Herzfrequenz	35
4.3.7	Echokardiographie – Übersicht weiterer erhobener Parameter	37
4.4	Herzfunktion in vitro	39
4.4.1	Kontraktionskraft	40
4.4.2	Vorhof Schlagfrequenz	40
4.4.3	Weitere Parameter der Kontraktionsversuche	41
4.5	Durchflusszytometrie	42
4.6	Immunfluoreszenz-Histologie	44
4.7	Panamá-Blot	46
4.8	Histologie	47
5	Diskussion	48
5.1	Methodenkritik	48
5.1.1	Echokardiographie	48
5.1.2	Immunfluoreszenz	48
5.2	Diskussion des Tiermodells	49

5.2.1	Western Blot	49
5.3	CSQ2-defizientes Mausmodell	50
5.3.1	Interpretation der morphometrischen Daten	50
5.3.2	Interpretation der Histologie	51
5.3.3	Interpretation der Herzfunktion in vivo	51
5.3.4	Interpretation der Herzfunktion in vitro.....	54
5.3.5	Interpretation der Immunreaktionen auf myokardiales Gewebe.....	56
5.4	Altersabhängige Bedeutung von CSQ2.....	57
5.5	Anwendbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und Ausblick.....	60
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literaturverzeichnis	65
8	Thesen.....	74
	Anlagen	
	Erklärungen	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

β_1 -AR	Beta-1-Adrenozeptor
°C	Grad Celsius
A	Ampere
AC	Adenylylcyclase
Ah	Amperestunde
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
B-Mode	brightness modulation
bp	Basenpaar
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
BSA	bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAPS	N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonsäure
CASQ2	Calsequestrin 2
CBP	Calciumionenbindendes Protein
cm	Zentimeter
CPVT	Katecholaminsensitive polymorphe ventrikuläre Tachykardie
CSQ1	skelettales Calsequestrin, Calsequestrin 1
CSQ2	kardiales Calsequestrin, Calsequestrin 2
Ctr	Kontrolle
d	Tag
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECF	enhanced chemofluorescence (biochemische Färbemethode)
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FSC-A	forward scatter area
FSC-H	forward scatter height
g	Gramm
G	Gewichtskraft
G_s	stimulierendes G-Protein
H_2O_{Reinst}	Reinstwasser
H_2 -Rezeptor	Histamin ₂ -Rezeptor
HBSS	Hanks' Salzlösung
HET; +/-	Heterozygot
HOM; -/-	<i>Homozygot</i>
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
Ig M	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
Iso	Isoprenalin
JCN	Junctin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

L	Liter
LQTS	Long-QT-Syndrom
LTCC	L-Typ Calcium-Kanal
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
M	Männlich
mA	Milliampere
Med. Ln	Mediastinaler Lymphknoten
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
M-Mode	motion modulation
mN	Millinewton
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
n	Stichprobenumfang
NBT/BCIP-Färbung	Nitroblautetrazoliumchlorid/Brom-Chlor-Indoxylphosphat-Färbung
nm	Nanometer
P	Phosphorylierung
P2X ₄ R	purinerge Rezeptor P2X ₄
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2C β	Proteinphosphatase 2C β
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RYR2	Ryanodin-Rezeptor im junktionalen SR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Mittelwerte mit Standardfehler
SERCA	SR Calcium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC-A	side scatter area
STI	Speckle Tracking Imaging
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TRD	Triadin
V	Volt
VTI	velocity time integral (Fläche unter der Flußkurve)
W	Weiblich
WT;+/+	<i>Wildtyp</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herzzyklus und Signaltransduktion von β_1 -Adrenozeptoren.....	2
Abbildung 2: CSQ1 und CSQ2 im Western Blot von Skelettmuskulatur	5
Abbildung 3: Schema des konstitutiven CSQ2 Knock-Out Modells	9
Abbildung 4: PCR Banden nach Auftrennung mittels Elektrophorese.....	10
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Echokardiographie-Apparatur	11
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Apparatur für Kontraktionsmessungen	14
Abbildung 7: CSQ2 im Western Blot homogener Herzproben.....	23
Abbildung 8: Echokardiographie – Exemplarische M-Mode-Aufnahmen in der parasternalen langen Achse der Gruppe Alt	26
Abbildung 9: Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion	26
Abbildung 10: Ejektionsfraktion junger und alter Mäuse nach Isoprenalininjektion	27
Abbildung 11: Ejektionsfraktion - Weibliche Mäuse	28
Abbildung 12: Ejektionsfraktion - Männliche Mäuse	28
Abbildung 13: Echokardiographische Bestimmung des LVESD der Gruppe Alt	29
Abbildung 14: Echokardiographische Bestimmung des LVESD der Gruppe Jung.....	30
Abbildung 15: Echokardiographie – Exemplarische B-Mode-Aufnahmen in der parasternalen langen Achse	31
Abbildung 16: Speckle Tracking Imaging in der parasternalen langen Achse einer CSQ2-/- Maus.....	32
Abbildung 17: Pulswellen Doppler der Pulmonalarterie einer CSQ2-/- Maus.....	34
Abbildung 18: Echokardiographische Bestimmung des VTI der Pulmonalarterie	34
Abbildung 19: Elektrokardiographie - Exemplarische Rhythmusstreifen.....	35
Abbildung 20: Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz der Gruppe Alt	36
Abbildung 21: Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz der Gruppe Jung....	36
Abbildung 22: Repräsentative Kontraktionsversuche von CSQ2 +/- und CSQ2 -/-	39
Abbildung 23: Kontraktionskraft elektrisch stimulierter linker Vorhöfe.....	40
Abbildung 24: Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe.....	41
Abbildung 25: Gating auf T-Zellen.....	42
Abbildung 26: FACS Ergebnisse der mediastinalen Lymphknoten.....	43
Abbildung 27: FACS Ergebnisse der Herzen	44
Abbildung 28: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Herzpräparationen.....	45
Abbildung 29: Panamá-Blot auf IgM-Antikörper	46
Abbildung 30: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung von Herzpräparationen.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Körper- und Herzgewichte der experimentellen Kohorte.....	24
Tabelle 2: Gewicht der inneren Organe der experimentellen Kohorte	25
Tabelle 3: Speckle Tracking Imaging unter basalen Bedingungen	33
Tabelle 4: Echokardiographische Parameter	38
Tabelle 5: Ergebnisse aus den Kontraktionsversuchen.....	42
Tabelle 6: Immunfluoreszenz-Signale	45
Tabelle 7: Altersabhängige Entwicklung je CSQ2 Genotyp	60

1 Einleitung

Einleitend möchte ich mit einer Kasuistik beginnen; „Als ein 45 Jahre alter kaukasischer Mann im Freien spazierte, wurde er fälschlicherweise als krimineller Tatverdächtiger von Polizisten identifiziert, welche versuchten, ihn in Gewahrsam zu nehmen. Er leistete gewaltsam Widerstand gegen die Verhaftung. Bei der Festnahme wurde er zu Boden gebracht und mit Anwendung von Zwang in Bauchlage festgehalten. Sowohl Polizei als auch zivile Zeugen sagten aus, dass er seine Arme ausgestreckt und den Oberkörper ab vom Untergrund hatte, als er plötzlich kollabierte, zyanotisch wurde und nicht mehr reagierte. Es wurden Wiederbelebungsmaßnahmen eingeleitet. Da Rettungssanitäter eine Asystolie feststellten, wurde er in ein Krankenhaus transportiert, wo er anschließend für tot erklärt wurde“ (Rajagopalan et al. 2016). Mittels postmortaler molekularer Untersuchungen wurde eine heterozygote Mutation im Calsequestrin 2 (CASQ2)-Gen diagnostiziert. Folgerichtig sei als Todesursache kardiale Arrhythmie, die durch Anwendung von Zwangsmaßnahmen bei einem Mann mit catecholaminsensitiven polymorphen ventrikulären Tachykardien (CPVT) ausgelöst worden sei, festgestellt worden (Rajagopalan et al. 2016).

Wird eine Definition der CPVT herangezogen, könnte diese gleichsam als Zusammenfassung für den vorgestellten Fall dienen: Die CPVT ist eine menschliche Arrhythmie, die erstmals durchschnittlich bei 8-jährigen auftritt, jedoch auch bei Kleinkindern und Erwachsenen beobachtet wurde. Die seltene autosomal-rezessive Form der CPVT wird unter anderem durch verschiedene CASQ2-Mutationen verursacht (Postma et al. 2005, di Barletta et al. 2006, Priori et al. 2011, Kim et al. 2020). Diese CPVT treten bei Patienten mit Prädisposition nach verstärkter Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren aufgrund von physischem oder emotionalem Stress auf (Lahat et al. 2001, Priori et al. 2011, Kim et al. 2020).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zur Charakterisierung von Calsequestrin Knock-Out Mäusen sollen den Wissensstand über die Pathomechanismen und Effekte der CASQ2-Mutationen erweitern.

1.1 Calciumhomöostase im Herzen und CPVT

Im menschlichen Körper befinden sich ungefähr 1000-1500 g Calcium, wovon 98-99% als Hydroxylapatit im Knochen gebunden sind. Die Serumcalciumkonzentration wird reguliert durch Calcitriol, Parathormon und die Wirkung von Calciumionen (Ca^{2+}) selbst an deren Rezeptoren in den Nieren, im Knochen, im Verdauungstrakt und in den Nebenschilddrüsen (Wieliczko et al. 2013). Calcium hat vielfältige biologische Funktionen (Shaker et al. 2000, Wieliczko et al. 2013). So sind Calciumionen essentiell für die Herzfunktion und insbesondere für die korrekte Kopplung von elektrischer Erregung und Kontraktion unentbehrlich (Bers 2002) (Abb. 1).

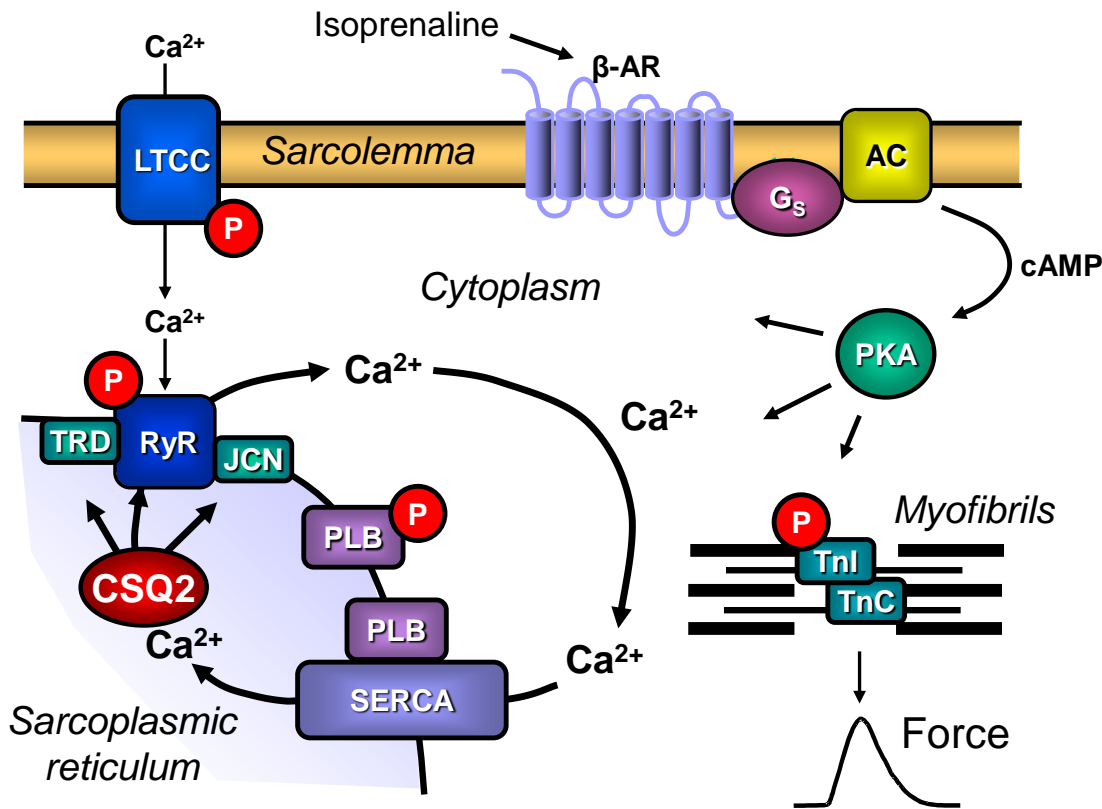


Abbildung 1: Herzzyklus und Signaltransduktion von β_1 -Adrenozeptoren

Indem sich die L-Typ Calcium-Kanäle (LTCC) in der Systole aufgrund einer Depolarisation der Zellmembran öffnen, kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom aus den T-Tubuli in das Zytoplasma der Kardiomyozyten. Der Anstieg der Calciumionenkonzentration im Zytoplasma führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) – die Calcium-induzierte Calciumfreisetzung durch den Ryanodin-Rezeptor im junctionalen SR (RyR2), der mit Triadin (TRD), Junctin (JCN) und Calsequestrin 2 (CSQ2) kommuniziert (Priori et al. 2011, Kornyejev et al. 2012). Dies führt zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma, welche zur Kontraktion der Herzmuskelzelle notwendig ist und somit durch Bindung an Troponin C (TnC) die Kraftentwicklung induziert. In der darauffolgenden Diastole werden die Ca^{2+} direkt zu Beginn aktiv durch die SR Calcium-ATPase (SERCA) ins freie SR transportiert und dort an CSQ2 gebunden, wodurch Ca^{2+} vom kontraktilem Apparat diffundieren. Sobald die Ca^{2+} eine ausreichende Konzentration am junctionalen SR erreichen, werden sie vom RyR2 freigesetzt und der dargestellte Zyklus beginnt von Neuem (Abb. 1). Wenn nun Isoprenalin an den β_1 -Adrenozeptor (β_1 -AR) bindet, wirkt das stimulierende G-Protein (G_s) auf die Adenylcyclase (AC) ein und führt somit zu deren Aktivierung. Die Adenylcyclase stellt aus Adenosintriphosphat (ATP) das zyklische Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) her, das darauf die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bewirkt. Die nun aktive PKA phosphoryliert Troponin I (TnI), Phospholamban (PLB), den Ryanodin-Rezeptor und den L-Typ Calcium Kanal (Wallukat 2002). Dephosphoryliertes PLB bindet an die SERCA und inaktiviert diese. Wird PLB nun phosphoryliert, führt dies zu dessen Inaktivierung. Entsprechend führt die induzierte Phosphorylierung (P) des PLB zur Steigerung der Aktivität der SERCA (Simmerman et al. 1998, Kranias et al. 2012). Konsequenzen dieser durch Isoprenalin ausgelösten Signalkaskade und insbesondere der Phosphorylierung des PLB sind eine verstärkte Freisetzung der Ca^{2+} sowie deren beschleunigter Rücktransport ins SR. Dies führt sowohl zu

einer stärkeren Kontraktion (positive Inotropie) als auch zu einer beschleunigten Relaxation (positive Lusitropie) (Sulakhe et al. 1995, Wallukat 2002, Ginsburg et al. 2004, Gergs 2019) (Abb. 1).

Bei Patienten mit catecholaminsensitiven polymorphen ventrikulären Tachykardien ist die Calciumhomöostase des dargestellten Herzzyklus gestört. Dabei ist die CPVT eine erbliche arrhythmogene Krankheit, die bei Patienten mit strukturell normalen Herzen auftritt. Physischer oder emotionaler Stress kann die lebensbedrohlichen Arrhythmien auslösen. Mutationen in den Genen des kardialen Ryanodinrezeptors (RyR2) und der kardialen Isoform des Calsequestrins (CSQ2) sind in den meisten Fällen ursächlich (Priori et al. 2011, Leenhardt et al. 2012, Kim et al. 2020). Zur Diagnosestellung der CPVT müssen Patienten durch adrenerge Stimulation induzierte polymorphe ventrikuläre Tachykardien, eine Abwesenheit struktureller Herzerkrankung und ein normales Elektrokardiogramm (EKG) aufweisen (Kim et al. 2020). Darüber hinaus ist die CPVT bezüglich des plötzlichen Herztodes gefährlicher als das Long QT-Syndrom und somit die am häufigsten tödlich verlaufende angeborene Ionenkanalerkrankung überhaupt. Wenn keine Therapie erfolgt, versterben bis zu 50% der Patienten vor dem Erreichen des 30. Lebensjahres, so dass auch asymptotische Mutationsträger eine β -Adrenozeptor-Blocker-Prophylaxe erhalten und auf Schulsport verzichten sollten (Kardiologie 2018). Neben β -Blockern werden Calciumantagonisten in der Therapie der CPVT eingesetzt. Sie reduzieren das Auftreten von Arrhythmien. Da dies jedoch oft nicht ausreichend ist, müssen invasive Maßnahmen wie Implantation eines Defibrillators, Ablation des Ganglion Stellatum bis hin zu Herztransplantation Anwendung finden. Vielversprechend ist zudem die additive Anwendung von Flecainid, da Flecainid einerseits den molekularen Defekt am RyR2 als Zielstruktur hat und damit die vorzeitige Calciumfreisetzung inhibiert und andererseits als Natriumkanalblocker die Rate an getriggerten Schlägen reduziert (Chopra et al. 2009, van der Werf et al. 2011, Baltogiannis et al. 2019). Chakravarty et al. (2019) entdeckten, dass Pyranonanaloga die Fähigkeit haben, CSQ2-Polymere zu stabilisieren. In diesem Zusammenhang entdeckten sie auch die potenzielle Bindungsstelle für diese Substanz im CSQ2. In der Stabilisierung der CSQ2-Polymere liegt die Chance, CPVT und andere Arrhythmien erfolgreich zu therapieren.

1.2 Kardiales Calsequestrin und weitere Calciumionenbindende Proteine

Bevor im Folgenden die kardiale Isoform des Calsequestrins genauer beleuchtet wird, erfolgt eine Übersicht über Calciumionenbindende Proteine (CBP) und die Einordnung des Calsequestrins. CBP werden eingeteilt in extrazelluläre und intrazelluläre CBP, die weiter strukturell eingeteilt werden in die CBP mit EF-Hand Domäne, wie bspw. Calmodulin und Calcineurin, bzw. ohne EF-Hand Domäne, wie bspw. Annexin und CBP in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Zu diesen CBP in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, welche zur Funktion des SR und des endoplasmatischen Retikulums (ER) als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher beitragen, gehören Calreticulin und Calsequestrin (Elies et al. 2020). Calreticulin ist hierbei das wichtigste CBP in der SR/ER abhängigen Ca^{2+} -Homöostase glatter Muskelzellen (Lu et al. 2015, Elies et al. 2020). Damit einhergehend werden viele verschiedene pathologische – unter anderem auch angeborene Arrhythmien – und physiologische Prozesse mit Calreticulin in Verbindung gebracht (Zamanian et al. 2013, Zamanian et al. 2016, Elies et al. 2020). Calsequestrin erfüllt mit hoher Kapazität und niedriger Affinität zu Ca^{2+} die Aufgabe der Speicherung und schnellen

Freisetzung von Ca^{2+} im SR von Skelett- und Herzmuskelzellen (Park et al. 2004, Novak et al. 2011, Elies et al. 2020). Calsequestrin fungiert außerdem als luminaler Sensor der Ca^{2+} -Konzentration; Veränderungen werden dem RyR1/2 durch Bindung am und Dissoziation vom RyR1/2 Kanalkomplex mit folgenden Strukturmodifikationen signalisiert (Gaburjakova et al. 2013). CSQ bildet zusammen mit RyR1/2, Junctin und Triadin einen tetrameren Komplex (Zhang et al. 1997). Dieser Komplex stellt die Ca^{2+} -Freisetzungseinheit der Myozyten dar (Jones et al. 1998, McFarland et al. 2010). Ist das Calsequestrin-Protein fehlerhaft oder fehlt es sogar gänzlich, führt dies zu gravierenden strukturellen Veränderungen im SR sowie zu veränderter Calciumionenspeicherung und -freisetzung des SR (Paolini et al. 2007, Elies et al. 2020). Es gibt 2 Isoformen des CSQ, nämlich das skelettale CSQ (CSQ1) und das kardiale CSQ (CSQ2). Das Verhältnis beider Isoformen ist vom jeweiligen Muskel abhängig. Generell ist in schnell zuckenden Muskelfasern ausschließlich und in langsam zuckenden Muskelfasern vorwiegend CSQ1 zu finden, während CSQ2 die exklusive Isoform in Kardiomyozyten darstellt und zudem im Ösophagus sowie zum geringen Teil in adulten slow-twitch Muskelfasern vertreten ist (Zarain-Herzberg et al. 1988, Damiani et al. 1990, Fischer et al. 2006, Paolini et al. 2007, Novak et al. 2011, Gergs et al. 2017a). Begründet ist die Verteilung unter anderem durch die unterschiedlichen Anforderungen der Muskelzellen: CSQ1 hat eine höhere Ca^{2+} -Bindungskapazität als CSQ2 und kann somit schneller große Mengen an Calciumionen aufnehmen, was in fast-twitch Muskelfasern erforderlich ist (Novak et al. 2011). Weitere Unterschiede zwischen den Isoformen bestehen in der Regulierung des jeweiligen Ryanodinrezeptors (Beard et al. 2009, Novak et al. 2011). Während Mutationen des CSQ1 mit skelettalen Myopathien assoziiert sind (Dulhunty et al. 2006), führen CSQ2-Mutationen bzw. -Deletionen zu schwerwiegenden Störungen der Herzfunktion wie zu CPVT (Knollmann et al. 2006), was anhand eines Fallberichts in dieser Arbeit verdeutlicht wurde (s. S.1). Dabei kommt es neben der abnormen Calciumhomöostase zu selektiver interstitieller Fibrose im atrialen Schrittmacherzentrum, welche ihren Anteil an der Entstehung der Herzrhythmusstörungen haben könnte (Glukhov et al. 2015). Zugleich sind die Herzen von Mäusen mit CSQ2-Überexpression bereits im Alter von 7 Wochen konzentrisch hypertrophiert – ab 13 Wochen kommt es zum Fortschreiten in Richtung dilatative Kardiomyopathie – und präsentieren Fibrosezeichen, die mit der Hochregulation von extrazellulären Matrixproteinen einhergehen (Ihara et al. 2002). Im Western Blot wurde der gelungene CSQ2 Knock-Out des hier genutzten Mausmodells nachgewiesen – ohne Beeinflussung der CSQ1-Expression (s. Abb. 2, 7). Während die Herzproben der CSQ2+/- ungefähr 80% der CSQ2-Menge der CSQ2+/+ präsentieren, ist CSQ2 in den Herzproben der CSQ2-/- nicht nachzuweisen (Knollmann et al. 2006, Gergs et al. 2017a).

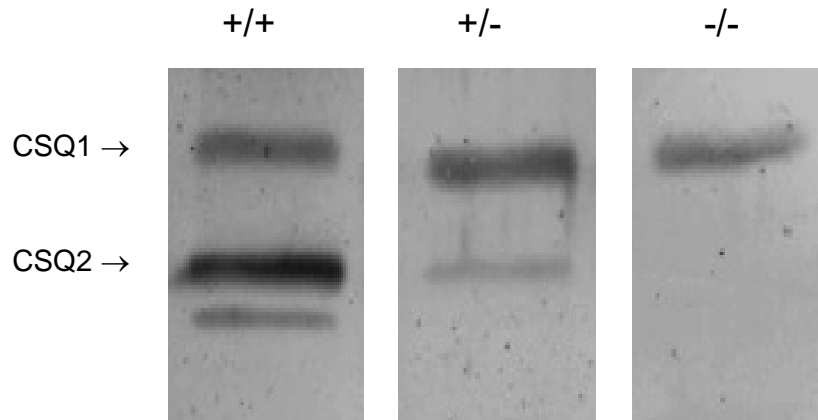


Abbildung 2: CSQ1 und CSQ2 im Western Blot von Skelettmuskulatur

In dem exemplarisch abgebildeten Western Blot homogener Skelettmuskulatur des *Musculus Gastrocnemius* sind beide CSQ-Isoformen zu finden. Die Expression des CSQ1 ist von dem CSQ2 Knock-Out unbeeinflusst, was den konstitutiven CSQ2 Knock-Out bestätigt. Es wurden jeweils Proteinmengen von 100µg je Spur und Genotyp aufgetragen und eine NBT/BCIP-Färbung durchgeführt (Gergs et al. 2017a).

1.3 Hypoxie und Reoxygenierung

Während Hypoxie im Allgemeinen eine Absenkung des Sauerstoffpartialdruckes in der Einatemluft ist (Konietzko et al. 1976), handelt es sich bei der Hypoxie in Kontraktionsversuchen an Herzvorhöfen um eine Gewebshypoxie des Herzvorhofs (Bolli 1991, Lammerich et al. 1996), die mit einem Verlust kontraktile Funktion einhergeht (Tyberg et al. 1970). Der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe fällt in der Hypoxiephase ab, was dazu führt, dass das zur Verfügung stehende Sauerstoffangebot nicht ausreicht, um die Funktion des Gewebes aufrecht zu erhalten (Thews 1969, Wei et al. 2022). Bei länger anhaltendem Mangel an Sauerstoffangebot und inadäquater Oxidation der Nährstoffe entstehen toxische Sauerstoffradikale, die zur Zerstörung hypoxischer Zellen beitragen (Koehler et al. 2018). In der anschließenden Reoxygenierung, dem Sauerstoffwiedereintritt, kann es zu massivem Enzymaustritt, strukturellen Veränderungen und Kontraktur kommen. Es sind Störungen auf verschiedenen Ebenen, wie metabolische, morphologische, elektrophysiologische und funktionelle Veränderungen beschrieben worden. Zur Schädigung des Myokards kommt es vorwiegend in den ersten Minuten der Reoxygenierung (Wagner 1998, Kamkin et al. 2000). Es kann sich dabei ein reversibler Defekt der Myokardfunktion, das „myocardial stunning“, wie auch eine Ausbreitung einer Gewebnekrose entwickeln (Wagner 1998, Luss et al. 2002). Eine schlechtere Hypoxietoleranz und eine geringere Erholung der Kontraktionskraft in der Reoxygenierung stehen mit reduzierten Kompensationsmechanismen transgener Präparate im Zusammenhang (Townsend 2015). Während die Herzvorhöfe von CSQ2^{-/-} Mäusen in Kontraktionsversuchen hinsichtlich der Kontraktionskraft, der Schlagfrequenz und der Effekte von Koffein sowie Isoprenalin analysiert worden sind (Gergs et al. 2017a), stellen Kontraktionsversuche mit Blick auf Hypoxie und Reoxygenierung – unserem Wissen zufolge – ein Novum in der Charakterisierung von CSQ2 dar.

1.4 Immunreaktionen auf myokardiales Gewebe

Wie Ramos et al. (2016) zusammenfassten, besteht in der Modulation der T-Zell-Aktivität möglicherweise eine therapeutische Strategie, um die Progression des Herzversagens verschiedener Ätiologie zu beeinflussen. Es sei weiterhin zu erarbeiten, inwieweit Lymphozyten das Herz in physiologischen und pathologischen Situationen beeinflussen. Im Anschluss daran zeigten Keppner et al. (2018), dass Antikörper zur Progression ischämischer Herzkrankheit beitragen. Darüber hinaus erforschten Rizzo et al. (2014) die inflammatorische Aktivität im Ganglion Stellatum von Patienten mit Long-QT-Syndrom (LQTS) und CPVT. Die Ganglia Stellata der LQTS/CPVT-Patienten präsentierten inflammatorische Infiltrate bestehend aus T-Zellen und Makrophagen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass T-Zellen vermittelte Zytotoxizität gegen Ganglienzellen über die Beeinflussung adrenerger Aktivität die elektrische Instabilität von LQTS/CPVT-Patienten verstärkte. Auch an den Herzen von Patienten mit chronischer Chagas-Kardiomyopathie wurden Läsionen dargestellt, die mit Immunphänomenen – durch Monozyten, Makrophagen sowie T-Zellen und zum geringeren Teil durch B-Zellen – in Zusammenhang gebracht wurden (Milei et al. 1992). Ebenso sind auch Immunphänomene durch Autoantikörper gegen CSQ1 erforscht worden. Autoantikörper gegen CSQ1 wurden schon früh im Rahmen endokriner Orbitopathie bei Morbus Basedow und zum geringeren Teil bei Hashimoto-Thyreoiditis detektiert (Gunji et al. 1999, Gopinath et al. 2006, Gopinath et al. 2007, Tani et al. 2007). Außerdem zeigten thyroideale CD8⁺-T-Zellen eine Immunantwort auf CSQ1, so dass auch thyroidalen CD8⁺-T-Zellen und dem Autoantigen CSQ1 eine Rolle in dem Komplex thyroidalen und orbitaler Autoimmunreaktionen der endokrinen Orbitopathie zugesprochen wird (Al-Ansari et al. 2018). Somit bleibt zu untersuchen, inwieweit sich im vorliegenden Mausmodell Autoimmunität gegenüber Herzgewebe nachweisen lässt. Vorteile der Erforschung von Immunreaktionen am Mausmodell gegenüber einer klinischen Studie an CSQ2-defizienten Patienten sind, dass die Immunreaktion beeinflussende Nebenerkrankungen inklusive Medikamenten und äußeren Umweltfaktoren nicht auftreten und dass Fallzahlen bei geringer Prävalenz der Erkrankung einfacher erreicht werden können (Kim et al. 2020).

1.5 Alterungsprozess

Altern ist die progressive Akkumulation von Veränderungen mit der Zeit, die assoziiert ist mit oder verantwortlich ist für die immer weiter wachsende Anfälligkeit für Krankheit und Tod, welche fortschreitendes Alter begleitet (Harman 1981, Gergs et al. 2019, Chung et al. 2021). Über den Alterungsprozess, insbesondere dessen Genese und Progression, gibt es verschiedene Theorien, die hier in ihren Grundzügen skizziert werden. Die Theorie freier Radikale besagt, dass die Summe schädlicher, ständig stattfindender Reaktionen freier Radikale maßgeblich den Alterungsprozess und damit auch altersbezogene Störungen beeinflusst (Harman 1956, Harman 1981). Demnach könnten Antioxidantien als Radikalfänger in der Ernährung sowohl die durchschnittliche Lebenserwartung erhöhen, die Krebsinzidenz senken und Immunantworten verbessern (Harman 1981). Oxidativer Stress kann auch die Telomerlänge mitbeeinflussen (von Zglinicki 2000, Chung et al. 2002, Muezzinler et al. 2013). Die Telomerlänge wird zudem selbst eng mit dem Altern in Verbindung gebracht, da sich die Telomere – genarme Regionen am Ende von Chromosomen bestehend aus Tandem-Repeats – bei jeder Zellteilung und somit mit fortschreitendem Alter eines Individuums verkürzen. Die

Telomerlänge gilt mithin sogar als biologische Uhr des Alterns (Muezzinler et al. 2013, Yuan et al. 2018). Geringere Telomerlänge korreliert positiv mit erhöhtem Auftreten von Erkrankungen des Alters und mit erhöhtem Mortalitätsrisiko (Haycock et al. 2014, Shay 2016, Yuan et al. 2018). Einhergehend mit dem Alterungsprozess sind auch Veränderungen in der Immunität, die sich einerseits ausdrücken in reduzierter Immunantwort und andererseits in einer größeren Häufigkeit an autoimmunen Ereignissen, an Neoplasien, an Atherosklerose, an neurodegenerativen Veränderungen, an Infektionen und an Impfversagen (Hasler et al. 2005, Muller et al. 2015). Das Altern des Immunsystems wird dabei als Immunseneszenz bezeichnet (Butenko 1985, Djukic et al. 2014). Die Veränderungen des Immunsystems mit dem Alter seien keine passiven Verluste der Funktion, sondern vielmehr bedingt durch aktive Suppression der Zellregulation im Rahmen eines ontogenetischen Programms (Butenko 1985). Infolgedessen führe eine Fehlregulation der pro- und anti-entzündlichen Netzwerke bei gleichzeitiger chronischer Exposition gegenüber einer Variation an Antigenen zu einer anhaltenden Aktivierung des Immunsystems – dem inflammaging (Franceschi 2007, Djukic et al. 2014). Neumann et al. (2016) verglichen mittels Echokardiographie die Ejektionsfraktion von 6 Monate alten mit 20-22 Monate alten Mäusen im CSQ2-defizienten Mausmodell und stellten eine Abnahme der Ejektionsfraktion bei den CSQ2-/- Mäusen in fortgeschrittenem Alter fest. Sie schlussfolgerten, dass die CSQ2-Deletion beim Alterungsprozess zu Herzversagen führt.

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das kardiale Calsequestrin im Rahmen eines murinen Knock-Out Modells zu charakterisieren, um diesbezüglich neue Erkenntnisse hinsichtlich altersabhängiger, morphologischer, biochemischer, funktioneller und immunologischer Parameter zu gewinnen. Folgende Fragestellungen stehen im Zentrum:

1. Welchen Einfluss hat kardiales Calsequestrin auf die Morphologie der transgenen Mäuse?
2. Welchen Effekt hat die CSQ2-Defizienz auf die echokardiographisch bestimmte Herzfunktion?
3. Wie beeinflusst die CSQ2-Defizienz die Herzvorhöfe unter physiologischen Bedingungen sowie in Phasen der Hypoxie und Reoxygenierung?
4. Verursachen Autoimmunphänomene die Abnahme der Herzleistung von CSQ2 Knock-Out Mäusen?
5. Welche Auswirkungen haben Alter und Geschlecht der CSQ2-/- Mäuse auf die erhobenen Parameter?

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurde ein Calsequestrin 2 Knock-Out Modell genutzt (Gergs et al. 2017). Der Calsequestrin 2 Knock-Out des eingesetzten Mausmodells ist konstitutiv. Durchgeführt wurde die CSQ2-Deletion mit Hilfe des loxP/Cre-Rekombinationssystems. Eingesetzt wurde eine Testes-spezifische Selbstexzisionstechnik, um die tACE-Cre/Neo^r-Kassette, die sich zwischen 2 loxP-Seiten befindet, während der Keimzellpassage zu entfernen (Bunting et al., 1999). Auf die tACE-Cre/Neo^r-Kassette wurde durch homologe Rekombination von CSQ2 auf Exon 1 in embryonalen Stammzellen von SV 129-Mäusen abgezielt und so das veränderte Allel entwickelt (Abb. 3).

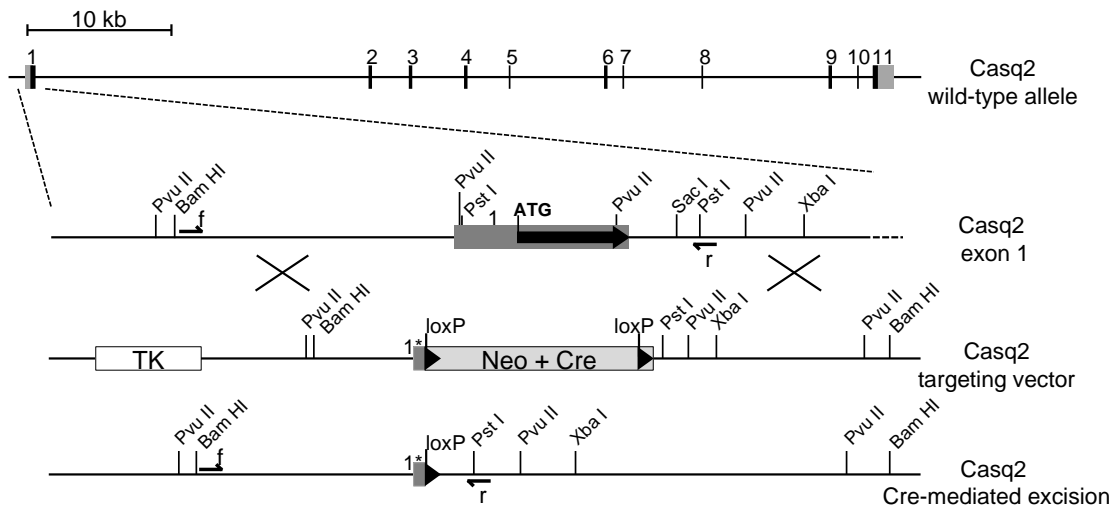


Abbildung 3: Schema des konstitutiven CSQ2 Knock-Out Modells

Targeting des Exon 1 des Maus CASQ2-Gens. Mithilfe des loxP/Cre-Rekombinationssystems wurde das verkürzte Exon 1 (1*) erzeugt. TK, Thymidinkinase; Neo, Neomycin Resistenz Gen; Cre, Cre Rekombinase Gen; f, Vorwärtsprimer; r, Rückwärtsprimer (Gergs et al. 2017a).

Nachdem die chimären Mäuse erzeugt waren, fand sich die Selbstexzision in allen der aus den embryonalen Stammzellen entwickelten Spermien, die ein verkürztes Exon 1 des CSQ2 ohne Start-Codon für die Translation hervorbrachten. Das embryonale Stammzell-Targeting, die Blastozysteninjektion und das Heranzüchten der chimären Tiere wurden von der Firma PolyGene (Ruemlang, Schweiz) vorgenommen. Die Chimären wurden in einen C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. Die homozygoten und heterozygoten Knock-Out Mäuse wurden durch PCR-Analysen der DNA aus Schwanzspitzen erkannt.

Folgende Primer wurden verwendet: Vorwärtsprimer 5'- AAATAGATCACCGGCTTCCC – 3' und Rückwärtsprimer 5' – GCCCTGCTCCCTGGATAAAG – 3'. Das aus der PCR hervorgegangene mutierte Allel war 0,93 kb groß und das Wildtyp-Allel 1,2 kb (Abb. 4).

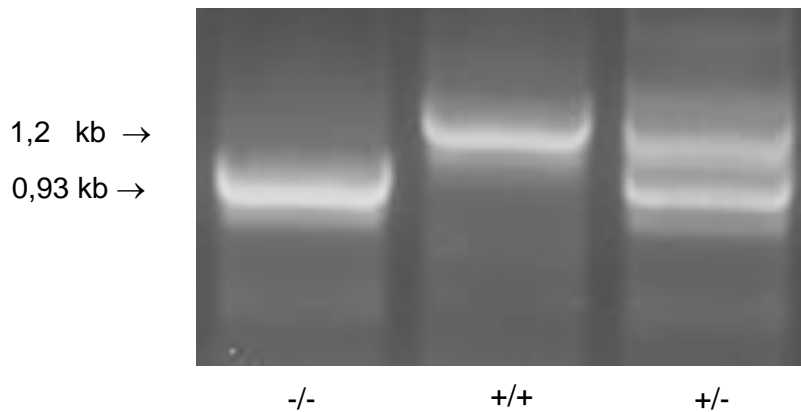


Abbildung 4: PCR Banden nach Auftrennung mittels Elektrophorese

Dargestellt sind die mittels Elektrophorese aufgetrennten Banden der verschiedenen CSQ2- Allele. Bei den CSQ2^{+/-} Mäusen waren erwartungsgemäß beide Allele zu sehen, so dass je eine Bande des Wildtyp-Allels mit 1,2 kb und eine des mutierten Allels mit 0,93 kb in der Elektrophorese imponierte. Die CSQ2^{-/-} zeigten nur das mutierte und die CSQ2^{+/+} ausschließlich das Wildtyp-Allel.

Die untersuchten Mäuse beider Geschlechter waren zwischen (68 und 298 Tage) 2 und 10 Monate sowie zwischen (317 und 688 Tage) 11 und 23 Monate alt. Ziel sämtlicher Versuchsreihen war, ein ausgeglichenes Verhältnis von weiblichen und männlichen Tieren sowie von den Wildtyp CSQ2^{+/+} (WT;+/+), heterozygoten CSQ2^{+/-} (HET; +/-) und homozygoten CSQ2^{-/-} (HOM; -/-) Genotypen in die Untersuchungen einzuschließen.

Die Mäuse wurden entsprechend der Leitlinie für Pflege und Gebrauch von Labortieren des US National Institutes of Health (NIH Publikation No. 85-23, korrigiert 1996) versorgt. Die für die Versuche verwendeten Mäuse hatten unbegrenzten Zugang zu handelsüblichem Labortierfutter und Wasser. Die Tiere wurden behandelt und gehalten entsprechend der Vorgaben der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Tierversuche waren genehmigt unter der Tierversuchsnummer 42502-2-1506 MLU.

3.2 Herzfunktion in vivo

3.2.1 Narkotisierung und Präparation der Mäuse

Zur Herbeiführung der Narkose mit anschließender Präparation der Mäuse wurde über einen Schlauch, der in den Deckel eines Becherglases hineinragte, Sauerstoff mit einem Fluss von circa 1,5 Litern pro Minute in das Becherglas eingeleitet (Gergs et al. 2018). Zusätzlich wurden 2 Volumenprozent Isofluran zur Narkoseeinleitung über diesen Schlauch hinzugegeben. Daraufhin wurden die Mäuse separat in das Becherglas getragen und das Becherglas mit dem Deckel verschlossen. Bis zur vollständigen Wirkung der Narkotisierung war eine Wartezeit von circa 2 Minuten anzusetzen. Währenddessen wurde erbsengroß Elektrodenkontaktgel auf die Kontaktstellen der

Platte gegeben. Anschließend wurde die narkotisierte Maus aus dem Becherglas genommen, mit der Rückseite auf die 40°C geheizte Platte gelegt, die Sonde zur Temperaturmessung in das Rektum eingeführt sowie die Maus an den Extremitäten mit je einem Kunstseidenpflaster auf den Kontaktstellen befestigt. Außerdem wurde der Kopf der Maus in eine erweiterte Schlauchöffnung vorgeschoben, durch die nun das Narkosegas strömte. Des Weiteren wurde das Fell am Thorax mit einem Rasierer gekürzt und zusätzlich mit Enthaarungscreme entfernt. Anschließend wurde die Konzentration des Narkosegases auf 1,5 Volumenprozent reduziert (Neumann et al. 2022) (Abb. 5).

Der Thorax wurde mit vorgewärmtem Ultraschallgel bedeckt.

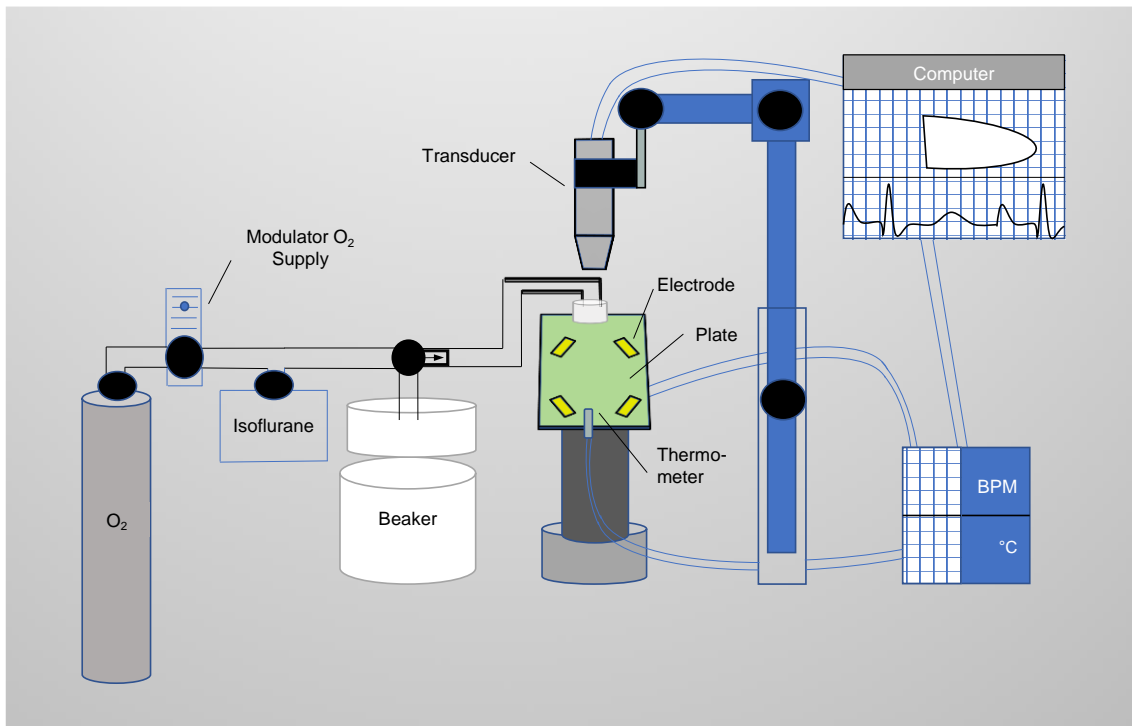


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Echokardiographie-Apparatur

Die Apparatur kann in 2 größere Einheiten gegliedert werden – die Anästhesie- und die Echokardiographieeinheit. Sauerstoff (aus einer Sauerstoffflasche) und Isofluran (aus einem Narkosegasverdampfer) werden entsprechend gewünschtem Fluss und Konzentration zur Einleitung der Narkose in das Becherglas und zur Aufrechterhaltung der Narkose am Kopfende der Platte in die erweiterte Schlauchöffnung geleitet, in welche der Kopf der Maus vorgeschoben wird. Zur Durchführung der Echokardiographie ist der Ultraschallkopf an einer Apparatur, welche viele Gelenke zu dessen genauer Einstellung hat, befestigt und mit dem Computer verbunden. Die zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur des Versuchstieres beheizbare Platte enthält Elektroden für die Elektrokardiographie. Mittels rektaler Sonde wird durchgängig die Körpertemperatur der Maus gemessen, welche neben der Herzfrequenz angezeigt wird. Fortlaufend wird am Computer über eine Verbindung zu den Elektroden – begleitend zu den Ultraschallmessungen – das EKG angezeigt.

3.2.2 Durchführung der Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde mit einem Vevo 2100 System (Visual Sonic, Toronto, Kanada), ausgestattet mit einem MS 550D Ultraschallkopf, durchgeführt (Kirchhof et al. 2003, Hoehn et al. 2015, Gergs et al. 2018). Während der Untersuchung wurden EKG samt Herzfrequenz aufgezeichnet und die Körpertemperatur überwacht. Bei entsprechenden Einstellungen wurden die lange Achse, die kurze Achse sowie die Flüsse durch die Pulmonalarterie, die Aorta descendens, die Mitralklappe, die Aorta ascendens und die Vena cava superior unter basalen Bedingungen gemessen. Dazu wurden jeweils 300 Bilder je Serie im B-Mode aufgenommen. Die B-Mode Aufzeichnungen des Herzens in der kurzen und langen Achse dienten im Weiteren zur Speckle Tracking Analyse und somit zur Analyse der Wandbewegungen sowie eventueller Wandbewegungsstörungen des Herzens (Notomi et al. 2005). Die Flüsse wurden mit Hilfe des Pulsed-Wave Doppler Mode untersucht. Die lange und die kurze Achse wurden darüber hinaus im M-Mode zur späteren Errechnung der Ejektionsfraktion und der Herzfrequenz betrachtet. In der kurzen Achse wurde eine Messung mittels Gewebedoppler zur Bestimmung der diastolischen Funktion des Herzens eingesetzt. Zur Untersuchung der Herzfunktion unter β -adrenerger Stimulation wurden 100 μ l 1 mM Isoprenalin verdünnt in isotoner Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht, anschließend 60 Sekunden bis zur maximal erwarteten Wirkung gewartet, um dann lange und kurze Achse erneut in denselben Einstellungen wie unter basalen Bedingungen zu messen. Zusätzlich wurden nach Stimulation die Flüsse durch die Pulmonalarterie, Aorta descendens und Aorta ascendens ermittelt (Dorner et al. 2021).

3.3 Organentnahmen

Nach Erfassen des Körpergewichtes wurden die Mäuse zur Organentnahme gewichtsadaptiert mit 200 μ l (=1000 IE) Heparin intraperitoneal antikoaguliert und mit 200 μ l Pentobarbital intraperitoneal betäubt (Gergs et al. 2010). Bei Ausbleiben einer Reaktion auf einen Schmerzreiz wurde nach Erfassen des Körpergewichtes mit der Präparation begonnen. Dazu wurden zunächst die Pfoten jeweils mit einer Nadel fixiert. Das Fell wurde etwa 1 cm unterhalb des Xiphoids und entlang der mittleren Linie zwischen Thorax und Rücken bis auf die Höhe der Trachea abgelöst. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet, um von dort aus über Entfernung des Zwerchfells zum Brustraum zu gelangen. Darauf wurde der Rippenbogen beidseits entlang der mittleren Linie zwischen Thorax und Rücken bis zum Ende der Trachea durchtrennt und hochgeklappt. Das noch pulsierende Herz wurde mit circa 1 cm der beginnenden Aorta abgespalten, in einer Tyrodelösung gespült und kanüliert, so dass es möglichst blutleer war. Auf diese Weise konnte das Herz anschließend entweder für die FACS-Versuche oder für die Kontraktionsversuche genutzt werden. Aus dem Thorax wurde möglichst viel Blut mit einer Spritze entnommen und in ein Eppendorf Tube gegeben. Die Lungen wurden gelöst. Für die spätere FACS-Analyse wurden nun die mediastinalen Lymphknoten entfernt und 15 Milliliter Cellstar[®] Tubes hinzugegeben, welche mit bovinem Serumalbumin gefüllt waren. Leber, Milz und Nieren wurden seziiert. Für die spätere FACS-Analyse wurde nun ebenso das Fell am Bauch gelöst und zur Seite

geklappt, so dass die subiliakalen Lymphknoten abgetrennt werden konnten. Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht, Lebergewicht und Nierengewicht wurden gemessen. Für die FACS-Analyse wurden nach dem Wiegen Herz und Milz in mit BSA gefüllte 15 ml Cellstar® Tubes gegeben.

Ungefähr 1 cm der Schwanzspitze wurde mit sterilem Skalpell abgeschnitten, in ein steriles Eppendorf Tube überführt und für eventuelle Nachtypisierungen eingefroren.

3.4 Herzfunktion in vitro

3.4.1 Organbad

Um ein Organbad vornehmen zu können, startete jeder Versuch mit der Produktion einer Tyrodelösung. Diese wurde aus verschiedenen Stammlösungen hergestellt: 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III. Diesem Gemisch wurde Reinstwasser hinzugegeben, bis das Gesamtvolumen von 1 Liter erreicht wurde (Meyer et al. 1988). Dem schloss sich eine Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) über 30 Minuten an. Darauf wurden 0,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 49,3 mg Ascorbinsäure, 19 mg Na₂EDTA sowie 1 g Glucose hinzugegeben (Endkonzentrationen siehe Anhang). Um den angestrebten physiologischen pH-Wert beizubehalten, wurde die Tyrodelösung konstant auf einer Temperatur von 37°C gehalten und durchgängig mit Carbogen begast. Die Tyrodelösung hatte im weiteren Verlauf die Funktion, ein physiologisches Milieu – bestehend aus Elektrolyten und Glukose – für die isolierten Vorhöfe darzustellen (Gergs 2019).

3.4.2 Messanlage für die Kontraktionsversuche

Die Messanlage für die Kontraktionsversuche bestand aus einem doppelwandigen Glasgefäß in Form eines Hohlzylinders (Bohm et al. 1988). In den inneren Teil des Glasgefäßes wurden 10 ml Tyrodelösung gegeben, während sich im äußeren Teil des Gefäßes ein Wasserbad befand, welches die Temperatur der Tyrodelösung auf 37°C hielt. Die Tyrodelösung wurde über eine angeschlossene Gasleitung am unteren Rand des Gefäßes mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) begast. Im inneren Gefäß befand sich neben dem Organbad das Organpräparat, welches zwischen 2 Reizelektroden am unteren Pol an einem Haken aufgehängt und am oberen Pol an einem längeren Metallhaken befestigt wurde, der mit einem Kraftsensor verbunden war. Der Kraftsensor wiederum war über einen Brückenverstärker mit dem PowerLab®-Datenerfassungssystem verbunden, so dass die Kraftentwicklung neben der Schlagfrequenz fortlaufend digital aufgezeichnet und dargestellt werden konnte. Um die Messanlage verlässlich für die Kontraktionsversuche nutzen zu können, musste noch zum Zwecke der Kalibrierung ein Nullpunkt für alle Kanäle definiert werden. Um die Empfindlichkeit der Kraftsensoren zu korrigieren, wurde ein 500 mg schwerer Drahring in die Apparatur eingehängt, welcher eine Kraft von 5 mN generierte. Im weiteren Verlauf konnte die Kontraktionskraft der Herzvorhöfe mit der Kalibrierung auf den Drahring in Korrelation gesetzt werden (Abb. 6) (Gergs et al. 2021b).

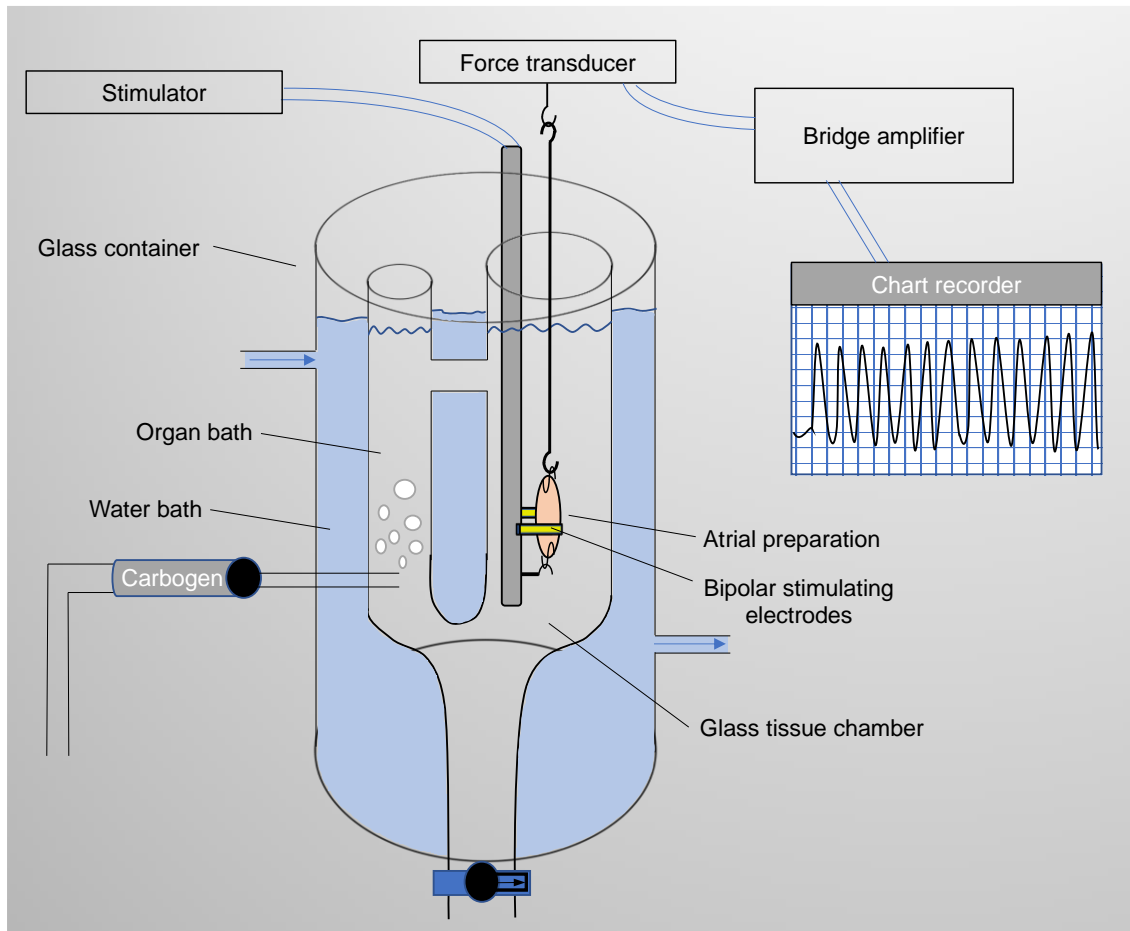


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Apparatur für Kontraktionsmessungen

Die Apparatur für Kontraktionsmessungen setzt sich im Wesentlichen aus 2 Einheiten zusammen: aus dem mit Wasserbad befüllten Glasgefäß und aus der darin befindlichen Glaskammer mit dem Gewebepräparat. Die innere Glaskammer ist mit Organbad befüllt und hat eine Gaszufuhr (hier Carbogen; 95% O₂ + 5% CO₂). Das Gewebepräparat befindet sich in der Präparataufhängung zwischen den Reizelektroden, welche mit dem Reizgerät verbunden sind. Zudem sind im Aufbauschema der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und das Datenerfassungssystem dargestellt.

3.4.3 Vorhofpräparation

Nachdem die pulsierenden Herzen entnommen worden waren, wurden sie zur Präparation unverzüglich in eine Präparierschale gegeben, die kontinuierlich mit Carbogen begast wurde und mit Tyrode befüllt war. Daraufhin wurde das Herz am Apex mit einer Nadel befestigt. Zunächst wurden die Vorhöfe von anhängenden Resten der herznahen Gefäße, der Lungen sowie weiterer Gewebereste freipräpariert und die Exzision des linken Atriums durchgeführt. Am unteren sowie am oberen Pol des Herzpräparates wurden mittels Durchstechung 2 kleine Metallhaken fixiert und das Herz an diesen Metallhaken in die Messanlage eingehängt (Neumann et al. 2021d). Bei der Präparation der rechten Herzvorhöfe war besonders darauf zu achten, die Häufigkeit des Auftretens von Arrhythmien zu verringern, indem besondere Sorgfalt darauf verwendet wurde, den Sinusknoten sowie die Zellen der Reizleitung nicht zu

beeinträchtigen. Daher wurden die 2 Metallhaken an den rechten Vorhofpräparaten senkrecht zur Einmündung der Vena cava superior an 2 zueinander diametral gelegenen Polen fixiert.

3.4.4 Durchführung der Kontraktionsversuche

Zur Durchführung der Kontraktionsversuche wurde in der Messapparatur eine adäquate Vorspannung des Herzpräparates auf circa 5 mN sichergestellt und sogleich damit begonnen, – unter regelmäßigem 3-maligen Wechsel der Tyrodelösung in den ersten 30 Minuten – die Kontraktionen aufzuzeichnen sowie die Herzfrequenz zu eruieren. Die Vorspannung wurde dabei im Verlauf gelegentlich angepasst – ein Nachspannen erfolgte maximal 3 Mal. So sollte eine stabile und bestmögliche Kraftentwicklung erreicht werden. Die aufgezeichnete Kraft zeigte nach einiger Zeit einen beständigen Wert – es stellte sich in der 30-minütigen Equilibrierungsphase ein Gleichgewicht ein. Die Abgabe der elektrischen Reize unterschied sich je nach verwendetem Vorhof. Die linken Atria wurden mittels eines elektrischen Rechteckimpulses – Spannung circa 10% über der Reizschwelle – über 5 ms mit der Frequenz von 1 Hz gereizt, um Kontraktionen hervorzurufen. Die Messung der Kraft war daher primäres Interesse bei der Untersuchung der linken Vorhöfe. Demgegenüber kam es bei den Präparaten der rechten Atria zu spontanen Kontraktionen, sofern die Reizleitungssysteme nicht beschädigt worden waren. Daher war die Messung der Eigenschlagfrequenz primäres Interesse bei der Untersuchung der rechten Vorhöfe. Aufmerksamkeit galt der Beurteilung potenzieller Arrhythmien. Traten Arrhythmien auf und sistierten diese nicht in der ersten halben Stunde, wurde ein Zusammenhang mit der Präparation als gegeben angesehen und der Versuch am betreffenden Präparat beendet. Als Ausgangszustand der Vorhöfe wurden für den weiteren Versuch die erhobenen Daten vom Ende der Equilibrierungsphase herangezogen.

Bei den Kontraktionsversuchen wurde eine einfache Hypoxie durchgeführt. Im Anschluss an eine 30-minütige Stabilisierungsphase wurde die Anreicherung des Organbads mit Carbogen beendet und stattdessen Stickstoff (95% N₂ + 5% CO₂) eingeleitet, um die Tyrode zu desoxygenieren. Damit sollte eine Gewebhypoxie simuliert werden, die 30 Minuten aufrechterhalten wurde, während der die Reaktion des Vorhofpräparates darauf untersucht wurde. An die halbstündige Hypoxie schloss sich eine kontinuierliche Begasung mit Carbogen über weitere 30 Minuten an – die Phase der Reoxygenierung. In der Reoxygenierungsphase wurde analysiert, inwieweit sich die Vorhofpräparate regenerieren konnten und inwieweit sich dabei Veränderungen in den gemessenen Parametern Kontraktionskraft, Schlagfrequenz und Auftreten von Arrhythmien zeigten (Dorner et al. 2021).

Nach Durchführung der Kontraktionsversuche wurden die Präparate aus der Apparatur gelöst und für nachfolgende molekularbiologische sowie biochemische Experimente eingefroren.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 DNA Isolation

Für die DNA Isolation wurden in das Eppendorf Tube 700 µl TE/SDS und 20 µl Proteinase K zu der Schwanzspitze hinzugegeben (Linck et al. 2000). Danach wurde über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Es folgte die Zugabe von 700 µl Phenol mit anschließendem Schütteln auf einem Rüttelmixer über 3 Minuten und Zentrifugation (3 min, 14.000/min, Raumtemperatur). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt. Es wurden 350 µl Phenol und 350 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Anschließend wurde mit einem Vortex gemischt (2 min) und dann zentrifugiert (2 min, 14.000/min). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles Eppendorf Tube überführt. 70 µl Natrium-Acetat (pH 6, Raumtemperatur) und 700 µl 100% Ethanol wurden hinzugegeben. Mit einem Vortex wurde erneut geschüttelt und zentrifugiert (10 min, 14.000/min), um die DNA zu pelletieren. Das Ethanol wurde dekantiert und möglichst vollständig entfernt, ehe 1 ml 70%iges Ethanol hinzugegeben und mit einem Vortex geschüttelt wurde, um das Pellet zu waschen. Darauf wurde wiederum zentrifugiert (10 min, 14.000/min). Hiernach wurden das Ethanol dekantiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Des Weiteren wurde das Pellet in 50 µl TE (pH8) gelöst und schließlich die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (Messung gegen TE pH8) (Bollmann et al. 2020).

3.5.2 PCR

Zuerst wurde die jeweilige Mischung für die Proben sowie für die Negativ- und Positivkontrolle hergestellt (Gergs et al. 2017a). Dafür wurden in jedes Röhrchen jeweils 8 µl destilliertes Wasser, 10 µl 2x PCR Super Master Mix, 0,5 µl Vorwärts- sowie 0,5 µl Rückwärtsprimer gegeben und die Lösung geschüttelt. In die kleinen Reagiergefäße wurden daraufhin jeweils 19 µl 2x PCR Super Master Mix und 1 µl des Template gegeben. Die Tubes wurden in den Cyclor gegeben und das eingestellte Programm (PCR Programm siehe Anhang) gestartet (Neumann et al. 2021c).

3.5.3 Agarosegelelektrophorese

1%iges Agarosegel wurde hergestellt. Dazu wurden 1 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer gegeben, dieses Gemisch bis zur Siedetemperatur erhitzt, 10 µl RedSafe™ der Gelkammer hinzugefügt (Kämme je nach Probenanzahl), dies mindestens 20 Minuten polymerisieren gelassen und die Kämme wiederum entfernt.

15 µl des PCR-Produktes wurden in die Vertiefungen pipettiert sowie 8 µl DNA-Leiter (1 kb, 100 bp) als Kontrolle des Laufs in die erste Vertiefung gegeben, ein Strom von 100 mA angeschlossen und der Lauf beendet, sobald die Banden der DNA-Leiter gut getrennt waren, und schließlich Fotos vom Ergebnis angefertigt (Neumann et al. 2021c).

3.6 Western-Blot

3.6.1 Homogenisation der Proben

Für die Homogenisation wurden die bei -80°C gelagerten Proben mithilfe eines Mikrodismembrators aufgearbeitet (Gombosova et al. 1998). Dazu wurden die Proben auf flüssigen Stickstoff gegeben. Circa 50 bis 100 mg des Gewebes wurden mit 100 μl Reaktionsgemisch – einem NaHCO_3 -Puffer – eine Minute lang im Mikrodismembrator bei 2.000-2.700 rpm pulverisiert. Dem nun in Eppendorfgefäße überführten Pulver wurden 100 μl Homogenisationspuffer hinzugegeben, diese Eppendorfgefäße auf Eis gelagert und anschließend auf einem Vortex gemischt. Mittels Ultraschalls über 3-mal 15 Sekunden erfolgte die Homogenisierung. Darauf inkubierte die Probe 30 Minuten bei Raumtemperatur, woran sich die Zentrifugation über 30 Minuten bei 14.000 rpm anschloss und schließlich der Überstand abgenommen, eingefroren und bei -80°C gelagert wurde (Neumann et al. 2021a).

3.6.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde ein 3-facher Ansatz an Standardverdünnungen nach dem Lowry Protokoll durchgeführt (Bohm et al. 1986). Als Proteinstandard wurde 1 mg Rinderserumalbumin/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ herangezogen. Mittels $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ wurde ein 3-facher Ansatz an Standardverdünnungen der Proben und des Proteinstandards mit steigender Standardkonzentration (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angefertigt. Diesen Lösungen aus der Verdünnungsreihe wurden jeweils 500 μL der Lösung D (2% Na_2CO_3 in 0,1 NaOH , 1% $\text{K}^+\text{-Na}^+$ -Tartrat $4\text{H}_2\text{O}$, 0,5% CuSO_4) hinzugegeben. Es schloss sich eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an, worauf jedem Gemisch jeweils 0,1 ml der Lösung E (Folin-Ciocalteus) zugegeben wurde. Anschließend wurden alle Gemische auf dem Vortex gemischt und wiederum 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Lösungen wurden in Küvetten umgefüllt, bei 595 Nanometer im Eppendorf Photometer mit dem Programm LOWRY gemessen und die Messdaten zur weiteren Auswertung in eine Excel-Tabelle übertragen (Boknik et al. 2019).

3.6.3 Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurde den Lösungen gemäß ihres gemessenen Proteingehaltes 2-fach-Laemmli-Ladepuffer mit 10 mM NaHCO_3 /20% SDS zugesetzt, um die erforderlichen Proben-Konzentrationen herzustellen.

Zunächst wurden die Glasplatten gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ gespült und mit Ethanol gesäubert. Darauf folgte der Zusammenbau der Gelelektrophorese-Apparatur, in die 10%ige Trenngel gegossen wurden. Diese wurden zum Schutz vor Verdunstung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ überschichtet, mit ParafilmTM abgedeckt und über Nacht im Kühlraum (bei 4°C) zur Auspolymerisierung aufbewahrt. Im nächsten Schritt wurde auf das Trenngel ein 4%iges Sammelgel gegossen, welches bei Raumtemperatur 2 Stunden polymerisierte. Marker und Proben wurden 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um diese zu denaturieren. Im

Anschluss wurden jeweils 100 µl der Proben in die Geltaschen überführt und die Apparatur vertikal in die Elektrophoresekammer transferiert, welcher bereits Elektrophorese-Puffer hinzugegeben worden war. Unter ausreichender Kühlung wurde eine Stromstärke von 40 mA je Gel angelegt. Sobald die Bromphenolblau-Bande den Rand des Trenngels erreicht hatte (meistens nach ca. 240 Minuten), war das Gel bereit für den Transfer (Dorner et al. 2021).

3.6.4 Proteintransfer

Für den Proteintransfer wurden nach Herstellung des Transferpuffers ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) die Schwämme, Membranen und Blottingpapiere in dem Transferpuffer getränkt. Die Anordnung der verschiedenen Membranen der Transferkassette war folgendermaßen: Schwamm, Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, Filterpapier und Schwamm. Hierbei wurde penibel auf die Vermeidung und ggf. Entfernung von entstandenen Luftblasen geachtet. Anschließend wanderten die Proteine im elektrischen Feld aus dem Gel in die Membran über Nacht insgesamt 4 Ah, das heißt bei 0,25 A und 5 V für circa 16 Stunden. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Transfermembran mit Ponceau-Rot gefärbt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ gewaschen, bis die Proteinbanden so deutlich sichtbar wurden, dass sie verlässlich eingescannt werden konnten (Neumann et al. 1988).

3.6.5 Calsequestrin-Nachweis im Western-Blot

Der Bereich zwischen 45 kDa und 67 kDa wurde aus der Nitrozellulosemembran ausgeschnitten, so dass die erwarteten CSQ Proteingrößen abgebildet werden konnten. Der Membranausschnitt wurde 2-mal über 10 Minuten mit TBST gewaschen, um die Membran vom Ponceau-Rot zu entfärben. Die Membran wurde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBST über 1 Stunde geblockt, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach Entfernung des Blockierungspuffers wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit Anti-Calsequestrin-Antikörpern der Verdünnung 1:1000 in 5% Milchpulver in TBST inkubiert. Darauf wurden die Membranen 3-mal 10 Minuten lang in TBST gewaschen. Es schloss sich die Inkubation mit Anti-Rabbit IgG (Verdünnung 1:1000 in 5% Milchpulver in TBST) für 2 Stunden bei Raumtemperatur an. Hierauf wurde die Membran wiederum 3-mal 10 Minuten lang in TBST sowie anschließend 2-mal 2 Minuten mit AP-Puffer gewaschen (Fischer et al. 2006).

3.6.6 Färbungen

Zum Nachweis wurden 2 verschiedene Färbemethoden und somit Nachweisreaktionen durchgeführt. Einerseits wurde ein frisch hergestellter NBT/BCIP Farbstoff appliziert, bis Banden sichtbar wurden. Dann wurde der Farbstoff mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Reinst}}$ abgespült und die gefärbte Membran für Präsentationszwecke eingescannt. Andererseits erfolgte die quantitative Auswertung der Bandenintensität mithilfe eines ECF-Substrats. Es wurden je 10 ml ECF-Substrat-Lösung auf die Blots gegeben, diese im Dunkeln über 5 Minuten inkubiert, die Substrat-Lösung abgegossen und die Blots mit AP-Puffer gespült (Neumann et al. 2021b).

3.6.7 Stripping

Um die verschiedenen Antikörper mit dem gegebenen Blot analysieren zu können, wurden ein Stripping und anschließend ein Reprobing der Western Blotting Membranen durchgeführt. Nach der ECF-Färbung wurden die Membranstücke 3-mal 10 Minuten mit 35-40°C warmem Stripping-Puffer sowie daran anschließend 3-mal 10 Minuten mit 1 x TBST gewaschen. Danach wurde die Membran bei Raumtemperatur 1-2 Stunden mit Milchpulver bzw. BSA in 1 x TBST geblockt, und zwar abhängig vom verwendeten 1. Antikörper. Anschließend wurde weiter wie beim üblichen Western-Blot fortgefahren. ECF-Färbungen wurden nach Stripping jeweils 10 Minuten lang durchgeführt (Gergs et al. 2021a).

Mittels Typhoon-Scanner wurde die Fluoreszenz der Banden ersichtlich, dokumentiert und letztlich mit Image Quant-Software quantitativ ausgewertet.

3.7 Panamá-Blot

3.7.1 Proteinmessung

Für die Proteinmessung wurde Black Six Mouse naives Herzextrakt verwendet. Dieses wurde zu 1 ml RIPA Puffer hinzugegeben (5 ml RIPA Puffer+50 µl Protease Inhibitor +50 µl Phosphatase Inhibitor (1:100)) und püriert. Anschließend wurde alles 5 Minuten bei 0°C und 13.200/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Bodensatz verworfen. Die Proteinkonzentration wurde nach Auftragung auf die Platten, nach Verdünnung und 30-minütiger Inkubation bei 37°C mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit überprüft und auf die präferierte Konzentration von 3 mg/ml verdünnt. Dem Proteinextrakt wurde Lämmli-Probenpuffer hinzugegeben und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Das Gel mit 100 µl des Proteinextraktes wanderte im SDS-Elektrophorese-Puffer 2 Stunden bei konstanter Spannung von 100 Volt (Gupta et al. 1993, Keppner et al. 2018).

3.7.2 Western Blot (Tank-Blot)

Der Tank-Blot wurde in einem CAPS-Puffer hergestellt. Das Fiber Pad (der Schwamm), das Filterpapier und die Membran wurden jeweils in einem CAPS-Puffer getränkt. Von der schwarzen Seite des Blockierungssystems ausgehend wurden die Membranen wie folgt angeordnet: Fiber pad, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier und Fiber Pad. Dieser Vorgang wurde für das 2. Gel wiederholt. Anschließend wanderten die Proteine in den Gelen eine Stunde bei konstanter Spannung von 50 Volt im CAPS-Puffer und auf Eis (Gergs et al. 2017a).

Über Nacht wurden die Gele in PBS-T 0,2% (2 mL Tween 20 in 1 L PBS) geblockt.

3.7.3 Panamá

Nach Gerinnung der Blutprobe und deren Zentrifugation wurde der Überstand verwendet. 70 µl des Serums wurden im Verhältnis 1:20 beziehungsweise für die Kontrolle im Verhältnis 1:100 in PBS-T 0,2% auf eine flache Platte gegeben. Die Membran wurde an den Miniblotter® angebracht, wie auch eine Frischhaltefolie und eine Polsterung für die Platte. Die in den Schlitzen verbliebene Flüssigkeit wurde entfernt. 60 µl jeder Probe wurden in je einen Schlitz gefüllt und 2 Stunden auf dem Bio Dancer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden aspiriert, der Inkubationsblock geöffnet und die Membran in PBS-T 0,2% überführt. Die Membran wurde 3-mal 5 Minuten in PBS-T 0,2% gewaschen. Der IgG Antikörper wurde 1:10.000 und der IgM Antikörper 1:30.000 mit PBS-T 0,2% verdünnt. Inkubiert wurde mit dem jeweiligen sekundären Antikörper anderthalb Stunden lang. Es folgten 3 Waschungen über je 5 Minuten in PBS-T 0,2%. Anschließend wurde 2-mal in 1x TBS gewaschen, um Tween® zu entfernen. Darauf wurde inkubiert in 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP gelöst in 5 ml AP-Puffer. Die Entwicklung wurde bis zum Ende der Reaktion, also bis zur Darstellung violetter Farbe, beobachtet. Die Entwicklung mit dem IgG Antikörper wurde 39 Minuten durchgeführt, die mit dem IgM Antikörper 80 Minuten. Abschließend wurde, um die Reaktion zu stoppen, mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Membranen wurden bei 4°C in destilliertem Wasser gelagert und mittels Image Quant abfotografiert, digitalisiert und ausgewertet (Keppner et al. 2018).

3.8 Durchflusszytometrie (FACS)

3.8.1 Organ-Präparation

Die Herzen wurden zur Präparation jeweils umgefüllt in ein Falcon™ Tube, welches 3 ml einer Verdauungslösung enthielt. Die Lösung bestand aus Kollagenase Typ II in RPMI. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über 35 Minuten. Die Tubes wurden geschüttelt und die verbliebenen Gewebestücke durch 70 µm Filter unter Hinzugabe von Hanks' Salzlösung (HBSS) und BSA gemahlen und dabei in ein 15 ml Falcon Tube gegeben. Die Nieren wurden einer Erythrozytolyse unterzogen. Anschließend wurden die Nieren sowie die mediastinalen und subiliakalen Lymphknoten durch 30 µm Filter unter Hinzugabe von HBSS sowie BSA gemahlen und dabei jeweils in ein 15 ml Falcon Tube gegeben.

Die Tubes wurden mit HBSS und BSA zu 5 ml aufgefüllt und zentrifugiert (ca. 400 G, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgegossen. Das Zellpellet wurde in ein kleineres Volumen in FACS Puffer wieder suspendiert (circa 200 µL/ 50 mg Gewebe) (Rieckmann et al. 2019).

3.8.2 FACS-Färbung

Nach der Organ-Präparation erfolgte der Transfer auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells für die FACS-Färbung. Es wurde zentrifugiert (400 G, 3 min, 4°C) und der Überstand

entfernt. Im Anschluss wurde der Blockade-Antikörper (mAk gegen Fc-Rezeptor CD16/32) in FACS Puffer 1:400 verdünnt, 25 µL der Lösung in jedes Well gegeben sowie 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörpermischung vorbereitet. Für die Oberflächenfärbung wurden folgende fluoreszenzmarkierten, von Biolegend produzierten Antikörper verwendet: anti-CD4 (Klon RM4-5 und GK1,5), anti-CD8 (Klon 53-6.7), anti-CD11b (Klon m1/70), anti-CD19 (Klon 6D5), anti-CD44 (Klon IM7), anti-CD62L (Klon MEL-14), anti-CD80 (Klon 16-10A1), anti-CD86 (Klon GL-1), anti-Ly6G (Klon 1A8) und anti-TCR Beta Kette (Klon H57-597). Zusätzlich wurde der Antikörper anti-CD45 (Klon 30-F11, BD Horizon) genutzt. Die monoklonalen Antikörpermischungen wurden jeweils zur Verdünnung in FACS Puffer gegeben. 25 µL der Antikörpermischung wurden in jedes Well gegeben und über 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Mischung wurde anschließend mit FACS Puffer gewaschen, zentrifugiert (400G, 3 min) sowie der Überstand verworfen. In der Folge wurde das Pellet wieder in FACS Puffer (100 µl/Well) gelöst.

3.8.3 FACS-Analyse

Nun wurde die FACS-Analyse der Zellen aus herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten (Med. Ln.), aus Herz, Milz und subiliakalen Lymphknoten durchgeführt – hier wurden die Zellen je Lymphknoten bzw. je mg Gewebe erfasst. Zum Ausschluss von Doubletten wurden FSC-H und FSC-A sowie SSC-A und FSC-A aufgezeichnet. Die folgende Gating-Strategie startete mit dem Aufzeichnen von SSC-A x CD45. Um die Leukozyten besser herausfiltern zu können, wurde eine Schwelle beim CD45 Kanal eingefügt. Um die absolute Zellzahl zu ermitteln, wurden die 123bright count beads mit einer bekannten Konzentration (beads/µl) hinzugegeben. Durch den Vergleich der Anzahl an Leukozyten (CD45⁺ Zellen) mit der Anzahl an erzielten Beads konnte die Zellkonzentration in der gegebenen Population geschätzt werden. Aus den Singlets heraus wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität bestimmt. Die CD19-positiven Zellen wurden anschließend als B-Lymphozyten definiert. Auf diesen wurden im nächsten Gating-Schritt die MHC-II- sowie die CD80/86-Expression gemessen. T-Zellrezeptor-β positive Zellen wurden hingegen als T-Lymphozyten bestimmt. Auch diese wurden weiter analysiert, und zwar im Hinblick auf CD4- und CD8-Merkmale. Letztlich wurde die CD44- und CD62L-Expression der CD4- und CD8-positiven T-Zellen erforscht.

3.9 Immunhistochemie

3.9.1 Immunfluoreszenz-Histologie

Der erste Schritt in der Immunfluoreszenz-Histologie war die Durchführung der Fixierung. Dazu wurden 12 µm Schnitte aus Herzgewebe der AID-/- /µS-/- Linie (aus eigener Zucht) aufgetaut und anschließend circa 15 Minuten auf einer Arbeitsplatte getrocknet. Die Schnitte wurden in Azeton bei -20°C 10 Minuten inkubiert. Es folgten 3 Waschungen mit PBS über je 5 Minuten. Danach wurden hydrophobe Markierungen mit einem Stift angefertigt. Um Austrocknung zu vermeiden, fanden diese Schritte immer in

einer Feuchtkammer statt. Die Blockierung wurde mit Hinzugabe von 30-50 µl einer Blockierungslösung und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (10x Carbo-free solution verdünnt 1x in PBS-Tween (0.05% 1:10)) durchgeführt. Es wurde 3-mal 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Nun wurde die Markierung angefertigt. Die Schnitte wurden mit Serum der Mäuse, welches im Verhältnis 1:5-1:10 mit Blockierungspuffer verdünnt wurde, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je Probe wurden 60 µL aufgetragen. Für jeden Färbeansatz wurde eine Kontrollfärbung verwendet, bei der der 1. Antikörper weggelassen wurde. Es erfolgte 3-maliges Waschen über 5 Minuten mit PBS-Tween (0.05%). Die Schnitte wurden mit den sekundären IgG (Alexa 488) und IgM (Alexa 546) Antikörpern, welche zuvor in Blockierungspuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt worden waren, über 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. 5 Minuten vor Ende der Inkubation wurden 5 µL DAPI (Hoechst 33258) hinzugegeben. Anschließend folgten 3 über 5 Minuten andauernde Waschungen in PBS-Tween (0.05%) im Dunkeln. Nach Zufügung von Mowiol wurden die Schnitte bei 4°C im Dunkeln gelagert, bis sie mit dem Mikroskop Axioskop 2 plus von Zeiss mikroskopiert und repräsentative Ausschnitte fotografiert wurden. Der blaue Kanal wurde für DAPI, der grüne Kanal für Anti-Maus IgG und der rote Kanal für Anti-Maus IgM verwendet. Die Belichtungszeit war für jedes Exemplar gleich und betrug zur Darstellung der IgG und IgM Antikörper je 0,15 Sekunden sowie zur Darstellung der nukleären Färbung 0,01 Sekunden. Die Intensitätsmessung erfolgte schließlich mit Image J. Dazu wurden die Fotografien in Graustufe umgewandelt (16 bit) und der durchschnittliche Grauwert je 3 repräsentativer Bereiche festgelegter Fläche jeder Aufnahme ermittelt (Rieckmann et al. 2019).

3.9.2 Histologie

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. habil. Igor B. Buchwalow (Institut für Hämatopathologie, Hamburg, Deutschland) auf konventionelle Weise erzeugt (Gergs et al. 2004, Gergs et al. 2017b).

3.10 Statistische Auswertung

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM). Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test berechnet. Zudem wurde die Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem Bonferroni-post-Test durchgeführt. War der p-Wert kleiner als 0,05, wurde dies als statistisch signifikant bewertet und dementsprechend kenntlich gemacht. Zur statistischen Auswertung wurden die Softwareprogramme Excel sowie Prism 8 genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 CSQ2 Knock-Out

Im Western Blot wurde der gelungene CSQ2 Knock-Out des hier genutzten Mausmodells nachgewiesen (Abb. 7).

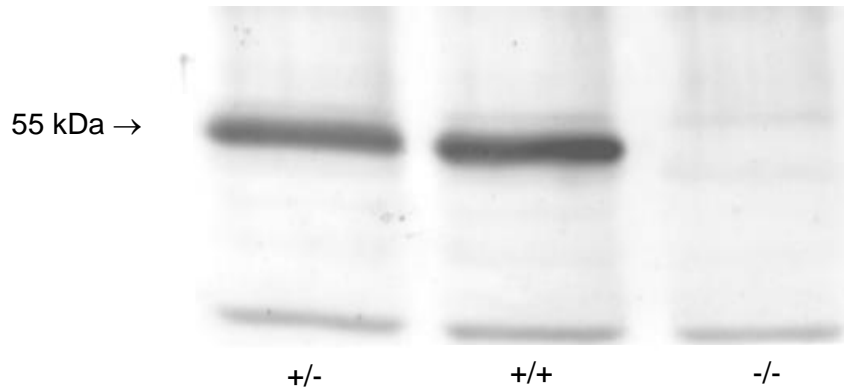


Abbildung 7: CSQ2 im Western Blot homogenisierter Herzproben

In dem exemplarisch abgebildeten Western Blot homogenisierter Herzproben sind für das Protein CSQ2 Banden-Signale bei 55 kDa bei CSQ2^{+/-} und CSQ2^{+/+} zu erkennen, während bei CSQ2^{-/-} keine Banden-Signale für CSQ2 zu detektieren sind. Es wurden jeweils Proteinmengen von 100µg/Spur aufgetragen und eine NBT/BCIP-Färbung durchgeführt.

4.2 Gravimetrie

Vor der Entnahme von Organen wurde das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt. Anschließend wurden die entnommenen Organe Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren gewogen.

In den Tabellen 1 und 2 sind das Alter, das Körpergewicht, das absolute Herzgewicht wie auch relative Organgewichte bezogen auf das Körpergewicht dokumentiert. Die Mäuse wurden je nach ihrem Alter in 2 sich hinsichtlich des Alters signifikant unterscheidende Gruppen, die Gruppe Alt (>300 Lebenstage) und die Gruppe Jung (<300 Lebenstage), sowie nach binärem Geschlechterverständnis weiter in die Gruppe weiblich bzw. männlich eingeteilt. Das absolute Herzgewicht der älteren weiblichen (W) sowie der jüngeren männlichen (M) ^{-/-} Tiere war im Vergleich zu der korrespondierenden CSQ2^{+/-} Gruppe signifikant erhöht. Die älteren männlichen CSQ2^{-/-} Mäuse präsentierten hingegen ein vergrößertes absolutes Herzgewicht gegenüber den korrespondierenden CSQ2^{+/+}. Während das absolute Herzgewicht aller älteren männlichen Genotypen jeweils größer als das der jungen Vergleichsgruppen war, zeigte sich bei den alten Weibchen im Vergleich mit den jungen Tieren ein vergrößertes absolutes Herzgewicht ausschließlich bei den CSQ2^{-/-}. Das Körpergewicht der älteren

weiblichen (W) CSQ2^{-/-} Tiere war wiederum im Vergleich zu den CSQ2^{+/-} Tieren sowie zu den jüngeren weiblichen CSQ2^{-/-} Mäusen höher (Tab. 1). Das relative Lungengewicht der jungen männlichen CSQ2^{+/-} Tiere war gegenüber dem der CSQ2^{+/+} Tiere erhöht. Zudem war das relative Lungengewicht der alten weiblichen CSQ2^{-/-} Mäuse signifikant niedriger als das der korrespondierenden jungen Gruppe. Die relativen Leber-, Milz- und Nierengewichte zeigten keine Auffälligkeiten (Tab. 2).

Das relative Organgewicht wurde wie folgt berechnet: Organgewicht/Körpergewicht (mg/g).

Tabelle 1: Körper- und Herzgewichte der experimentellen Kohorte

*W, weiblich; M, männlich; d, Tag; n, Stichprobenumfang *p<0,05 vs. +/+; #p<0,05 vs. +/-; ^p<0,05 vs. Jung je Genotyp*

Genotyp	Alter (d)	Anzahl (n)	Körpergewicht (g)	Herzgewicht (mg)	Rel. Herzgewicht (mg/g)
+/+	538.75 ± 35.64 [^]	W: 5	24.4 ± 3.24	188 ± 19.1	8.34 ± 1.24
		M: 7	27.0 ± 1.36	241 ± 12.3 [^]	9.05 ± 0.52
	139.67 ± 30.26	W: 4	20.8 ± 0.59	129 ± 6.5	6.23 ± 0.31
		M: 5	24.0 ± 1.75	180 ± 15.0	7.61 ± 0.64
+/-	554.33 ± 35.52 [^]	W: 5	21.7 ± 1.16	152 ± 7.6	7.15 ± 0.63
		M: 4	24.7 ± 1.67	233 ± 26.6 [^]	9.59 ± 1.28
	94.00 ± 10.64	W: 7	21.0 ± 0.86	147 ± 10.8	6.92 ± 0.24
		M: 6	23.4 ± 1.06	161 ± 7.2	7.14 ± 0.27
-/-	458.18 ± 35.11 [^]	W: 7	25.6 ± 0.74 ^{#^}	210 ± 12.1 ^{#^}	8.26 ± 0.53
		M: 4	27.2 ± 1.83	294 ± 16.3 ^{*^}	10.40 ± 0.50
	118.54 ± 12.35	W: 7	18.5 ± 1.49	136 ± 9.2	7.47 ± 0.43
		M: 6	24.7 ± 1.53	220 ± 8.5 [#]	9.20 ± 0.82

Das Körpergewicht sowie das absolute Herzgewicht der älteren weiblichen (W) CSQ2^{-/-} Tiere waren sowohl im Vergleich zu den jüngeren CSQ2^{-/-} Tieren als auch zu den älteren weiblichen CSQ2^{+/-} Tieren signifikant erhöht. Das absolute Herzgewicht der älteren männlichen (M) CSQ2^{-/-} Tiere war signifikant größer als das der älteren männlichen CSQ2^{+/+} Tiere. Das absolute Herzgewicht der jüngeren männlichen CSQ2^{-/-} Tiere war signifikant größer als das der korrespondierenden CSQ2^{+/-} Gruppe. Das absolute Herzgewicht der älteren männlichen Tiere war bei allen Genotypen jeweils signifikant größer als das der korrespondierenden jüngeren männlichen Tiere. Das Alter der Gruppe Alt war bei allen Genotypen signifikant höher als das Alter der jeweils jüngeren Vergleichsgruppe. Weitere Unterschiede fanden sich nicht.

Tabelle 2: Gewicht der inneren Organe der experimentellen Kohorte

W, weiblich; M, männlich; * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-; ^ $p < 0,05$ vs. Jung je Genotyp

Genotyp	Alter (d)	Anzahl (n)	Rel. Lungengewicht (mg/g)	Rel. Lebergewicht (mg/g)	Rel. Milzgewicht (mg/g)	Rel. Nierengewicht (mg/g)
+/+	538.75 ± 35.64 [^]	W: 5	9.12 ± 1.87	44.44 ± 7.75	4.18 ± 0.40	13.60 ± 0.57
		M: 7	6.35 ± 0.55	56.34 ± 2.89	4.55 ± 0.92	16.74 ± 0.76
	139.67 ± 30.26	W: 4	8.08 ± 0.71	51.12 ± 2.24	4.30 ± 0.43	13.83 ± 0.69
		M: 5	6.11 ± 0.28	54.68 ± 1.76	3.06 ± 0.47	16.02 ± 0.62
+/-	554.33 ± 35.52 [^]	W: 5	6.78 ± 0.30	46.29 ± 3.67	3.82 ± 0.24	14.57 ± 0.65
		M: 4	8.00 ± 1.32	73.81 ± 9.18	8.12 ± 2.50	20.58 ± 2.75
	94.00 ± 10.64	W: 7	8.34 ± 0.52	50.40 ± 2.79	4.99 ± 0.45	14.15 ± 0.40
		M: 6	7.44 ± 0.42 [*]	55.86 ± 1.48	3.41 ± 0.24	16.22 ± 0.44
-/-	458.18 ± 35.11 [^]	W: 7	7.18 ± 0.39 [^]	52.95 ± 1.46	3.93 ± 0.21	13.57 ± 0.53
		M: 4	7.63 ± 0.27	56.32 ± 3.47	3.92 ± 0.53	16.15 ± 0.70
	118.54 ± 12.35	W: 7	10.22 ± 1.07	50.60 ± 1.24	3.69 ± 0.34	14.23 ± 0.35
		M: 6	7.40 ± 0.53	59.81 ± 4.80	3.58 ± 0.46	16.36 ± 0.52

Das relative Lungengewicht der jungen männlichen (M) CSQ2+/- Tiere war gegenüber dem der jungen männlichen CSQ2+/+ Tiere erhöht. Das relative Lungengewicht der alten weiblichen (W) CSQ2-/- Tiere war signifikant niedriger als das der jungen Vergleichsgruppe. Weitere Unterschiede zeigten sich nicht.

4.3 Herzfunktion in vivo

Zur Charakterisierung der Herzarbeit der Genotypen wurden die Versuchstiere unter Isofluran-Narkose echokardiographisch untersucht und begleitend Elektrokardiographien angefertigt. Die Untersuchung erfolgte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach β -adrenerger Stimulation mittels 100 μ l einer 1mM Isoprenalin-Lösung. Die Herzfrequenz, die Pumpfunktion des Herzens, linksventrikuläre Durchmesser sowie Wanddicken, Flüsse in Gefäßen sowie Flüsse durch die Mitralklappe, Geschwindigkeiten der Ventrikelwand und regionale Wandbewegungen wurden untersucht, ausgewertet und analysiert. Auch für diese Berechnungen wurden die Mäuse jeweils in die zwei Gruppen von verschiedenem Alter eingeteilt, um die altersabhängige Auswirkung des CSQ2 Knock-Outs vergleichend zu analysieren. Zur Charakterisierung geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden diesbezüglich ebenso Berechnungen durchgeführt.

4.3.1 Echokardiographie – Pumpfunktion

Zur Beurteilung der Pumpfunktion des Herzens wurde die Ejektionsfraktion im M-Mode bestimmt. Dabei wurden auch durch β -adrenerge Stimulation bedingte Veränderungen der Ejektionsfraktion aufgezeigt. Die diesbezüglichen geschlechtsspezifischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der CSQ2 Knock-Out Mäuse sind im Folgenden dargestellt.

Anhand von Aufnahmen im M-Mode wurde die Ejektionsfraktion berechnet (Abb. 8-12, Tab. 4). Abweichungen zwischen den Genotypen – hinsichtlich einer reduzierten Ejektionsfraktion der CSQ2^{-/-} Mäuse – werden bereits auf den exemplarisch dargestellten Abbildungen deutlich (Abb. 8).

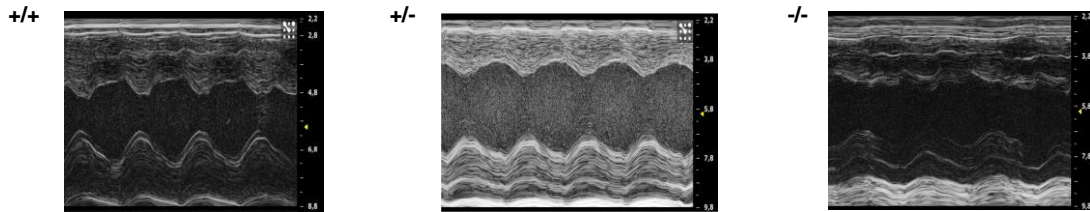


Abbildung 8: Echokardiographie – Exemplarische M-Mode-Aufnahmen in der parasternalen langen Achse der Gruppe Alt

Beispielhaft ist hier eine M-Mode Aufnahme je Genotyp der Gruppe Alt abgebildet. Die Aufzeichnungen erfolgten in der parasternalen langen Achse unter basalen Bedingungen.

Die Ejektionsfraktion wurde als Parameter der Pumpfunktion des Herzens herangezogen. Im Folgenden wurden die Abweichungen zwischen den Genotypen, den Altersgruppen und den Geschlechtern überprüft (Abb. 8-12, Tab. 4).

Es präsentierte sich eine signifikant verminderte Ejektionsfraktion – sowohl vor als auch nach Isoprenalininjektion – der CSQ2^{-/-} Mäuse gegenüber den CSQ2^{+/+} Mäusen. Solch ein Unterschied konnte zu den CSQ2^{+/-} Mäusen lediglich nach Stimulation mit Isoprenalin festgestellt werden. Die Ejektionsfraktion war bei der CSQ2^{+/+} und CSQ2^{+/-} Gruppe signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb. 9, Tab. 4).

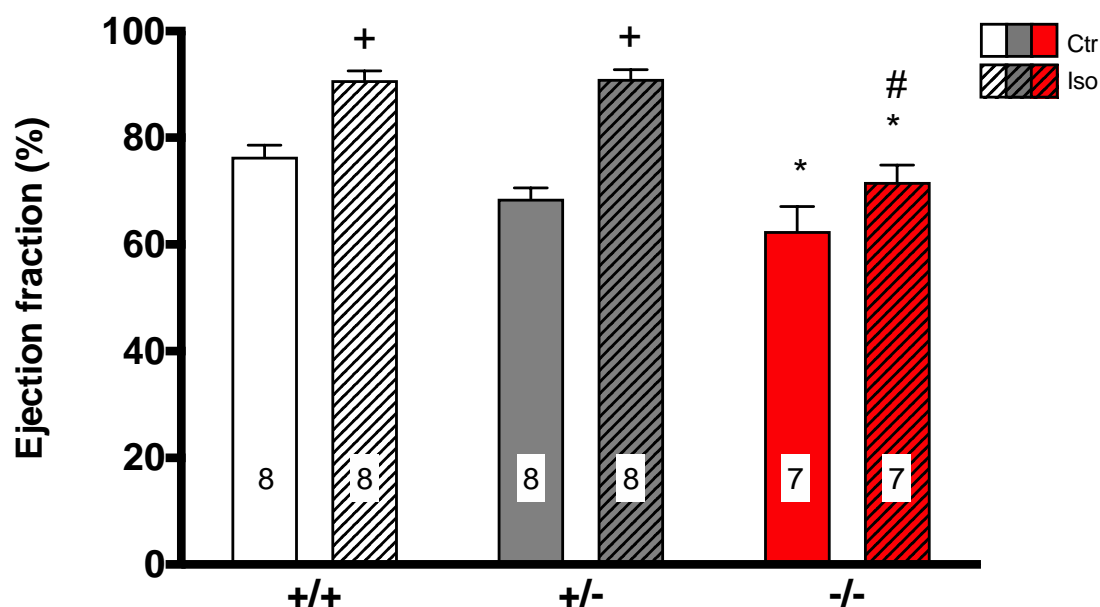


Abbildung 9: Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion

*Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion bei Mäusen der Gruppe Alt vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-*

Die Ejektionsfraktion der jungen und der alten Mäuse wurde je Genotyp nach β -adrenerger Stimulation analysiert. Dabei zeigten ausschließlich die CSQ2^{-/-} einen Abfall der EF mit dem Alter (Abb. 10, Tab. 4).

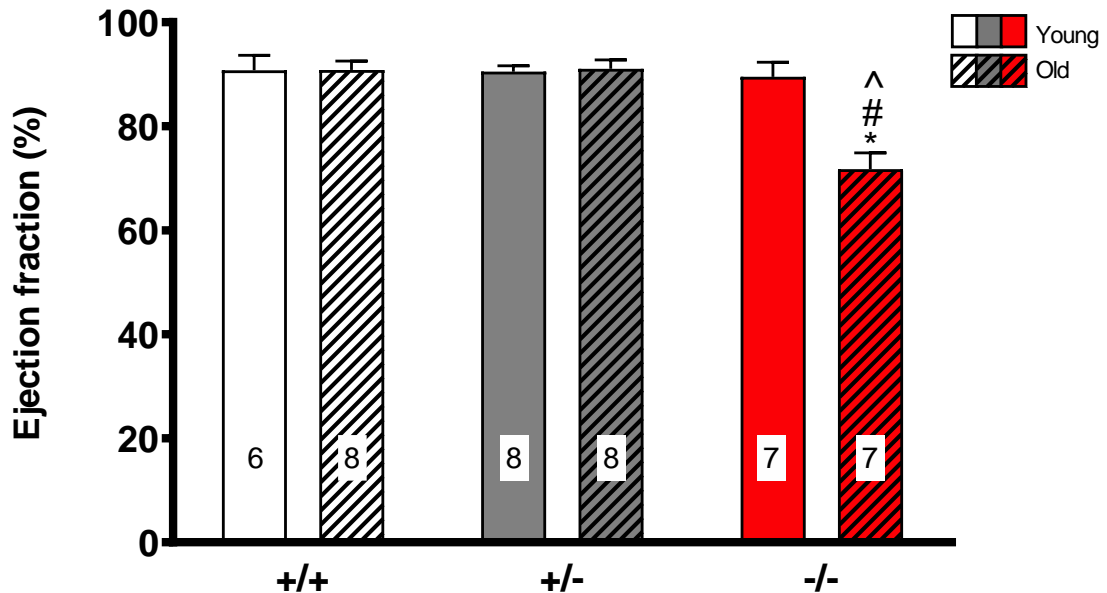


Abbildung 10: Ejektionsfraktion junger und alter Mäuse nach Isoprenalininjektion

*Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion bei Mäusen der Gruppen Jung und Alt nach Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-; ^ $p < 0,05$ vs. Jung je Genotyp*

Die Ejektionsfraktion der weiblichen CSQ2^{-/-} Mäuse war nach Injektion von Isoprenalin zu den anderen Genotypen signifikant verringert. Isoprenalin wirkte ausschließlich bei der CSQ2^{+/-} Gruppe statistisch signifikant (Abb. 11).

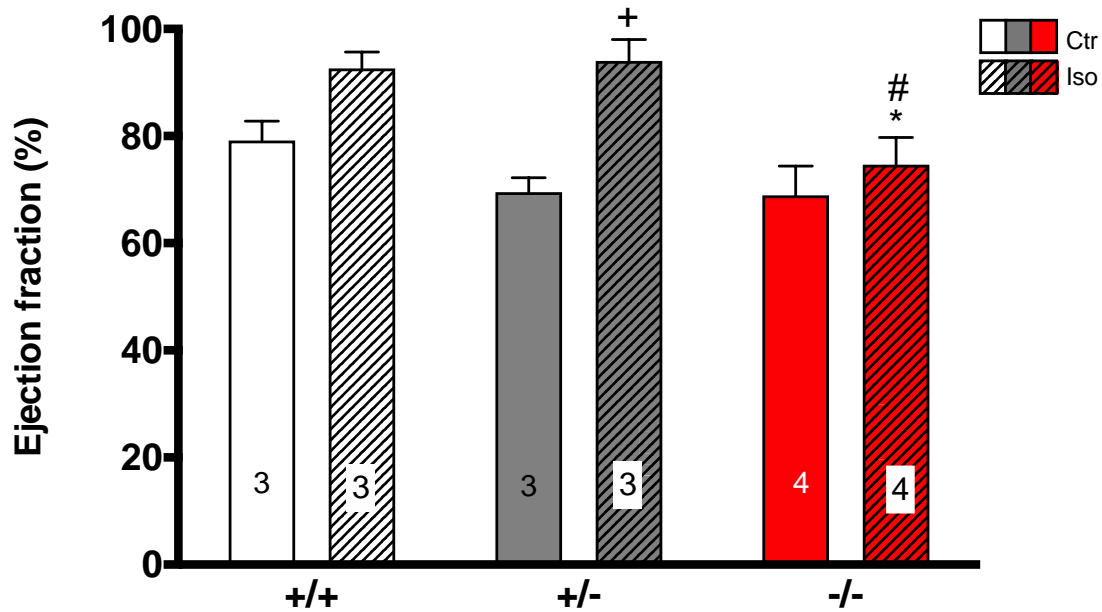


Abbildung 11: Ejektionsfraktion - Weibliche Mäuse

Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion bei Mäusen der Gruppe Alt weiblich vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-

Die Gruppe der männlichen CSQ2^{-/-} Mäuse präsentierte sich hingegen mit vor und nach Isoprenalininjektion signifikant verminderter Ejektionsfraktion gegenüber den beiden anderen Genotypen. Die β -adrenerge Stimulation bewirkte bei allen männlichen Genotypen eine signifikante Steigerung der Ejektionsfraktion (Abb. 12).

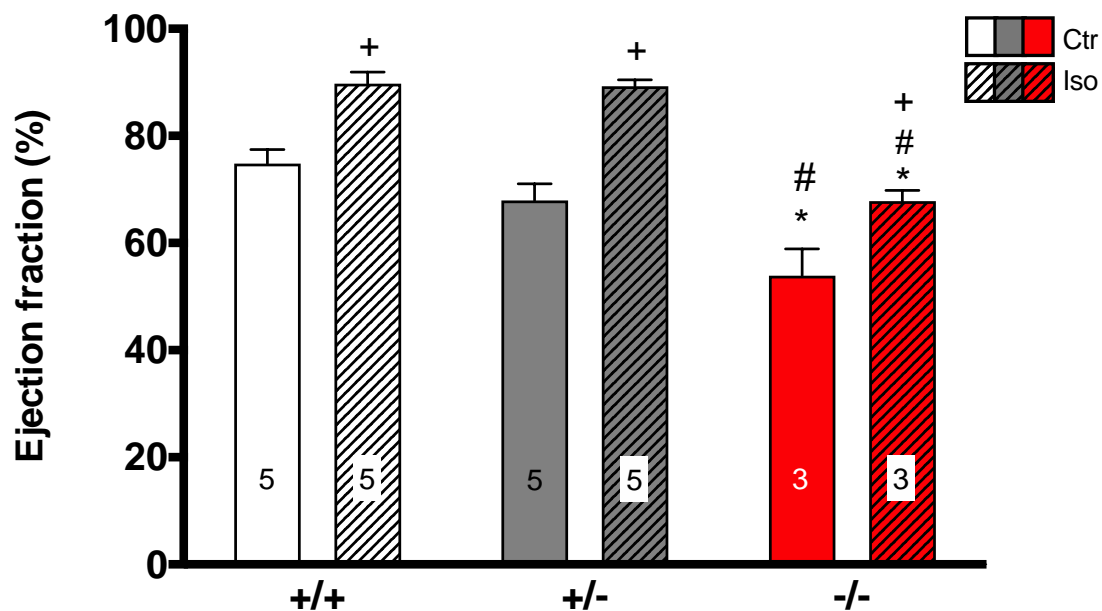


Abbildung 12: Ejektionsfraktion - Männliche Mäuse

*Echokardiographische Bestimmung der Ejektionsfraktion bei Mäusen der Gruppe Alt männlich vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-*

4.3.2 Echokardiographie – Ventrikel-Durchmesser

Um Anhaltspunkte für eine systolische bzw. diastolische Herzschwäche erhalten zu können, wurden der linksventrikuläre endsystolische sowie enddiastolische Durchmesser vor und nach Injektion von Isoprenalin bestimmt.

Durch Stimulation mit Isoprenalin zeigten die Mäuse jedweden Genotyps und Alters eine signifikante Verkleinerung des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (LVESD)(Abb. 13,14). Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser der alten CSQ2+/- und CSQ2-/- Mäuse war vor der Injektion von Isoprenalin signifikant größer als der Durchmesser der CSQ2+/+ Gruppe. Nach der Injektion war wiederum ausschließlich der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser der alten CSQ2-/- Tiere gegenüber den beiden anderen Genotypen signifikant erhöht (Abb. 13). Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser wies zwar keine Ungleichheiten zwischen CSQ2-/- und den anderen beiden Genotypen auf, jedoch war der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser der jungen CSQ2+/- größer als jener der jungen CSQ2+/+ (s. Tab. 4).

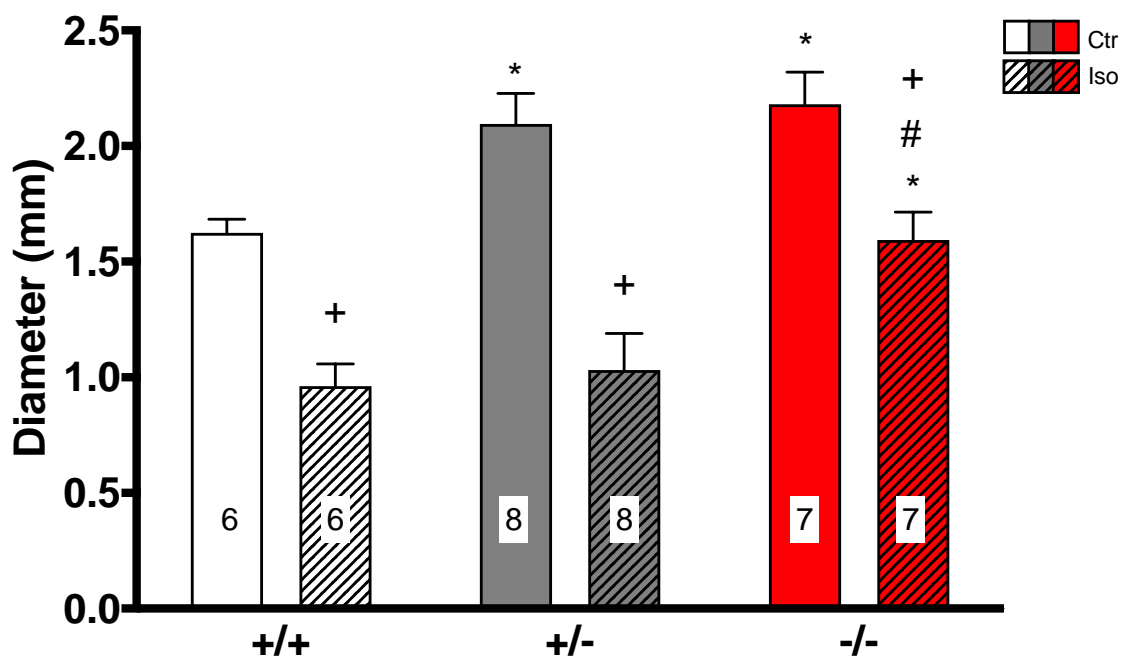


Abbildung 13: Echokardiographische Bestimmung des LVESD der Gruppe Alt

*Echokardiographische Bestimmung des linksventrikulären endsystolischen Diameters (LVESD) bei Mäusen der Gruppe Alt vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-*

Zwischen den Genotypen der jungen Mäuse gab es hinsichtlich des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers weder vor noch nach der Isoprenalininjektion Unterschiede. Die Stimulation mit Isoprenalin bewirkte jedoch bei allen Genotypen eine signifikante Verkleinerung des LVESD (Abb. 14, Tab. 4).

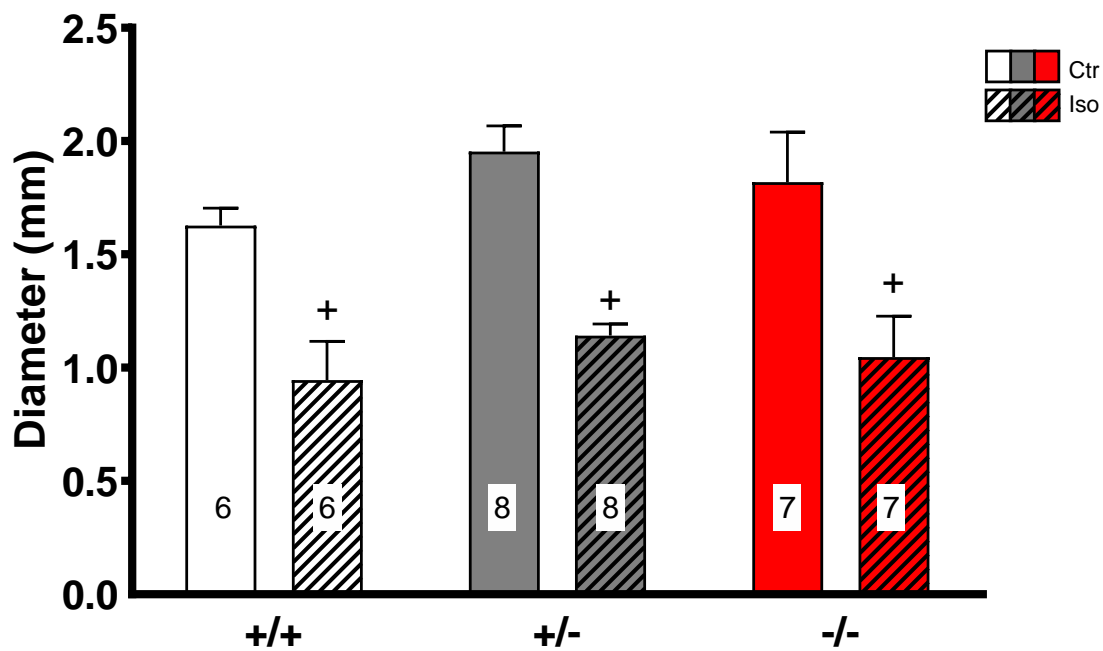


Abbildung 14: Echokardiographische Bestimmung des LVESD der Gruppe Jung

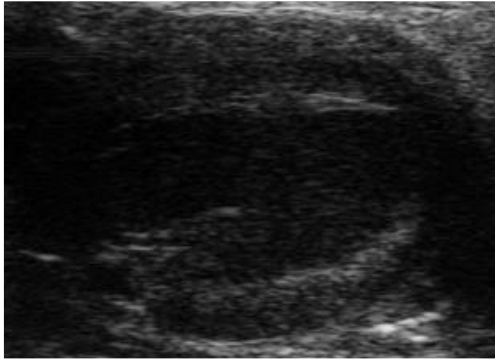
Echokardiographische Bestimmung des linksventrikulären endsystolischen Diameters (LVESD) bei Mäusen der Gruppe Jung vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin.
⁺ $p < 0,05$ vs. Kontrolle

4.3.3 Echokardiographie – regionale Wandbewegungen

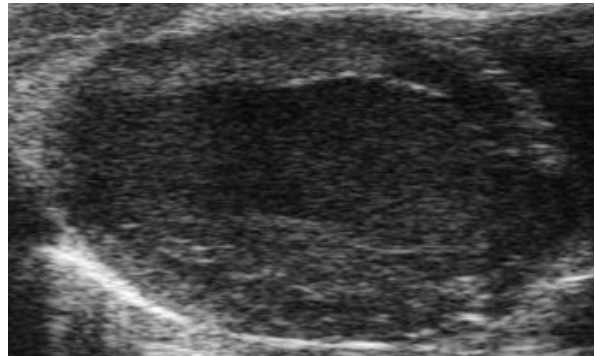
Mittels des Speckle Tracking Imaging, einem echokardiographischen Bildgebungsverfahren, wurden die regionalen Wandbewegungen der untersuchten Herzen erforscht. Ziel war es, bereits feinere Störungen der Herzfunktion herauszuarbeiten, welche in der herkömmlichen Echokardiographie unauffällig bleiben.

Beispielhaft sind hier zum Vergleich je eine B-Mode Aufnahme der CSQ2+/+ und CSQ2-/- Tiere je Alter abgebildet (Abb. 15). Die Aufnahmen erfolgten in der parasternalen langen Achse unter basalen Bedingungen. Die Abbildung links zeigt Aufnahmen junger Tiere, die Abbildung rechts dementsprechend Aufnahmen alter Tiere.

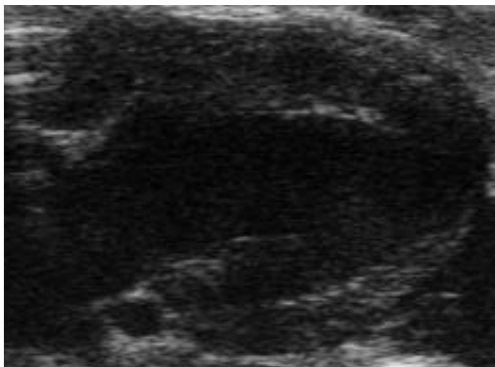
CSQ2+/+ jung



CSQ2+/+ alt



CSQ2-/- jung



CSQ2-/- alt

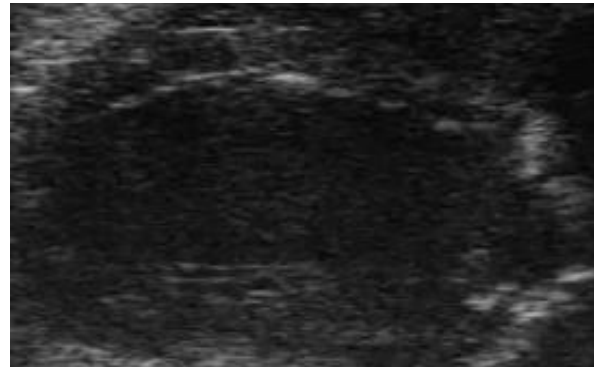


Abbildung 15: Echokardiographie – Exemplarische B-Mode-Aufnahmen in der parasternalen langen Achse

Beispielhaft wird die Messung an dem linken Ventrikel einer alten CSQ2-defizienten Maus gezeigt. Auf der linken Seite ist eine Originalabbildung mit an Endo- und Epikard entlanglaufenden Linien zu sehen. Demgegenüber ist auf der rechten Seite schematisch die Einteilung der verschiedenen Segmente anhand von Farbtönen dargestellt. Das Segment „Posterior Mitte“ ist mit weißer Linie umzogen (Abb. 16).

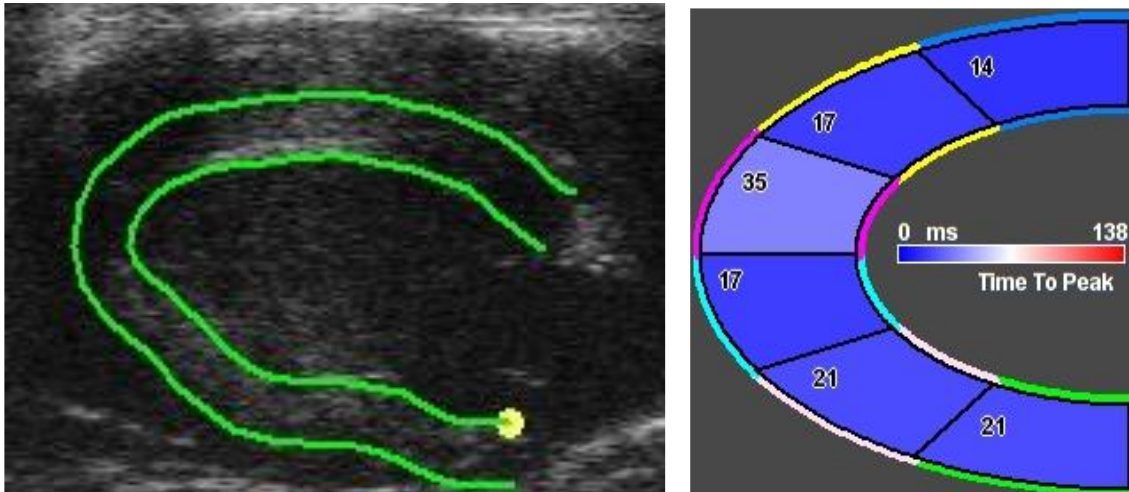


Abbildung 16: Speckle Tracking Imaging in der parasternalen langen Achse einer CSQ2-/- Maus

Der Longitudinale Strain des Segments „Posterior Mitte“ ist bei CSQ2+/- alten Mäusen signifikant größer als bei der CSQ2+/+ Gruppe (Tab. 3). Weitere Unterschiede waren zwischen alten Genotypen nicht zu finden. Bei Mäusen der Gruppe Jung wurden Abweichungen zwischen den Genotypen erhoben, welche mittels herkömmlicher echokardiographischer Parameter nicht ersichtlich waren (s. Tab. 4). Das Longitudinale Displacement des Segments „Posterior Mitte“ ist bei jungen CSQ2+/- Mäusen verringert gegenüber CSQ2+/+ Mäusen. Zudem ist der Strain im Abschnitt „Posterior Mitte“ bei beiden jungen Knock-Out Typen im Vergleich zum CSQ2+/+ vermindert. CSQ2-/- junge Knock-Out Tiere präsentieren in Relation zu den übrigen Genotypen eine signifikant verringerte Strain Rate im Segment „Posterior Mitte“. Beim Vergleich der Werte zwischen den Altersgruppen zeigen CSQ2+/+ und CSQ2-/- Veränderungen des Strains der Segmente „Laterale Wand“ sowie „Posterior Mitte“ auf. Bei den CSQ2-/- ist zwischen den Altersgruppen zusätzlich die Strain Rate des Segmentes „Posterior Mitte“ verändert (Tab. 3).

Tabelle 3: Speckle Tracking Imaging unter basalen Bedingungen

*p<0,05 vs. +/+; #p<0,05 vs. +/-; ^p<0,05 vs. Jung je Genotyp

Echokardiographische Parameter	Alter	Genotyp						Anzahl (n)
		+/+		+/-		-/-		
		Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	
								Basal
Radiale Velocity Posterior Mitte (cm/s)	Alt	2.05	0.23	1.94 [^]	0.2	1.83	0.2	8,8,8
	Jung	1.67	0.19	1.24	0.13	1.36	0.17	6,8,7
Radiale Velocity Laterale Wand (cm/s)	Alt	1.54	0.16	1.28	0.13	1.05	0.2	4,3,4
	Jung	1.25	0.14	1.20	0.15	1.18	0.11	6,8,7
Longitudinale Velocity Posterior Mitte (cm/s)	Alt	1.17	0.09	1.15	0.2	0.98	0.18	8,8,8
	Jung	1.49	0.30	1.08	0.09	1.00	0.19	6,8,7
Circumferentielle Velocity Laterale Wand (deg/s)	Alt	175.5	20.1	335.04	143.24	303.26	58.87	4,3,4
	Jung	176.42	31.05	231.02	28.22	213.27	34.64	6,8,7
Radiales Displacement Posterior Mitte (mm)	Alt	0.6	0.05	0.55	0.07	0.52	0.05	8,8,8
	Jung	0.52	0.05	0.48	0.04	0.42	0.08	6,8,7
Radiales Displacement Laterale Wand (mm)	Alt	0.42	0.06	0.31	0.06	0.36	0.05	4,3,4
	Jung	0.44	0.06	0.46	0.06	0.39	0.02	6,8,7
Longitudinales Displacement Posterior Mitte (mm)	Alt	0.25	0.03	0.27	0.05	0.17	0.02	8,8,8
	Jung	0.38	0.07	0,20*	0.03	0.26	0.07	6,8,7
Circumferentielles Displacement Laterale Wand (deg)	Alt	3.53	1.06	6.02	2.49	5.76	2.1	4,3,4
	Jung	1.60	0.77	3.83	1.00	4.16	1.37	6,8,7
Radialer Strain Posteriore Mitte (%)	Alt	23.59	3.24	27.23	4.14	25.14	3.42	8,8,8
	Jung	35.78	5.85	41.04	9.32	36.85	6.79	6,8,7
Radialer Strain Laterale Wand (%)	Alt	36.88 [^]	3.07	17.26	6.7	32.91 [^]	8.22	4,3,4
	Jung	14.54	4.41	23.88	7.95	11.21	2.31	6,8,7
Longitudinaler Strain Posterior Mitte (%)	Alt	13.15 [^]	1.33	20.68*	1.7	16.5 [^]	1.74	8,8,8
	Jung	22.20	2.63	11,53*	2.72	10,56*	1.79	6,8,7
Circumferentieller Strain Laterale Wand (%)	Alt	30.64	5.08	22.65	3.92	31.38	7.68	4,3,4
	Jung	27.28	2.23	25.89	3.31	28.12	2.10	6,8,7
Radiale Strain Rate Posterior Mitte (1/s)	Alt	8.89	0.84	8.18	0.85	8.3	1.21	8,8,8
	Jung	10.35	1.45	9.73	1.74	8.89	0.93	6,8,7
Radiale Strain Rate Laterale Wand (1/s)	Alt	10.34	0.9	6.47	1.39	8.74	1.72	4,3,4
	Jung	7.89	1.27	11.54	2.23	7.90	1.22	6,8,7
Longitudinale Strain Rate Posterior Mitte (1/s)	Alt	6.86	0.72	10.36	1.5	7.49 [^]	0.87	8,8,8
	Jung	8.46	1.15	7.28	0.65	4,87* #	0.41	6,8,7
Circumferentielle Strain Rate Laterale Wand (1/s)	Alt	16.14	3.52	9.02	1.34	4.12	3.82	4,3,4
	Jung	10.88	0.67	11.07	1.44	11.33	1.18	6,8,7

4.3.4 Echokardiographie – Flüsse in Gefäßen

Um weitere Informationen über die Herzarbeit zu erlangen, wurden die Flüsse in der Aorta ascendens, in der Aorta descendens und in der Pulmonalarterie sowie die Flüsse durch die Mitralklappe analysiert. Abweichungen zwischen der CSQ2/- Gruppe und den anderen Genotypen ergaben lediglich die Messungen der Pulmonalarterie (Abb. 18; Tab. 4).

Mithilfe der Pulmonalarterie konnten Rückschlüsse auf die rechtsventrikuläre Funktion gezogen werden. Exemplarisch ist ein Ausschnitt aus Pulswellendoppleraufnahmen der Arteria pulmonalis einer alten CSQ2/- Maus abgebildet. Zu erkennen sind der Ort der Messung auf dem B-Mode Ausschnitt, die Kontur der Wellen mit Geschwindigkeitsparameter auf der y-Achse, die parallel aufgezeichnete EKG-Kurve mit Zeitangabe in Sekunden auf der x-Achse, die kalkulierte Herzfrequenz und die rektal gemessene Temperatur (Abb. 17).

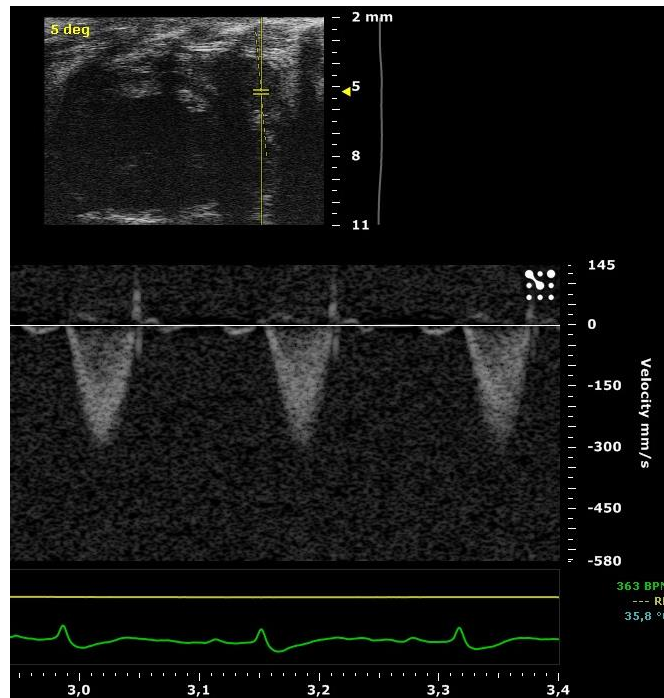


Abbildung 17: Pulswellen Doppler der Pulmonalarterie einer CSQ2^{-/-} Maus

Die Fläche unter der Flusskurve (VTI) der Pulmonalarterie war unter basalen Bedingungen bei alten CSQ2^{-/-} Tieren signifikant niedriger als bei CSQ2^{+/+}. Dem könnte ein reduziertes rechtsventrikuläres Schlagvolumen zugrunde liegen. Die Injektion von Isoprenalin hatte keine statistisch signifikante Wirkung auf die Fläche unter der Flusskurve der Pulmonalarterie (Abb. 18).

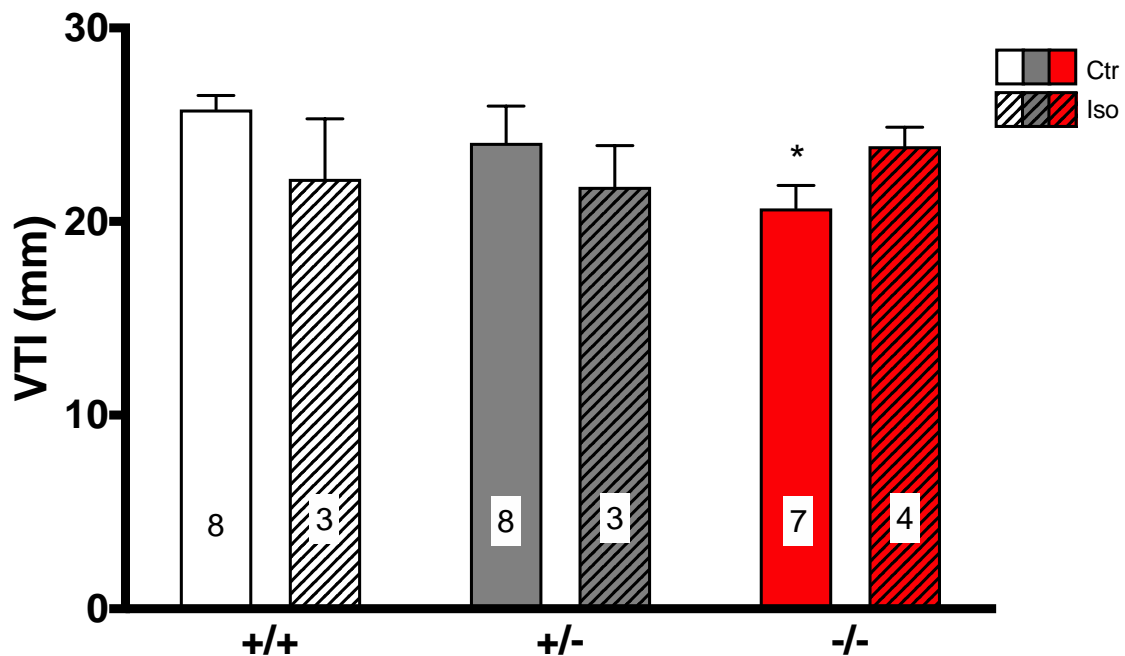


Abbildung 18: Echokardiographische Bestimmung des VTI der Pulmonalarterie

Echokardiographische Bestimmung des VTI der Pulmonalarterie bei Mäusen der Gruppe Alt vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. * $p < 0,05$ vs. +/+

Junge CSQ2^{-/-} Tiere zeigten eine gegenüber den CSQ2^{+/+} reduzierte Spitzengeschwindigkeit im Fluss der Pulmonalarterie auf (s.Tab. 4).

4.3.5 Elektrokardiographie – Arrhythmien

Begleitend zur Echokardiographie wurde fortlaufend ein Elektrokardiogramm geschrieben, um einerseits Arrhythmien erkennen zu können und andererseits die anschließenden Messungen unter Zuhilfenahme der R-Zacken zu vereinfachen. In diesem Rahmen sind bei einer CSQ2^{+/+} und einer CSQ2^{-/-} Maus Arrhythmien aufgetreten. Bei der CSQ2^{+/+}-Gruppe wurden keine Arrhythmien festgestellt. Zwei Rhythmusstreifen sind exemplarisch dargestellt (Abb. 19).

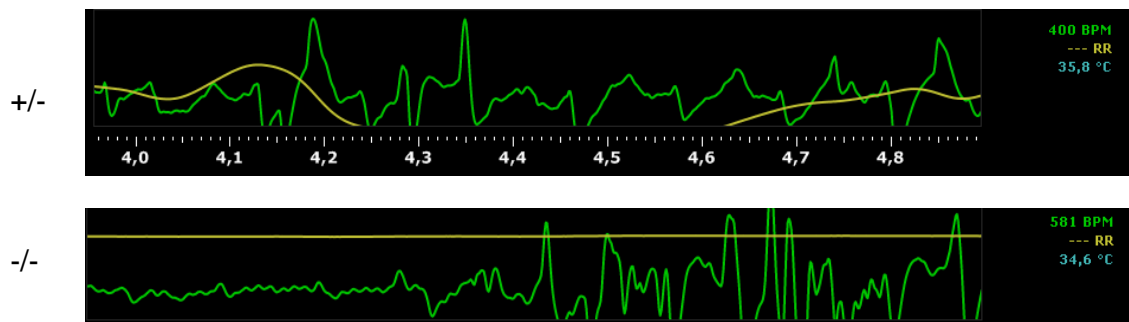


Abbildung 19: Elektrokardiographie - Exemplarische Rhythmusstreifen

4.3.6 Elektrokardiographie – Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wurde sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation bestimmt. Dabei war die Herzfrequenz der alten CSQ2^{-/-} Tiere vor Isoprenalingabe signifikant niedriger als die der CSQ2^{+/+} Tiere. Durch die β -adrenerge Stimulation stieg die Herzfrequenz bei CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} Tieren signifikant an. Bei den CSQ2^{+/+} Mäusen konnte unter Isoprenalinstimulation kein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz detektiert werden (Abb. 20).

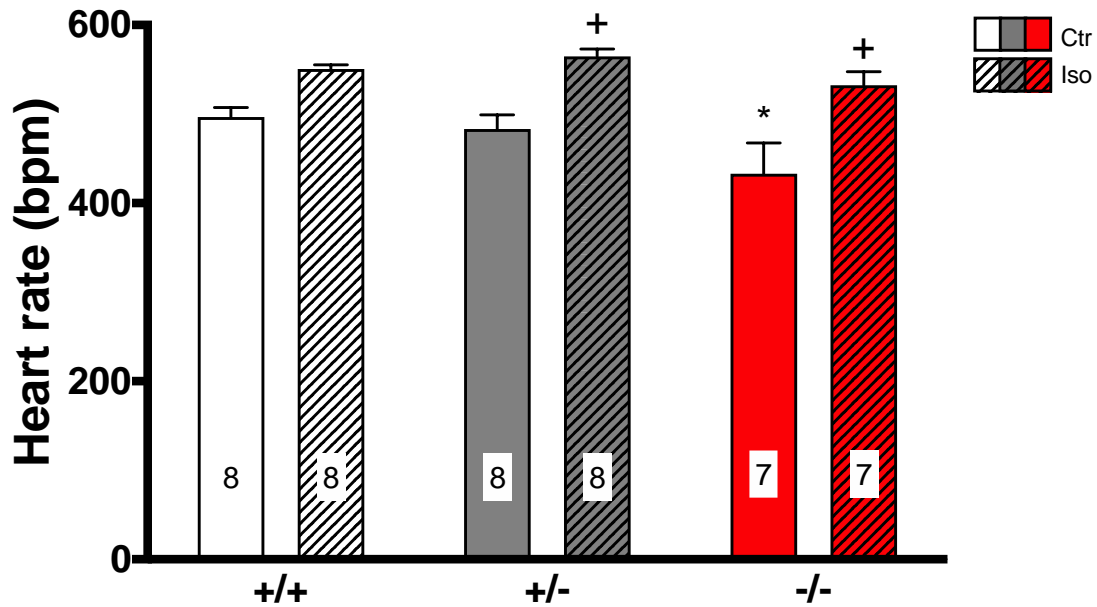


Abbildung 20: Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz der Gruppe Alt

Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz bei Mäusen der Gruppe Alt vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. bpm, Schläge pro Minute; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. +/+

Bei den jungen Tieren gab es hinsichtlich der Herzfrequenz keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Isoprenalin steigerte jedoch ausschließlich die Herzfrequenz der CSQ2^{+/-} und CSQ2^{-/-} signifikant (Abb. 21).

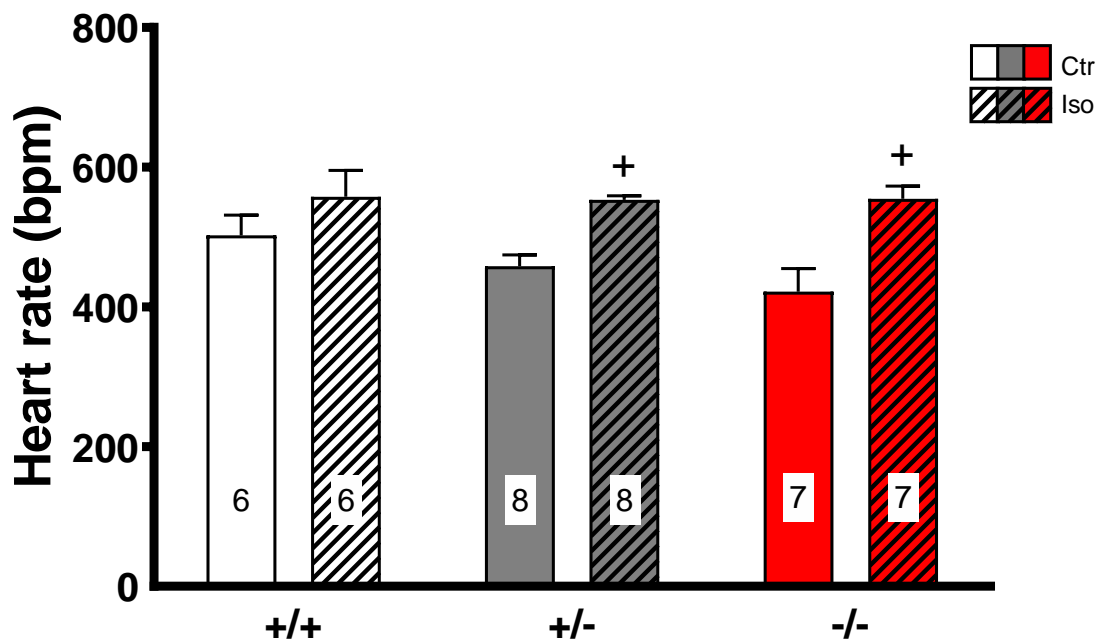


Abbildung 21: Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz der Gruppe Jung

*Elektrokardiographische Bestimmung der Herzfrequenz bei Mäusen der Gruppe Jung vor (Ctr) und nach (Iso) Injektion von Isoprenalin. bpm, Schläge pro Minute; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle*

4.3.7 Echokardiographie – Übersicht weiterer erhobener Parameter

Die zahlreichen Messwerte zur Charakterisierung der Herzfunktion in vivo wurden auf Unterschiede bzw. Übereinstimmungen im Zusammenhang mit den Genotypen, mit β -adrenerger Stimulation und mit dem Alter verglichen. Neben den präsentierten signifikanten Unterschieden zwischen den Genotypen der Gruppe Alt – bezüglich der Ejektionsfraktion (s. 4.3.1 Abb. 9-12), des LVESD (s. 4.3.2 Abb. 13), des Flusses in der Pulmonalarterie (s. 4.3.4 Abb. 18) und der Herzfrequenz (s. 4.3.6 Abb. 20) – bestanden Unterschiede hinsichtlich des Spitzenflusses in der Aorta descendens sowie der enddiastolisch gemessenen Septumdicke zwischen CSQ2+/+ und CSQ2+/- . Die gemessene Spitzengeschwindigkeit in der Aorta descendens war bei CSQ2+/+ Tieren nach der Injektion von Isoprenalin signifikant vermindert im Vergleich zu den Messungen bei CSQ2+/- Tieren. CSQ2+/- Mäuse hatten enddiastolisch gemessen ein signifikant dickeres Septum als CSQ2+/+ -Mäuse. Mit Zielsetzung der Analyse altersabhängiger Progression einer Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell wurden junge Mäuse echokardiographisch auf Insuffizienzen und sonstige Abweichungen untersucht. Bei den jungen Mäusen existierten ausschließlich vor der Injektion von Isoprenalin Unterschiede zwischen den Genotypen, und zwar zwischen CSQ2+/+ und CSQ2-/- hinsichtlich des gemessenen Spitzenflusses in der Pulmonalarterie sowie hinsichtlich der linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Diameter zwischen CSQ2+/+ und CSQ2+/- (Tab. 4).

Die Injektion von Isoprenalin bewirkte sowohl bei alten als auch bei jungen CSQ2+/+ eine signifikante Veränderung der Ejektionsfraktion und des LVESD, während nur die relative Herzfrequenz alter CSQ2+/+ auf Isoprenalin reagierte. Junge und alte CSQ2+/- reagierten auf Isoprenalininjektion mit einer Veränderung der Ejektionsfraktion, der Herzfrequenz, der linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Durchmesser. Alte CSQ2+/- zeigten auf Isoprenalin hin zudem Reaktionen des Spitzenflusses der Aorta descendens sowie der endsystolischen und enddiastolischen Septumdicke. Die CSQ2-/- beider Altersgruppen zeigten Reaktionen auf Isoprenalin hinsichtlich des Spitzenflusses in der Pulmonalarterie, der Herzfrequenz und des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers. Während sich zusätzlich die EF junger CSQ2-/- auf Isoprenalin hin veränderte, zeigten alte Mäuse weitere Veränderungen hinsichtlich des Spitzenflusses in der Aorta descendens und des linksventrikulären enddiastolischen Diameters auf (Tab. 4).

Zwischen den Altersgruppen der CSQ2+/+ gab es lediglich Veränderungen im VTI der Pulmonalarterie. Bei den CSQ2+/- veränderten sich mit dem Alter die EF vor Isoprenalininjektion sowie die enddiastolisch gemessene Septumdicke nach Isoprenalininjektion. Bei CSQ2-/- nahmen mit dem Alter unter basalen Bedingungen das VTI der Aorta descendens und der Pulmonalarterie ab, während sich unter stimulierten Bedingungen Veränderungen des Spitzenflusses der Aorta descendens, der EF und des LVESD auftraten (Tab. 4).

Tabelle 4: Echokardiographische Parameter

* $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ^ $p < 0,05$ vs. Jung je Genotyp

Echokardiographische Parameter	Alter	Stimulation	Genotyp						Anzahl (n)
			+/+		+/-		-/-		
			Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	
Aorta ascendens Spitzenfluss (mm/s)	Alt	Ktr	1161.99	59.92	1134.21	75.62	1072.01	32.97	8,8,7
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
	Jung	Ktr	1088.48	107.47	971.92	74.80	1000.79	86.58	6,7,6
		Iso	950.78	71.82	971.91	33.42	1086.07	0.00	3,5,1
Aorta ascendens VTI (mm)	Alt	Ktr	32.68	1.99	30.35	2.19	31.14	2.66	8,8,7
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
	Jung	Ktr	33.02	1.86	28.43	3.36	32.55	2.23	6,7,6
		Iso	28.78	3.24	29.00	2.44	30.18	0.00	3,5,1
Aorta descendens Spitzenfluss (mm/s)	Alt	Ktr	950.61	28.31	947.54	68.08	906.12	60.21	8,8,7
		Iso	1017.67	58.26	1449.50**	145.32	1144.29^	49.97	3,3,4
	Jung	Ktr	920.36	34.46	875.83	39.78	960.36	57.97	6,7,7
		Iso	x	x	1102.54	0.00	880.15	23.90	0,1,2
Aorta descendens VTI (mm)	Alt	Ktr	29.27	1.35	26.53	1.93	27.18^	1.30	8,8,7
		Iso	25.41	2.03	31.60	4.07	25.91	1.65	3,3,4
	Jung	Ktr	29.77	1.71	31.04	1.56	32.23	1.68	6,7,7
		Iso	x	x	41.25	0.00	28.09	0.98	0,1,2
Pulmonalarterie Spitzenfluss (mm/s)	Alt	Ktr	711.40	31.94	661.87	45.41	591.18	56.14	8,8,7
		Iso	845.89	57.70	792.12	62.65	879.39*	29.06	3,3,4
	Jung	Ktr	794.85	28.79	701.02	31.77	688.91*	32.29	6,7,7
		Iso	794.98	49.45	802.11	42.55	838.00*	34.40	6,7,7
Pulmonalarterie VTI (mm)	Alt	Ktr	25.79^	0.67	24.06	1.78	20.68*^	1.08	8,8,7
		Iso	22.20	2.54	21.79	1.73	23.89	0.85	3,3,4
	Jung	Ktr	29.92	1.08	28.88	1.58	26.30	1.10	6,7,7
		Iso	25.17	1.69	25.39	1.59	25.40	1.15	6,7,7
Mitralklappe E/A	Alt	Ktr	1.38	0.07	1.36	0.06	1.33	0.09	7,7,6
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
	Jung	Ktr	1.45	0.20	1.28	0.04	1.49	0.13	4,7,5
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
Mitralklappe/Gewebe E/E'	Alt	Ktr	23.00	1.98	25.86	3.85	31.60	7.16	7,7,6
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
	Jung	Ktr	39.00	10.40	32.86	8.76	28.20	5.72	3,7,5
		Iso	x	x	x	x	x	x	x
Gewebe E'/A'	Alt	Ktr	1.34	0.16	1.20	0.11	0.96	0.17	8,8,7
		Iso	1.18	0.11	1.09	0.12	1.20	0.23	8,8,7
	Jung	Ktr	1.24	0.19	0.89	0.11	1.01	0.10	5,8,6
		Iso	1.09	0.23	0.99	0.13	1.14	0.07	6,7,7
Ejektionsfraktion % von %	Alt	Ktr	100.00	2.60	100.00	2.81	100.00	6.82	8,8,7
		Iso	119.11*	2.13	133.72**^	4.59	117.30	6.99	8,8,7
	Jung	Ktr	100.00	2.35	100.00	2.30	100.00	5.57	6,8,7
		Iso	115.47*	3.75	120.49*	2.94	122.40*	6.69	6,8,7
Ejektionsfraktion	Alt	Ktr	76.46	1.99	68.55*^	1.93	62.51*	4.26	8,8,7
		Iso	90.82*	1.61	91.05*	1.61	71.75*#^	2.89	8,8,7
	Jung	Ktr	78.77	1.85	75.39	1.73	74.50	4.15	6,8,7
		Iso	90.75*	2.62	90.47*	1.08	89.51*	2.60	6,8,7
Herzfrequenz %	Alt	Ktr	100.00	1.97	100.00	3.09	100.00	7.41	8,8,7
		Iso	111.17*	2.29	117.87*	4.41	126.65*	7.56	8,8,7
	Jung	Ktr	100.00	5.31	100.00	3.36	100.00	7.28	6,8,7
		Iso	110.96	3.53	121.80*	3.99	136.26*	10.20	6,8,7
Herzfrequenz (BPM)	Alt	Ktr	496.72	9.79	483.15	14.93	432.90*	32.07	8,8,7
		Iso	550.56	4.41	564.67*	7.63	532.40*	14.17	8,8,7
	Jung	Ktr	502.26	26.66	458.16	15.37	421.65	30.68	6,8,7
		Iso	557.75	34.41	553.36*	5.37	554.81*	16.86	6,8,7
Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (mm)	Alt	Ktr	3.22	0.16	3.29	0.16	3.31	0.13	8,8,6
		Iso	2.78	0.12	2.61*	0.22	2.90*	0.10	6,8,6
	Jung	Ktr	2.99	0.11	3.41*	0.12	3.15	0.19	6,8,7
		Iso	2.54	0.21	2.96*	0.09	2.54	0.21	6,8,7
Linksventrikulärer endsystolischer Diameter (mm)	Alt	Ktr	1.62	0.05	2.10*	0.12	2.18*	0.13	6,8,7
		Iso	0.96*	0.09	1.03*	0.15	1.59*#^	0.11	6,8,7
	Jung	Ktr	1.63	0.07	1.95*	0.11	1.82	0.20	6,8,7
		Iso	0.95*	0.16	1.14*	0.05	1.05*	0.17	6,8,7
Septumdicke enddiastolisch (mm)	Alt	Ktr	1.29	0.13	1.29	0.14	1.25	0.14	8,8,7
		Iso	1.33	0.15	1.90**^	0.10	1.41	0.09	8,8,7
	Jung	Ktr	1.09	0.07	1.12	0.13	1.31	0.14	6,8,7
		Iso	1.21	0.05	1.21	0.09	1.47	0.13	6,8,7
Septumdicke endsystolisch (mm)	Alt	Ktr	1.87	0.14	1.70	0.11	1.72	0.15	8,8,7
		Iso	2.16	0.15	2.53*	0.23	2.01	0.09	8,8,7
	Jung	Ktr	1.73	0.07	1.69	0.13	1.83	0.13	6,8,7
		Iso	1.99	0.13	2.02	0.09	2.14	0.11	6,8,7

4.4 Herzfunktion in vitro

Die Vorhofpräparate wurden zur Charakterisierung der Vorhöfe der jungen CSQ2-Genotypen in einem Kontraktionsversuch untersucht. Dabei wurden die Kontraktionskraft der linken und die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe analysiert. Die Untersuchung erfolgte sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter 30-minütiger Hypoxie und anschließender Reoxygenierung.

Aufnahmen einer CSQ2^{-/-} sowie einer CSQ2^{+/+} Maus während eines Kontraktionsversuches können exemplarisch herangezogen werden. Die Phasen der Kontrolle, der 30-minütigen Hypoxie und der anschließenden Reoxygenierung sind gekennzeichnet. Der Übergang von Kontrolle zu 30-minütiger Hypoxie wird in der Abbildung zum Zeitpunkt 1 sowie an dem vertikalen grauen Strich und der Übergang von Hypoxie zu Reperfusion bzw. Reoxygenierung zum Zeitpunkt 2 sowie an dem weiteren vertikalen grauen Strich deutlich. Während sich die Vorhofkontraktionen der Genotypen vor der Hypoxiephase entsprachen, waren in der Phase der Hypoxie Unterschiede offensichtlich vorhanden. Der linke Vorhof der CSQ2^{+/+} Maus präsentierte sich mit einem Kurvenanstieg am Ende der Hypoxie. Der rechte Vorhof der CSQ2^{+/+} Maus wirkte während der Hypoxie stabiler. Bei allen gezeigten Vorhöfen war die Kontraktionskraft in der Reoxygenierungsphase geringer als in der Ausgangsphase und größer als in der Hypoxiephase (Abb. 22).

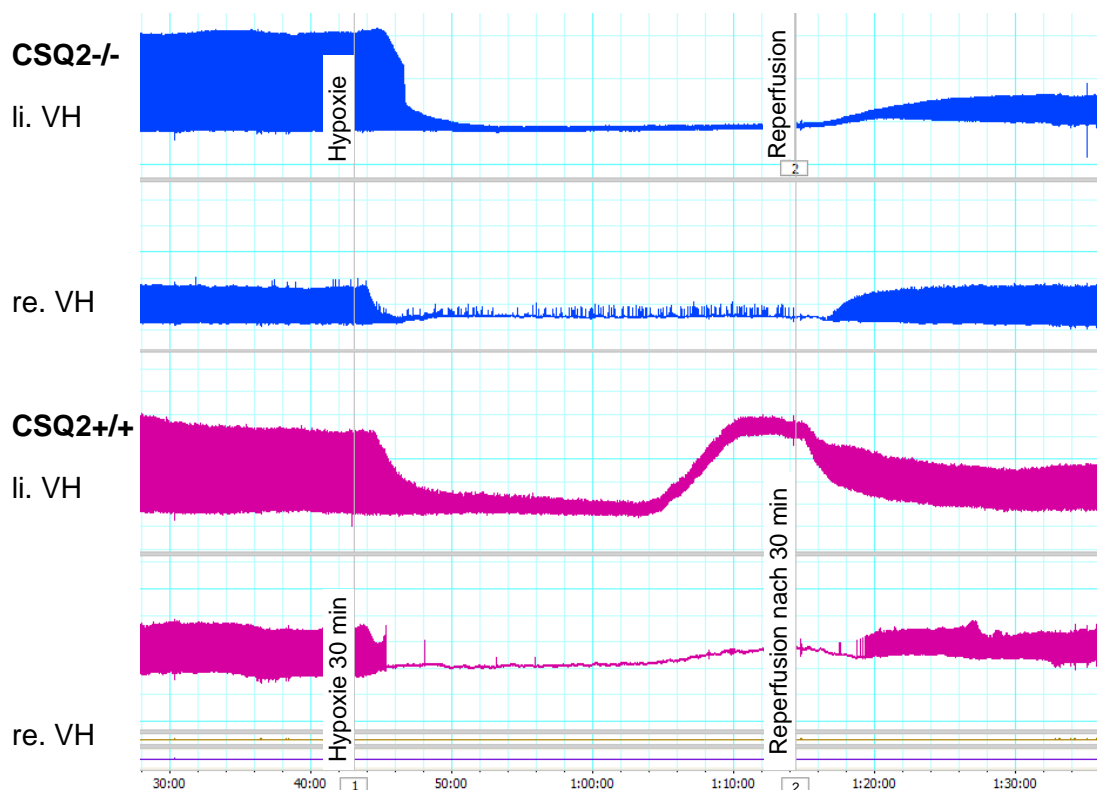


Abbildung 22: Repräsentative Kontraktionsversuche von CSQ2 ^{+/+} und CSQ2 ^{-/-}

4.4.1 Kontraktionskraft

Zur Beurteilung der Kontraktionskraft der linken Herzvorhöfe wurde die Differenz zwischen maximaler und minimaler Kontraktionskraft als Kontraktionskraft (Force) definiert und in den verschiedenen Versuchsphasen analysiert.

Bei CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} bewirkte die Hypoxie einen signifikanten Abfall der Kontraktionskraft, die sich auch in der Reoxygenierungsphase nicht vollständig erholte (Abb. 23). Die relative Kontraktionskraft der CSQ2^{-/-} war in der Hypoxiephase gegenüber den CSQ2^{+/+} signifikant vermindert (Tab. 5).

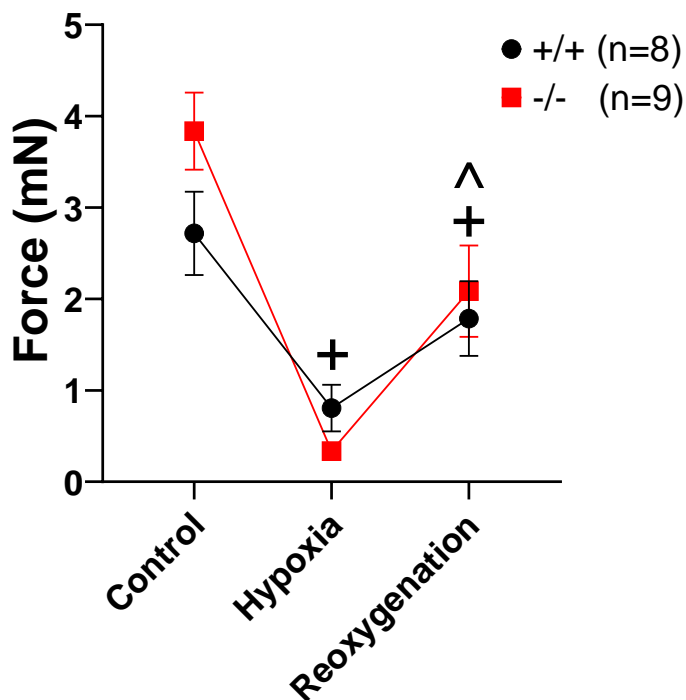


Abbildung 23: Kontraktionskraft elektrisch stimulierter linker Vorhöfe

Darstellung der Kontraktionskraft vor (Control), während (Hypoxia) und nach (Reoxygenation) 30-minütiger Hypoxie. + $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ^ $p < 0,05$ vs. Hypoxie

4.4.2 Vorhof Schlagfrequenz

Begleitend zur Aufzeichnung der Kontraktionskraft wurde die Schlagfrequenz erfasst, um einerseits die Reaktionen der rechten Vorhöfe auf die Hypoxie und andererseits mögliche Arrhythmien genauer zu untersuchen. Dabei wurde die Schlagfrequenz sowohl unter basalen Bedingungen als auch während und nach der Hypoxie bestimmt.

Mithilfe der Bestimmung der Schlagfrequenz sollte die Wirkung der Hypoxie samt folgender Reoxygenierung verdeutlicht werden. In der Hypoxie kommt es bei beiden Genotypen zu einem signifikanten Anstieg der Schlagfrequenz, die anschließend ebenso signifikant abfällt. In der Reoxygenierungsphase ist die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe der CSQ2^{-/-} zum Kontrollwert signifikant verringert, während sie bei den

CSQ2+/+ nahezu den Ausgangswert erreicht. Beim Vergleich der Schlagfrequenzen zwischen den Genotypen wird kein Unterschied deutlich (Abb. 24).

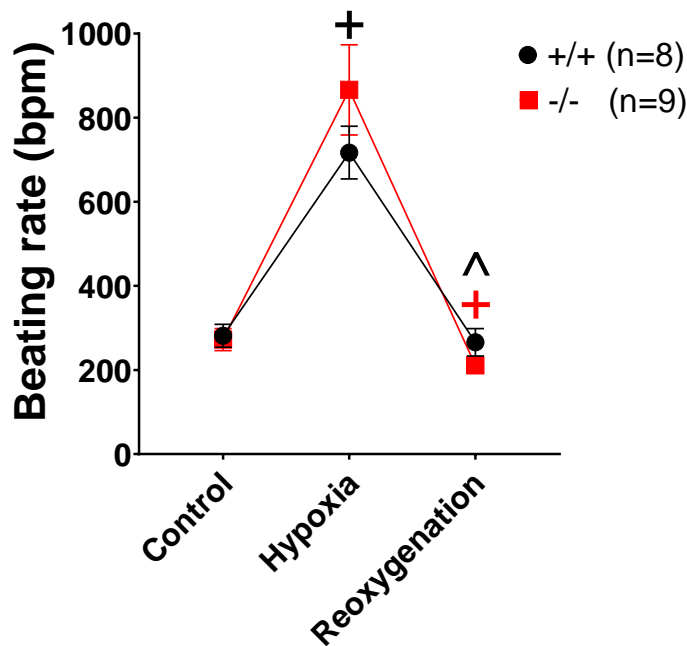


Abbildung 24: Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe

Darstellung der Schlagfrequenz der spontan schlagenden rechten Vorhöfe vor (Control), während (Hypoxia) und nach (Reoxygenation) 30-minütiger Hypoxie. + $p < 0,05$ vs. Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. Kontrolle -/- ; ^ $p < 0,05$ vs. Hypoxie

4.4.3 Weitere Parameter der Kontraktionsversuche

Sowohl die CSQ2+/+ als auch die CSQ2-/- zeigten in der Hypoxie- und in der Reoxygenierungsphase hinsichtlich vieler gemessener Parameter – Kontraktionskraft, T1, T2, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit – signifikante Veränderungen zu dem Ausgangswert in der Kontrollphase. Es gab darüber hinaus viele Unterschiede zwischen den Werten der Reoxygenierungs- und der Hypoxiephase. Das Verhalten der verschiedenen Genotypen ähnelte sich hier stark. Während Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in der Kontrollphase bei den -/- Tieren signifikant größer als bei den +/+ Tieren waren, zeigte sich die relative Kontraktionskraft der CSQ2-/- während der Hypoxie signifikant verringert zu jener der CSQ2+/+. Weitere Unterschiede traten zwischen den Genotypen nicht auf (Tab. 5).

Tabelle 5: Ergebnisse aus den Kontraktionsversuchen

+p<0,05 vs. Kontrolle; ^p<0,05 vs. Hypoxie; *p<0,05 vs. +/-

Genotyp	+/+			-/-		
	8			9		
Anzahl (n)	Kontrolle	Hypoxie	Reoxygenierung	Kontrolle	Hypoxie	Reoxygenierung
Experimentphasen						
Schlagfrequenz (%)	100 ± 0	278.35 ± 46.25 ⁺	94.24 ± 9.32 [^]	100 ± 0	365 ± 67.68 [*]	80.6 ± 5.66 [^]
Kraft Delta (%)	100 ± 0	28.07 ± 5.92 ⁺	63 ± 5.90 [^]	100 ± 0	10 ± 1.59 ⁺	52.1 ± 7.25 [^]
T1 (s)	15.06 ± 0.60	17.12 ± 1.08	15.48 ± 0.76	16.46 ± 0.69	16.64 ± 0.86	16.11 ± 0.57
T2 (s)	31.54 ± 2.20	39.80 ± 3.45 ⁺	29.44 ± 1.80 [^]	33.86 ± 1.75	41.99 ± 3.18 ⁺	29.99 ± 1.68 [^]
Kontraktionsgeschwindigkeit (mN/s)	137.66 ± 20.40	34.77 ± 10.24 ⁺	87.77 ± 17.34 [^]	211.07 ± 19.97 [*]	17.21 ± 2.89 ⁺	140.04 ± 22.11 [^]
Relaxationsgeschwindigkeit (mN/s)	79.91 ± 12.41	20.15 ± 5.40 ⁺	52.72 ± 8.97 [^]	117.63 ± 10.87 [*]	11.61 ± 1.76 ⁺	106.09 ± 26.07 [^]

Die Kontrollen sind jeweils der Ausgangswert und somit hinsichtlich der relativen Parameter der Schlagfrequenz und Kontraktionskraft als 100% definiert. Davon ausgehend wird die signifikante relative Veränderung während der Hypoxie und Reoxygenierung ersichtlich. Signifikante Unterschiede zu der jeweiligen Kontrolle existierten bei der CSQ2+/+ und der CSQ2-/- Gruppe in der Hypoxiephase bezüglich der Schlagfrequenz, Kontraktionskraft, T2, Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeit. Bei beiden Gruppen fanden sich signifikante Unterschiede im Vergleich der Reoxygenierungsphase zur Kontrollphase bezüglich Kontraktionskraft und Kontraktionsgeschwindigkeit – bei der CSQ2+/+ Gruppe zudem bezüglich Relaxationsgeschwindigkeit sowie bei den CSQ2-/- zusätzlich im Hinblick auf Schlagfrequenz und T2. Weitere signifikante Differenzen taten sich im Vergleich der Reoxygenierungsphase zur Hypoxiephase bei beiden Genotypen bezüglich Schlagfrequenz, Kontraktionskraft, T2, Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeit auf. In der Kontrollphase waren Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der CSQ2-/- signifikant größer als bei den CSQ2+/+. Die relative Kontraktionskraft der CSQ2-/- war während der Hypoxie gegenüber jener der CSQ2+/+ signifikant vermindert.

4.5 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (FACS) wurde eine mögliche Autoimmunreaktion des Körpers auf myokardiales Gewebe untersucht, welche für die altersabhängige Entwicklung einer Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell verantwortlich sein könnte. Bei der Durchflusszytometrie lag der Fokus auf der Analyse von Immunzellen in herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten, im Herzen selbst, in der Milz und in subiliakalen Lymphknoten. Exemplarisch dargestellt ist das Gating auf T-Zellen. Dazu wurden zuerst die Singlets bestimmt, anschließend die Lymphozyten ermittelt und darauf T-Zell-Rezeptor-β-positive Zellen als T-Zellen definiert (Abb. 25).

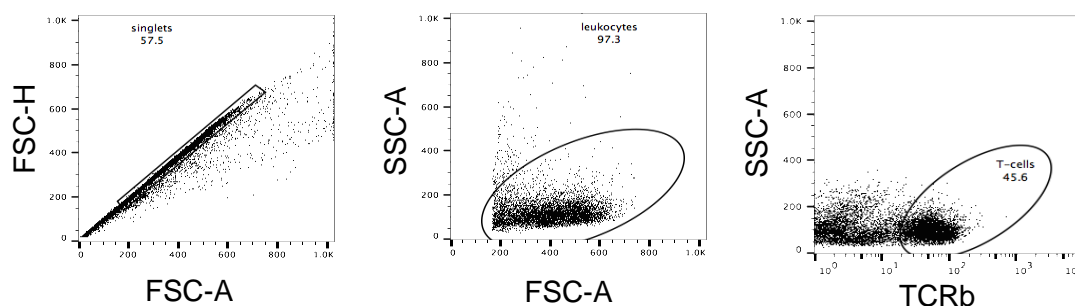


Abbildung 25: Gating auf T-Zellen

Die herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten wurden auf die totale Zellanzahl, auf die Frequenz an CD44⁺ CD8⁺, CD44⁺ CD4⁺ und CD62L⁺ CD4⁺ T-Zellen sowie auf die Frequenz an CD19⁺ und CD80⁺/CD86⁺ CD19⁺ B-Zellen hin untersucht. Diesbezüglich wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen eruiert. In den herzdrainierenden Lymphknoten sind dennoch Tendenzen hin zu einer größeren Häufigkeit an B-Zellen bei den CSQ2^{-/-} zu erkennen. Es gibt darüber hinaus signifikante Unterschiede zwischen der alten und jungen Altersgruppe der CSQ2^{+/+} bzgl. der Frequenz an CD44⁺ CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen (Abb. 26).

Mediastinale Lymphknoten

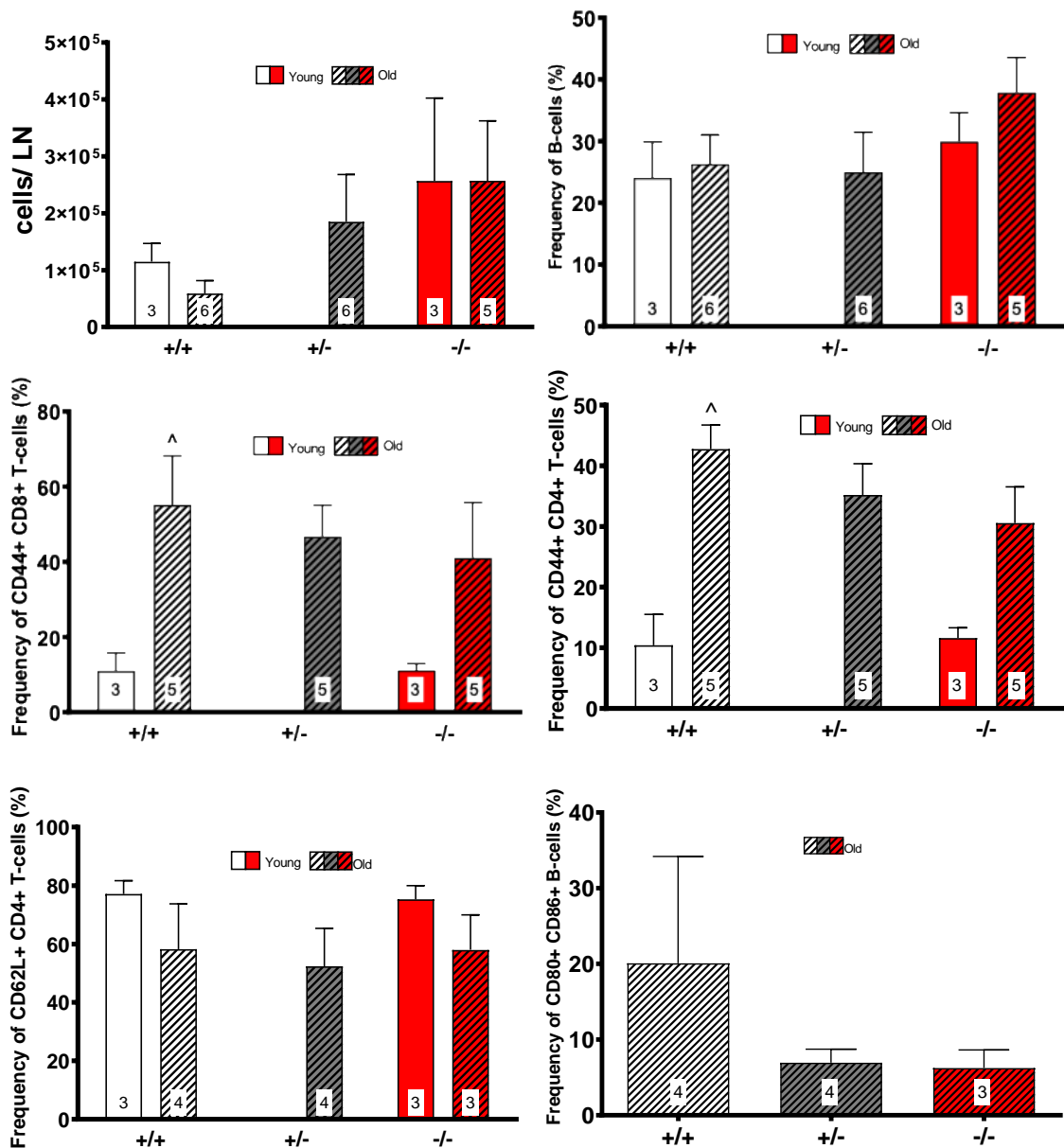


Abbildung 26: FACS Ergebnisse der mediastinalen Lymphknoten

Abgebildet sind die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie von Zellen aus den mediastinalen Lymphknoten. [^]p<0,05 vs. Jung je Genotyp

Die Häufigkeit von CD45⁺-Zellen bzw. Leukozyten sowie B- und T-Zellen im Herzen weist keine Unterschiede zwischen den Genotypen gleicher Altersklasse auf. Die B-Zell-Frequenz der alten CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} war jeweils signifikant niedriger als die der jungen Gruppe. Darüber hinaus war die T-Zell-Frequenz bei alten CSQ2^{+/+} signifikant geringer als bei der jungen Vergleichsgruppe (Abb. 27).

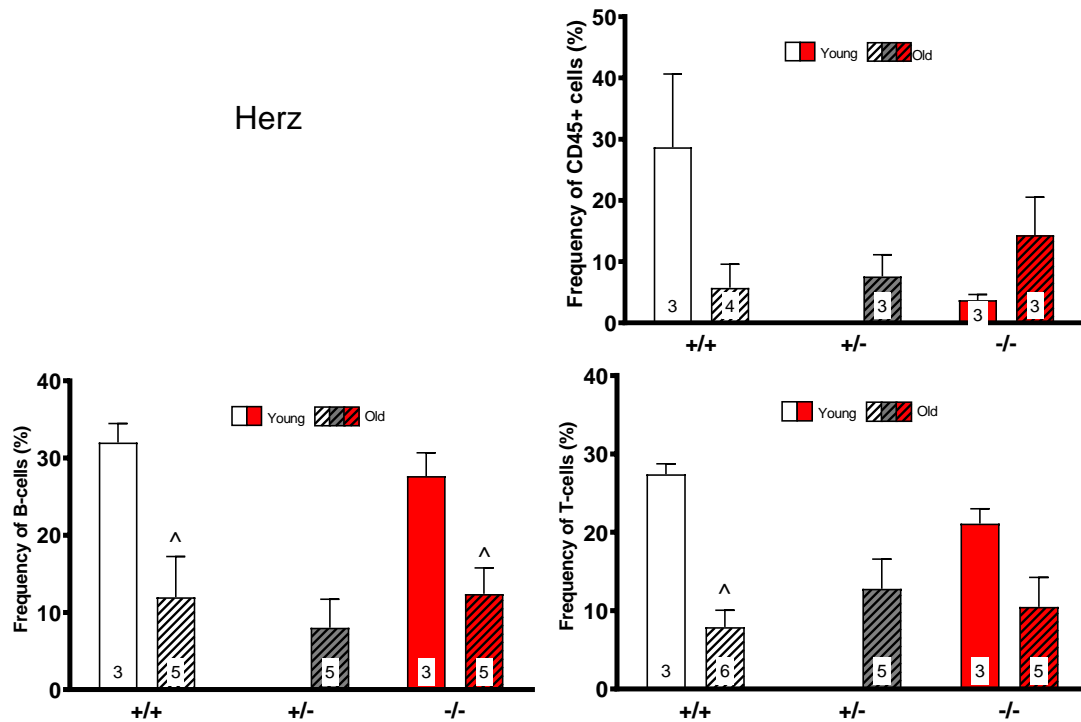


Abbildung 27: FACS Ergebnisse der Herzen

Abgebildet sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von CD45⁺-, B- und T-Zellen aus dem Herzen. ^ $p < 0,05$ vs. Jung je Genotyp

4.6 Immunfluoreszenz-Histologie

Ein weiteres Instrumentarium, welches zur Erforschung von Autoimmunphänomenen genutzt wurde, war die Immunfluoreszenz-Histologie. Wie beschrieben (s. 3.9.1), wurde das Vorhandensein von gegen myokardiales Gewebe gerichteten Immunglobulinen G, Immunglobulinen M und anti-DNA-Antikörpern im Serum der verschiedenen Genotypen untersucht.

Beispielhaft sind Aufnahmen der immunfluoreszierenden Histologie auf IgG-, IgM-Antikörper sowie auf DNA einer +/+ sowie einer -/- Maus abgebildet. Es sind hier keine Differenzen ersichtlich (Abb. 28).

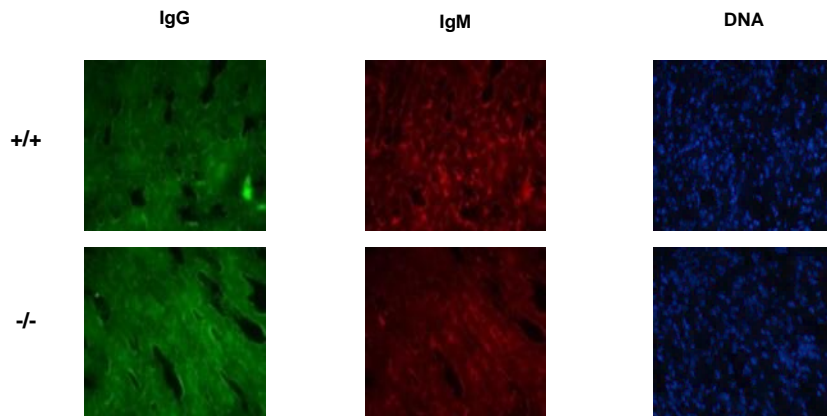


Abbildung 28: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Herzpräparationen

Es sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Herzpräparationen alter CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} Mäuse präsentiert.

Wie vorher beschrieben (s. 3.9.1, 3.10), wurden die Immunfluoreszenz-Signale statistisch ausgewertet. Weder zwischen den Genotypen der alten noch der jungen Mäuse wurden Unterschiede detektiert. Auch zwischen den Ergebnissen der alten und denen der jungen Tiere gab es keine signifikanten Unterschiede. Dagegen bestanden signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle bei der Analyse der anti-Immunglobuline M der alten und jungen Tiere aller Genotypen, bei der Analyse der anti-Immunglobuline G der alten Tiere aller Genotypen und der jungen CSQ2^{+/-} und CSQ2^{-/-} sowie bei der Analyse des DAPI der CSQ2^{+/+} (Tab. 6).

Tabelle 6: Immunfluoreszenz-Signale

+*p*<0,05 vs. Negativkontrolle

Monoklonale Antikörper	Alter	Immunfluoreszenz-Signale								Anzahl (n)
		+/+		+/-		-/-		Negativkontrolle		
		Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	
anti-IgM	Alt	34057 ⁺	5158	39039 ⁺	9427	29300 ⁺	4565	8036	625	6,5,5;4
	Jung	22455 ⁺	4457	13149 ⁺	1223	18800 ⁺	2878			3,4,5;4
anti-IgG	Alt	26923 ⁺	2559	25094 ⁺	1097	25192 ⁺	2409	14469	1234	6,5,5;4
	Jung	19808	3066	21769 ⁺	1555	25407 ⁺	1339			3,4,5;4
DAPI	Alt	67490	9090	72853	16004	63082	10702	49149	8934	6,5,5;4
	Jung	91735 ⁺	6582	81578	10872	76384	12454			3,3,5;4

4.7 Panamá-Blot

Auch mit Hilfe des Panamá-Blots als weitere Methode zur Analyse verschiedener Immunglobulin-Klassen wurde das Ziel verfolgt, Autoimmunphänomene gegen myokardiales Gewebe nachzuweisen. Dabei lag der Fokus auf der Analyse der Immunglobuline IgM und IgG im Serum. Die untersuchten Tiere waren der Gruppe der alten Mäuse zuzuordnen. Bei der computerassistierten Auswertung der mittels Panamá Blot durchgeführten Autoantikörperanalysen auf die Immunantikörper IgM sowie IgG konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden. Somit wurden keine IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen körpereigene Strukturen gefunden (Abb. 29).



Abbildung 29: Panamá-Blot auf IgM-Antikörper

Zu sehen ist der Ausschnitt aus einem Panamá-Blot auf IgM-Antikörper mit je einer Säule einer +/+, einer -/- und einer +/- Maus. Die Banden weisen keine Abweichungen untereinander auf.

4.8 Histologie

Um die Herzen auf Fibrose zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte genutzt, die mit Masson-Goldner-Trichrom angefärbt wurden. CSQ2^{-/-} Herzen circa 18 Monate alter Mäuse boten deutliche Zeichen einer Fibrose dar, während CSQ2^{+/+} Herzen der Geschwistertiere keine derartigen Veränderungen aufwiesen (Abb. 30).

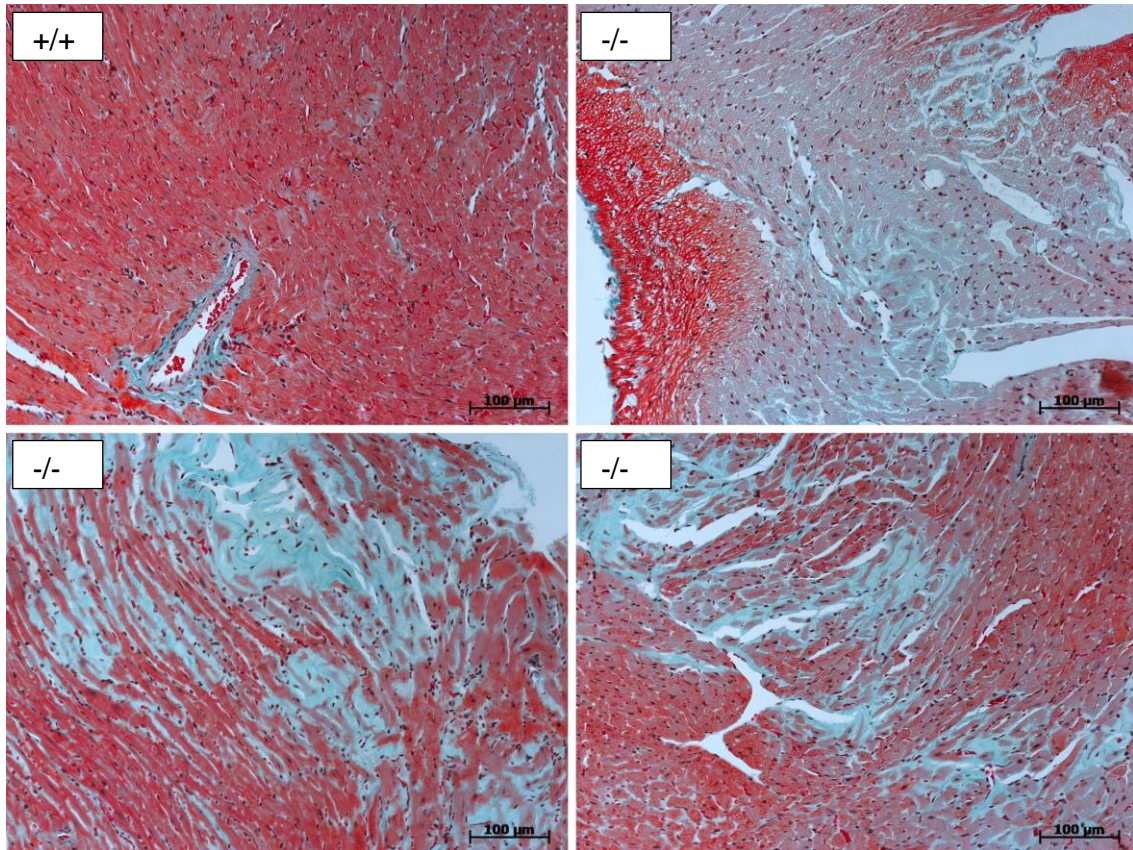


Abbildung 30: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung von Herzpräparationen

Bei der Darstellung histologischer Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen der Gewebeschnitte von circa 18 Monate alten CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} Herzen erscheinen Zellkerne dunkelbraun bis schwarz, Zytoplasma und Muskulatur rot sowie kollagenes Bindegewebe grün.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden nachfolgend kritisch interpretiert und vergleichend mit der vorhandenen Literatur diskutiert, um den Kenntnisstand über Calsequestrin zu erweitern.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Echokardiographie

Echokardiographie bei Mäusen ist eine seit mehr als zwei Jahrzehnten in der Forschung eingesetzte, etablierte Methode, um insbesondere linksventrikuläre Veränderungen, aber auch Klappenveränderungen und Flüsse in den großen Gefäßen in einem transgenen Mausmodell zu untersuchen (Tanaka et al. 1996, Phoon et al. 2016). Schon früh ist eine exzellente Inter- und Intraobserver-Variabilität hinsichtlich der linksventrikulären Durchmesser, der linksventrikulären Pumpfunktion sowie Doppler-basierter Variablen konstatiert worden (Hoit et al. 1995). Während die Methode speziell im Hinblick auf die Anforderungen bezüglich der geringen Größe der Mäuse dank technologischer Fortschritte verlässlicher geworden ist (Bollmann et al. 2020), bestehen dennoch Einschränkungen hinsichtlich der Reliabilität, weil diese im besonderen Maße abhängig ist von Fähigkeit und Erfahrung des Untersuchenden und von der Durchführung der Anästhesie (Liu et al. 2009). Im Vergleich zu konventionellen echokardiographischen Messungen stellt das Speckle Tracking Imaging ein relativ neues Verfahren dar, dessen Reliabilität und Validität Diskussionen unterliegen (Phoon et al. 2016). Nichtsdestotrotz können bei akkurater Durchführung mittels des Speckle Tracking Imaging bereits früher geringe altersabhängige Veränderungen kardialer Funktionen festgestellt werden, als dies mit konventionellen Messungen möglich ist (de Lucia et al. 2019).

Um die Reliabilität der echokardiographischen Untersuchungen dieser Dissertation auf einem hohen Standard zu halten, wurden alle ultraschallbasierten Versuche inklusive der Anästhesie nach festem Protokoll von demselben Untersucher durchgeführt, welcher vor Beginn der Versuchsreihe entsprechend geschult worden war.

5.1.2 Immunfluoreszenz

Um valide Ergebnisse hinsichtlich der Intensität der Fluoreszenz erzielen zu können, müssen die Aufnahmen mit gleicher Belichtungszeit je Probe angefertigt werden. Zudem sollten sie zeitnah nach Erstellung der Präparate durchgeführt werden (Schauenstein et al. 1975). Zur Messung der Intensitäten wurden die digitalisierten Aufnahmen und das Programm ImageJ verwendet. Hier wurden nach Umwandlung der Aufnahmen in Graustufen je Präparat 3 Ausschnitte festgelegter Größe (z.B. 90x90) manuell ausgewählt, deren mittlerer Grauwert sowie eine Standardabweichung ermittelt und der jeweilige Mittelwert errechnet. Der Einsatz automatisierter Interpretations- bzw. Auswertesysteme könnte hier zur Standardisierung beitragen (Melegari et al. 2012).

5.2 Diskussion des Tiermodells

Als Genkonstrukt wurden ein Knock-Out der codierenden Region auf Exon 1 und die Insertion von Stopp Codons genutzt ((Gergs et al. 2017a), s. 3.1). Für den Knock-Out wurde dabei ein loxP-Cre-Rekombinationssystem in embryonalen Stammzellen eingesetzt, welches im Allgemeinen als ideal für die Gentechnologie von Zellen und Tiermodellen gelte. Dennoch sei darauf hingewiesen, dass beispielsweise das kardial-spezifische α -MHC Cre altersabhängig dilatative Kardiomyopathien in anderen Mausmodellen verursache (Rehmani et al. 2019). Auch wenn Derartiges bisher nicht für das für die vorliegende Untersuchung verwendete loxP-Cre-Rekombinationssystem beschrieben worden ist, sollten das eingesetzte Genkonstrukt weiterhin kritisch betrachtet und ggf. Forschungen in diese Richtung angestrebt werden. Mithilfe klassischer Methoden gelang es eine heterozygote Maus zu kreieren, deren Abkömmlinge in all unseren nachfolgenden Studien untersucht wurden. Wie angestrebt, konnten anschließend Versuche mit CSQ2+/+, CSQ2+/- und CSQ2-/- Mäusen – mittels Genotypisierung bestätigt (s. 3.1) – durchgeführt werden. Die Mäuse wurden eingeteilt in die Gruppe Alt und Jung. Wie angestrebt, waren die Mäuse der Gruppe Alt je Genotyp signifikant älter als die der Gruppe Jung (s. 4.2). Das garantierte eine klare Trennung und in der Folge eine aussagekräftige Auswertung innerhalb der Gruppen ineinander und der Gruppen zueinander. Mit der Einbeziehung verschiedener Altersgruppen sollte der Einfluss des Alters und des Alterns auf die CSQ2 Genotypen tiefergehend beleuchtet werden, wie es für andere Mausmodelle berichtet worden ist (Kirchhefer et al. 2004, Unsold et al. 2012). Walford (1976) konstatierte diesbezüglich allerdings, dass Tiere erst ab dem 50%-igen Überlebenspunkt für Experimente, die Altern betreffen, verwendet werden sollten. Soweit dies der Versuchsaufbau inklusive der verfügbaren Fallzahlen erlaubte, wurden die Mäuse zudem geschlechtsspezifisch in männliche und weibliche Gruppen eingeteilt. Diesem Ansatz lag das Ziel zugrunde, die Auswirkungen des Geschlechts auf die verschiedenen CSQ2 Genotypen zu erforschen. Dieser Ansatz gründete insbesondere auf der zunehmenden Bedeutung der Gender Studies infolge gesellschaftlicher Veränderungen (Swazina et al. 2004, Holdcroft 2007) sowie auf festgestelltem Effekt des Geschlechts auf Kardiomyopathien (Biagini et al. 2012). Im Hinblick auf hypertrophe Kardiomyopathien gebe es geschlechtsspezifische Unterschiede in der klinischen Präsentation, Progression und im Behandlungsergebnis. So seien Frauen bei der Erstdiagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie älter und präsentierten im Verlauf eine schwerere kardiale Dysfunktion als Männer (van Driel et al. 2019).

5.2.1 Western Blot

Entsprechend der Annahme, dass die Deletion des Exon 1 und die Einführung von Stopp-Codons die Herstellung von CSQ2-Proteinen verhinderten, konnte mithilfe des Western Blots von homogenisierten Herzproben und von Skelettmuskulatur nachgewiesen werden, dass in den CSQ2-/- Mäusen kein CSQ2 exprimiert wurde (s. 1.2 Abb. 2; 4.1 Abb. 7). Die CSQ2-/- Mäuse waren dennoch lebens- und fortpflanzungsfähig. Diese Erkenntnisse deckten sich mit der vorhandenen Literatur

(Knollmann et al. 2006, Song et al. 2007). Im Gegensatz zu den CSQ2^{-/-} Tieren exprimierten die CSQ2^{+/-} Mäuse noch etwa 80% der von den CSQ2^{+/+} exprimierten CSQ2-Proteinmenge (Knollmann et al. 2006, Gergs et al. 2017a).

5.3 CSQ2-defizientes Mausmodell

Im Fokus steht die Erforschung der Fragestellung, ob die altersabhängige Entwicklung einer Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell mit Autoimmunphänomenen gegen myokardiales Gewebe einhergeht. Insbesondere ist zu prüfen, ob diese schon vor der Entwicklung eines myokardialen Phänotyps auftreten.

5.3.1 Interpretation der morphometrischen Daten

Bei keiner unserer Gruppen wurden Unterschiede im relativen Gewicht der Leber, der Milz und der Nieren festgestellt. Hingegen war das relative Lungengewicht der jungen männlichen CSQ2^{+/-} Mäuse gegenüber den CSQ2^{+/+} erhöht, während es bei den alten CSQ2^{-/-} weiblichen Mäusen signifikant niedriger als bei den korrespondierenden jungen Mäusen war (s. 4.2. Tab. 2). Während das unveränderte relative Lebergewicht mit den bekannten Daten übereinstimmt, stehen das im Vergleich zu den anderen Genotypen unveränderte relative Lungengewicht der CSQ2^{-/-} sowie das erhöhte relative Lungengewicht der jungen CSQ2^{+/-} im Gegensatz zu dem vorherbeschriebenen erhöhten relativen Lungengewicht der CSQ2^{-/-} (Gergs et al. 2017a). Die Abnahme des relativen Lungengewichts der CSQ2^{-/-} weiblichen Mäuse mit dem Alter ist eine neue Beobachtung. Einhergehend mit unseren Erwartungen einer altersabhängigen Entwicklung einer kardialen Hypertrophie zeigt das Herzgewicht, das als Parameter der kardialen Hypertrophie verwendet werden kann (Linzbach 1948), eine Gewichtszunahme der CSQ2^{-/-} Knock-Out Präparate der älteren männlichen und weiblichen sowie der jungen männlichen Tiere im Vergleich zu den anderen Genotypen auf. Im Alter ist das absolute Herzgewicht der männlichen Tiere aller Genotypen sowie der weiblichen CSQ2^{-/-} höher als jeweils das der jüngeren Gruppe. Signifikante Abweichungen im relativen Herzgewicht wurden nicht entdeckt, obwohl ein Anstieg des relativen Herzgewichts der Knock-Out Mäuse zu erwarten war (Knollmann et al. 2006, Faggioni et al. 2012b). Das Körpergewicht der CSQ2^{-/-} alten weiblichen Mäuse ist signifikant größer als das der CSQ2^{+/-} und der jüngeren CSQ2^{-/-} Vergleichsgruppe (s. 4.2 Tab. 1). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem vorherbeschriebenen reduzierten Körpergewicht der CSQ2^{-/-} Mäuse zu dem der CSQ2^{+/+} (Gergs et al. 2017a).

Die Unterschiede zu den Ergebnissen aus der Arbeit von Gergs et al. (2017a) sind kritisch zu hinterfragen, da das gleiche Tiermodell verwendet und das Alter von 6-8 Monaten in unserer Gruppe Jung miteingefasst wurde. Dennoch ist zu bedenken, dass die Gruppe Jung zwar das Alter von 6-8 Monaten miteingefasst, der Altersdurchschnitt aber weitaus niedriger liegt. Unsere Gruppe Alt hat einen höheren Altersdurchschnitt als die bei Gergs, Fahrion et al. angegebene Gruppe mit einem Altersdurchschnitt von 6-8 Monaten, was Unterschiede zwischen unserer Gruppe Alt und der verglichenen Studiengruppe bedingen könnte. Somit könnten die beschriebenen Abweichungen mit

verschiedenen Progressionsstufen im Alterungsprozess CSQ2-defizienter Mäuse zusammenhängen (Walford 1976), was weiterer Forschung bedarf.

5.3.2 Interpretation der Histologie

Myokardfibrose ist laut einem Komitee der European Society of Cardiology im weitesten Sinne definiert als endogene, suboptimale Reparaturantwort des versagenden Herzens, die durch exzessive Akkumulation von extrazellulärer Matrix strukturelle Unterstützung bieten kann, während Kardiomyozyten ohne adäquaten Ersatz durch neue funktionsfähige Kardiomyozyten verloren gehen (de Boer et al. 2019). Die von uns gezeigten Gewebeschnitte (s. 4.8 Abb. 30) von circa 18 Monate alten CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} Mäusen lassen dabei mithilfe der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung zu, eine Fibrose der CSQ2^{-/-} Herzen bei strukturell normalen CSQ2^{+/+} Herzen zu diagnostizieren. Nichtsdestotrotz sind bisher keine Myokardfibrosen im Zusammenhang mit CSQ2-Deletionen, sondern stattdessen lediglich geringe strukturelle Veränderungen an Herzen beschrieben worden (Rossi et al. 2020). Ungeachtet dessen schilderten Glukhov et al. (2015) bereits, dass CSQ2^{-/-} Mäuse vermehrt fibrotisches Gewebe exklusiv im Schrittmacherkomplex sowie eine atriale Hypertrophie im Alter von 3 und 12 Monaten aufwiesen. Darüber hinaus führe CSQ2-Defizienz im Alterungsprozess zu mäßiger Kardiomyopathie, die bereits bei 12 Monate alten CSQ2-defizienten Herzen festgestellt worden sei (Glukhov et al. 2015). Bei der Bewertung sei miteinzubeziehen, dass Altern einerseits generell als relevanter Treiber der Myokardfibrose gelte und andererseits, dass die altersabhängige Fibrose gleichzeitig mit jener Fibrose auftrete, die eine Antwort auf kardiale Schäden sei, was wiederum die Differenzierung und Charakterisierung der altersabhängigen Fibrose erschwere (de Boer et al. 2019). In Zusammenhang mit Kardiomyopathien werde Myokardfibrose im Allgemeinen durch verschiedene Vorgänge wie metabolische Störungen, neurohormonale Aktivierung, Zelltod und direkte toxische Effekte mutierter Proteine ausgelöst (de Boer et al. 2019). Neben der hier festgestellten Myokardfibrose bei CSQ2 Knock-Out Mäusen ist bekannt, dass auch Mäuse mit CSQ2-Überexpression, welche kardiale Hypertrophie, biventrikuläre Dilatation, Herzinsuffizienz und eine nur 40%-ige Überlebensrate im Alter von 6 Monaten entwickeln, interstitielle Fibrose und Gewebekalzifikation präsentieren (Knollmann et al. 2000).

5.3.3 Interpretation der Herzfunktion in vivo

Da die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung der CSQ2-Deletion auf die Herzfunktion in vivo Unterschiede offenbaren, wurde ein wesentlicher Teil dieser Arbeit der genaueren Erforschung der in-vivo-Funktion gewidmet.

Mithilfe der konventionellen Echokardiographie konnte die altersabhängige Entwicklung einer reduzierten systolischen Herzfunktion im CSQ2-defizienten Mausmodell abgeleitet werden. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse ähneln jener von Song et al. (2007). Sie berichteten, bei 15 Wochen alten Mäusen echokardiographisch keine strukturellen oder funktionellen Defizite diagnostiziert zu haben, während die CSQ2^{-/-} Mäuse im Alter von 35 Wochen mit linksventrikulärer Hypertrophie und reduzierter Ejektionsfraktion im

Vergleich zu der CSQ2+/+ Gruppe imponierten. Die Gruppe der jungen CSQ2-/- Mäuse wies in unseren Experimenten in den konventionellen Messungen keine strukturellen Defizite, jedoch einen reduzierten Spitzenfluss in der Pulmonalarterie auf (s. 4.3.7 Tab. 4). Der reduzierte Spitzenfluss in der Pulmonalarterie junger CSQ2 Knock-Out Mäuse ist hier zum ersten Mal festgestellt worden, während sich die übrigen Ergebnisse mit den bekannten Daten decken (Knollmann et al. 2006, Gergs et al. 2017a). In der Analyse des Speckle Tracking Imaging zeigte sich bereits eine Abnahme in der longitudinalen Verformung sowie in der Verformungsgeschwindigkeit des Segmentes „Posterior Mitte“ der CSQ2-/- Mäuse gegenüber den CSQ2+/+ Mäusen. Dies lässt darauf schließen, dass die CSQ2-Deletion bereits geringe kardiale funktionelle Defizite bei jungen Individuen bewirkt, die allerdings erst jetzt aufgrund der erzielten Fortschritte des echokardiographischen Verfahrens aufgedeckt werden können (Leitman et al. 2004, Notomi et al. 2005). Sowohl die CSQ2+/+ als auch die CSQ2-/- zeigten beim Vergleich der Altersgruppen Abweichungen in der Verformung spezifischer Segmente auf, wobei die CSQ2-/- zudem eine veränderte Verformungsgeschwindigkeit präsentierten (s. 4.3.3 Tab. 3). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Ergebnisse des Speckle Tracking Imaging (STI) besonders kritisch zu betrachten sind. Da bei den konventionellen echokardiographischen Messungen Unterschiede zwischen den alten Genotypen festgestellt werden konnten, wurden ähnliche Ergebnisse im STI, welches als sensitives Verfahren zur Detektion kardialer Dysfunktion gilt, erwartet (Peng et al. 2009). Hinsichtlich STI bestehen allerdings auch Bedenken, die insbesondere auf verzerrten Daten für die Berechnungen und deren Konsequenzen infolge nicht idealer Aufzeichnungen basieren (Phoon et al. 2016). Hierin könnte die Ursache unserer STI Ergebnisse liegen, die wider Erwarten keine Unterschiede zwischen den Genotypen der alten, dafür jedoch Unterschiede bei den jungen Mäusen zeigten (s. 4.3.3 Tab. 3).

In der Gruppe der alten Mäuse wurde eine reduzierte Ejektionsfraktion der Knock-Out Mäuse gegenüber den CSQ2+/+-Mäusen beschrieben, die sich unter Isoprenalininjektion bestätigte (s. 4.3.1 Abb. 9). Diese Ergebnisse stehen einerseits im Einklang mit denen von Song et al. (2007) sowie andererseits im Widerspruch zu denen von Gergs et al. (2017a), die Unterschiede zwischen den Genotypen verneinen. Wird nun die Entwicklung der EF nach Isoprenalininjektion im Alterungsprozess betrachtet, so ist festzustellen, dass ausschließlich die EF der CSQ2-/- abgenommen hat (s. 4.3.1 Abb. 10).

Ferner wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des Geschlechtes auf die Ejektionsfraktion des jeweiligen Genotyps im Alter weitergehend analysiert (s. 4.3.1 Abb. 11, 12). Bei den alten weiblichen Mäusen bewirkt Isoprenalin lediglich bei CSQ2+/+ Exemplaren einen signifikanten Anstieg der Ejektionsfraktion. Zudem ist die Ejektionsfraktion der weiblichen CSQ2-/- erst nach Isoprenalininjektion gegenüber den restlichen Genotypen vermindert. Hingegen reagieren alle Genotypen der alten männlichen Mäuse auf Isoprenalin mit einer Steigerung der Ejektionsfraktion. Die EF der CSQ2-/- ist zu den anderen Genotypen verringert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein CSQ2 Knock-Out die kardiale Funktion beider Geschlechter einschränkt. Diese Einschränkung scheint bei den männlichen Tieren stärker zu sein, da sie sich bereits in Ruhe manifestiert.

Ein Gegenstand aktueller Forschung ist zudem der Einfluss adrenerger Stimulation auf geschlechtsspezifische Unterschiede. Es wird angenommen, dass adrenerge Stimulation stärkere Auswirkungen auf die Inotropie bei männlichen als bei weiblichen Individuen hat (Williams et al. 2017). Die Ergebnisse dieser Dissertation stützen diese Annahme (s. 4.3.1 Abb. 11-12).

Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser, der bei den alten CSQ2^{-/-} signifikant größer als bei den CSQ2^{+/+} war, hat sich bei allen Genotypen durch die Gabe von Isoprenalin reduziert. Zwischen den Genotypen der jungen Tiere gab es bezüglich des LVESD keine Unterschiede (s. 4.3.2 Abb. 13, 14). Werden ferner die Messergebnisse des LVESD nach Isoprenalininjektion bei den alten mit denen der jungen Mäuse verglichen, so ist auffällig, dass ausschließlich die LVESD der CSQ2^{-/-} Mäuse mit dem Alter angestiegen ist (s. 4.3.7 Tab. 4). Dabei schränkt die Dilatation eines Ventrikels die Funktion der Kammer ein und hat gravierende Auswirkungen auf prognostische Parameter (Gao et al. 2000). Somit ist es nachvollziehbar, dass auch in unseren Versuchen erhöhte linksventrikuläre endsystolische Durchmesser mit einer reduzierten Pumpfunktion einhergingen. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser, als weiterer Parameter für die Diagnosestellung der Herzinsuffizienz (Saurbier et al. 2000), wies andererseits keine Pathologie der CSQ2^{-/-} auf (s. 4.3.7 Tab. 4). Hinsichtlich der Wanddicke des interventrikulären Septums gab es unter basalen Bedingungen keine Abweichungen zwischen den Genotypen der untersuchten Altersgruppen (s. 4.3.7 Tab. 4). Da die echokardiographisch bestimmte Septumdicke positiv mit linksventrikulärer Hypertrophie korreliert und die Septumdicke hier nicht erhöht ist, könnte das Vorhandensein einer linksventrikulären Hypertrophie in unserem Tiermodell bezweifelt werden (Woythaler et al. 1983). Dieser Zweifel wird durch das gemessene unveränderte relative Herzgewicht gestützt (s. 4.2; 5.3.1). Dem konträr sind das erhöhte absolute Herzgewicht (s. 4.2) und die durch die Studien von Knollmann et al. (2006) sowie von Song et al. (2007) nachgewiesenen verbreiterten Herzwände.

Hingegen war in Ruhe das VTI der Pulmonalarterie bei den alten sowie der Spitzenfluss bei den jungen CSQ2^{-/-} relativ zu den CSQ2^{+/+} Mäusen verringert (s. 4.3.4 Abb. 18; s. 4.3.7 Tab. 4). Dieser Befund ist neu und es könnte ihm ein reduziertes rechtsventrikuläres Schlagvolumen zugrunde liegen. Demnach addiert sich bei den alten CSQ2^{-/-} das verminderte VTI zur reduzierten Ejektionsfraktion und zu einem vergrößerten LVESD in CSQ2^{-/-} Mäusen auf und ist somit ein weiteres Indiz dafür, dass das Herzzeitvolumen in CSQ2^{-/-} Knock-Out Mäusen verringert ist (Tournoux et al. 2011).

Exemplarisch dargestellt sind die Rhythmusstreifen zweier transgener Tiere, die Arrhythmien aufweisen (s. 4.3.5 Abb. 19). Bei der CSQ2^{+/+} Gruppe wurden keine Arrhythmien detektiert. Was in dieser Arbeit anhand einzelner Exemplare gezeigt wurde, wurde bereits anhand von Versuchsreihen in verschiedenen Arbeiten konstatiert (Song et al. 2007, Faggioni et al. 2014). So kann von einer erhöhten arrhythmogenen Diathese bei CSQ2-defizienten Mäusen ausgegangen werden. Die Überexpression des kardialen Calsequestrins führt zu ähnlichen Symptomen und ruft ebenso katecholaminsensitive polymorphe ventrikuläre Tachykardien hervor (Dirksen et al. 2007).

Die Herzfrequenz der alten CSQ2^{-/-} Tiere war in unseren Versuchen signifikant geringer als bei den gleichaltrigen CSQ2^{+/+} Mäusen (s. 4.3.6 Abb. 20). Diese Daten stehen im Einklang mit einigen bereits publizierten Daten (Knollmann et al. 2006, Song et al. 2007). Gergs et al. (2017a) legten hingegen dar, dass es bezüglich der Herzfrequenz keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Alter 6 Monate und 22 Monate) gebe. Bei unserer Gruppe der jungen Mäuse gab es ebenso keine Unterschiede zwischen der Herzfrequenz der Genotypen (s. 4.3.6 Abb. 21). Das könnte einen Anhalt dafür geben, dass sich die Auswirkungen einer CSQ2-Deletion erst in höherem Alter manifestieren. Die Injektion von Isoprenalin bewirkte bei unseren alten und jungen CSQ2^{+/-} und CSQ2^{-/-} Mäusen einen deutlichen Anstieg der Herzfrequenz. Im Rahmen der Experimente von Gergs, Fahrion et al. (2017) stieg die Herzfrequenz aller Genotypen an.

5.3.4 Interpretation der Herzfunktion in vitro

Um die Funktion der Herzvorhöfe in diesem CSQ2 Mausmodell zu analysieren, wurden Kontraktionsversuche mit einfacher Hypoxiephase durchgeführt. Dabei wurden unter basalen Bedingungen wie auch unter 30-minütiger Hypoxie und anschließender Reoxygenierung die Kontraktionskraft der linken und die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe untersucht (s. 4.4).

Die Hypoxie bewirkte, wie auch in dem Modell von Dörner et al. (2021), bei allen Genotypen einen signifikanten Abfall der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe, die auch in der Reoxygenierung fortbestand (s. 4.4.1 Abb. 23). Ein signifikanter Abfall der Kontraktionskraft in der Hypoxiephase war zu erwarten, da das Herz von Säugetieren abhängig von oxidativem Metabolismus ist und somit unfähig ist, normale Kontraktilität während sogar nur kurzer Perioden reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit aufrechtzuerhalten (Penn 1970). Mittels begrenzter Hypoxiezeit sollte in unseren Experimenten die Zerstörung hypoxischer Zellen durch toxische Sauerstoffradikale vermieden werden (Bolli 1991, Koehler et al. 2018). In der Hypoxiephase war die relative Kontraktionskraft der CSQ2^{-/-} linken Vorhöfe gegenüber den linken Vorhöfen der CSQ2^{+/+} signifikant vermindert (s. 4.4.3 Tab. 5). In der Reoxygenierungsphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg der Kontraktionskraft, so dass sich diese zwar nicht vollkommen erholte, aber dennoch signifikant größer war als in der Hypoxiephase (s. 4.4.1 Abb. 23). Die linken Vorhofpräparate der CSQ2^{+/+} Mäuse schienen sich tendenziell besser zu erholen als die der CSQ2-defizienten Mäuse. Um diese Tendenz mit statistischer Signifikanz zu untermauern, sind weitere Versuchsreihen mit größeren Fallzahlen angezeigt. In einem transgenen Mausmodell mit Überexpression des humanen H₂-Rezeptors gab es zwar während der Hypoxiephase keine Unterschiede in der Kontraktionskraft zwischen den transgenen Mäusen und den WT, doch zeigte sich eine bessere Erholung der Kontraktionskraft der TG linken Vorhöfe (Gergs et al. 2020). Wird ein weiteres Mausmodell mit kardialer myozytenspezifischer Überexpression von bovinem PP2C β betrachtet, fällt auf, dass es dort Unterschiede in der entwickelten Kontraktionskraft zwischen den linken TG und WT Atrien gab. Zudem kann die PP2C-Überexpression die Fähigkeit, Kraft während kardialer Hypoxie zu entwickeln, verringern, das Risiko myokardialer Kontrakturen erhöhen und zu höheren

Schlagfrequenzen in rechten Herzvorhöfen – insbesondere nach Hypoxie – führen (Bollmann et al. 2020). In unseren Versuchen war die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe während der Hypoxie bei CSQ2+/+ und CSQ2-/- signifikant höher als in der Kontrollphase (s. 4.4.2 Abb. 24). Bei den CSQ2-/- Tieren – nicht jedoch bei den CSQ2+/+ – war in der Reoxygenierungsphase die Schlagfrequenz zum Kontrollwert signifikant verringert. Die CSQ2-/- rechten Vorhöfe boten Tendenzen – ohne statistische Signifikanz – hin zu einer höheren Schlagfrequenz als die CSQ2+/+ während der Hypoxie und hin zu einer geringeren Schlagfrequenz nach der Hypoxie (s. 4.4.2). Die Kontraktionskraft und die Schlagfrequenz verhielten sich antiproportional zueinander. Je stärker demzufolge während der einfachen Hypoxie die Kontraktionskraft abfiel, desto stärker stieg die Schlagfrequenz währenddessen an (s. 4.4.3 Tab. 5). Dies entspricht der physiologischen Reaktion des Herzens, das Herzminutenvolumen soweit wie möglich durch Adaptation der Herzfrequenz aufrechtzuerhalten, und ist vielfach insbesondere im Rahmen von Schockreaktionen dargestellt worden (Wilcox et al. 1938). In der Reoxygenierungsphase zeigte sich dieses Reaktionsverhalten nicht mehr – möglicherweise waren die physiologischen Reaktionsabläufe aufgrund kurzzeitig reduzierter Herzfunktion oder gar aufgrund hypoxischer Schäden, welche in unserem Versuchsaufbau vermieden werden sollten, in dieser Phase nicht möglich (Bolli 1991, Luss et al. 2002). Die experimentelle Hypoxie und Reoxygenierung sind zwar die Hauptfaktoren der Ischämie und Reperfusion, unterscheiden sich jedoch von ihnen deutlich, so dass die unter Laborbedingungen erhobenen Ergebnisse nur mit Einschränkungen verallgemeinert werden können: Die Präparate wurden während der Hypoxie weiterhin mit Glukose versorgt, die Metaboliten wie bspw. Laktat wurden im Gegensatz zur Ischämie weiterhin abtransportiert und mit dem Umschalten von Hypoxie auf Reoxygenierung herrschte sofort und nicht schrittweise Normoxie (Wagner 1998).

Vorbeschrieben für dieses CSQ2 Knock-Out Modell ist, dass die basale Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe der CSQ2-/- niedriger ist als die der CSQ2+/+. Zudem wurde konstatiert, dass die basale Kontraktionskraft der CSQ2-/- linken Vorhöfe leicht erhöht ist (Gergs et al. 2017a). Wie oben dargestellt, weichen unsere Ergebnisse teilweise davon ab. Die basale Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe war gleich. Lediglich in der Reoxygenierungsphase gab es Anzeichen einer niedrigeren Schlagfrequenz der CSQ2-/- rechten Vorhöfe (s. 4.4.2 Abb. 24). Derweil konnten Hinweise auf eine erhöhte basale Kontraktionskraft der CSQ2-/- detektiert werden, ohne dabei jedoch statistisch signifikante Unterschiede bestimmen zu können (s. 4.4.1 Abb. 23).

Anhand eines Mausmodells mit PP2A-Überexpression wurde der Einfluss des Alterns auf kardiale Hypoxie erforscht. Dabei wurde festgestellt, dass PP2A die Antwort auf kardiale β -adrenerge Stimulation in altersabhängiger Weise beeinflussen kann. Höhere PP2A-Aktivität sei möglicherweise protektiv gegen Hypoxie, die häufig in fortgeschrittenem Alter auftritt (Dorner et al. 2021). Um Übereinstimmungen und Unterschiede zu diesem CSQ2 Knock-Out Modell hinsichtlich des Einflusses des Alterns auf kardiale Hypoxie zu analysieren, bedarf es weiterer Versuche und Forschung in diese Richtung.

5.3.5 Interpretation der Immunreaktionen auf myokardiales Gewebe

Im folgenden Abschnitt wird diskutiert, inwieweit das CSQ2-defiziente Mausmodell mit Autoimmunphänomenen gegen myokardiales Gewebe einhergeht. Dazu wird unter anderem eine kritische Auseinandersetzung mit unseren Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie, aus der Immunfluoreszenz-Histologie sowie aus dem Panamá-Blot vorgenommen.

Der Panamá-Blot wurde eingesetzt, um das Repertoire an Autoantikörpern der Klassen IgM und IgG im Vergleich der Genotypen zu analysieren und somit eine mögliche Autoimmunkrankheit zu charakterisieren (Haury et al. 1994). Diesbezüglich wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt und daraus geschlossen, dass CSQ2-defiziente Mäuse keine Autoantikörper, Immunglobuline G bzw. M gegen myokardiale Strukturen bilden (s. 4.7. Abb. 29). Gestützt werden unsere Erkenntnisse durch die Bewertung der angewandten Immunelektrophoresetechnik als zuverlässige Methode. Denn der Western Blot gilt bereits seit Jahrzehnten als sehr sensitive Methode, um spezifische Proteine in komplexen Antigengemischen zu visualisieren (Burnette 1981). Zudem stellt der Panamá-Blot eine weitere Optimierung dieser Immunelektrophoresetechnik dar (Pascale et al. 1995). Damit haben unsere Ergebnisse eine hohe Aussagekraft hinsichtlich der Antikörperprofile der verschiedenen Genotypen. In Bezug auf das Alter der Mäuse besteht jedoch die Einschränkung, dass lediglich die Seren alter Mäuse im Panamá-Blot untersucht wurden (s. 4.7). Dieses Vorgehen fußt auf der Annahme, dass Autoimmunphänomene insbesondere in fortgeschrittenem Lebensalter auftreten (Meredith et al. 1979).

Bei der Durchflusszytometrie lag der Fokus auf den Immunzellen in herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten, im Herzen selbst, in der Milz und in subiliakalen Lymphknoten. Die Immunzellen in der Milz und in subiliakalen Lymphknoten wurden als Referenz zu denen in den herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten und im Herzen selbst herangezogen, da insbesondere in den subiliakalen Lymphknoten keine Akkumulation herzspezifischer Lymphozyten erwartet wird (s. 4.5). Dagegen würde man in den mediastinalen, herzdrainierenden Lymphknoten eine Akkumulation erwarten (Cohrs et al. 1958). An den untersuchten Proben aus dem Herzen, den mediastinalen Lymphknoten, den subiliakalen Lymphknoten und der Milz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Zellanzahl, der Frequenz an T- und B-Zellen samt weiterer tiefergehender Analysen der Subgruppen wie MHC-II- und CD80/86-Expression auf antigenpräsentierenden Zellen, dem Anteil der CD4- bzw. CD8-T-Zellen und deren CD62L- und CD44-Expression festgestellt werden. Dies galt sowohl für die untersuchten Proben der alten als auch der jungen Mäuse (s. 4.5). Allerdings konnten in den herzdrainierenden Lymphknoten der CSQ2^{-/-} Tiere Tendenzen hin zu einer größeren Häufigkeit an B-Zellen festgestellt werden (s. 4.5 Abb. 26), was ein Hinweis für die Aktivierung von B-Zellen sein könnte. Daher haben wir Untersuchungen zu Autoantikörpern angeschlossen.

Auch bei der Frequenz von Leukozyten im Herzen, wofür alle CD45-positiven Zellen herangezogen wurden (Altin et al. 1997), gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen (s. 4.5. Abb. 27). Die Frequenz von T-Zellen im Herzen nahm nur bei den

CSQ2^{+/+} ab, während die Frequenz von B-Zellen sowohl bei den CSQ2^{+/+} als auch bei den CSQ2^{-/-} mit höherem Alter sank (s. 4.5 Abb. 27). Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen keinen eindeutigen Hinweis auf eine Aktivierung beziehungsweise Akkumulation von T-Zellen im Herzen.

Um Autoantikörper gegen Herzgewebe detektieren zu können, wurde in einem weiteren Schritt die Immunfluoreszenz-Histologie eingesetzt (s. 4.6). Hierbei wurde das Serum der verschiedenen Genotypen auf gegen myokardiales Gewebe gerichtete Immunglobuline IgG und IgM hin analysiert. Weder in den Altersgruppen noch zwischen den Altersgruppen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt (s. 4.6 Tab. 6). Möglicherweise ist diese Methode zu wenig sensitiv, um geringe Unterschiede zwischen den Genotypen sensitiv feststellen zu können (Lowry et al. 1983, Cobb et al. 1994).

Werden nun die durchgeführten Untersuchungen auf inflammatorische und Autoimmunphänomene gegen myokardiales Gewebe – Panamá-Blot, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Histologie – zusammenfassend interpretiert, so kommt man zu dem Schluss, dass es keine Hinweise auf eine Aktivierung von B- oder T-Zellen oder das Auftreten von Autoantikörpern gegen Myokardgewebe in dem vorliegenden Mausmodell gibt. Daraus wird abgeleitet, dass die altersabhängige Progression der Hypertrophie und der systolischen Herzinsuffizienz in den CSQ2 Knock-Out Mäusen nicht durch inflammatorische und/oder Autoimmunphänomene verursacht wird.

5.4 Altersabhängige Bedeutung von CSQ2

Besonderer Schwerpunkt unserer Untersuchungen war die Frage nach einer Altersabhängigkeit der Entwicklung einer Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell und deren mögliche Korrelation mit Autoimmunphänomenen gegen myokardiales Gewebe. Bereits Lompre et al. (1991) konstatierten, dass die Transkription der Calsequestrin mRNA ihr Maximum kurz nach der Geburt erreiche, aber im Gegensatz zur SERCA 2-ATPase mRNA, die um die Geburt hoch- und in der Seneszenz herunterreguliert werde, gleich häufig in fetalen, erwachsenen und gealterten Ratten vorhanden sei. Zudem bedeute die Heranreifung des sarkoplasmatischen Retikulums während der kardialen Entwicklung nicht die Transition der Calsequestrin Isoform hin zu einer adulten Isoform, sondern erfordere Konzentrationsveränderungen der vorhandenen mRNA Isoform. Cain et al. (1998) beschrieben sogar, dass die Expression des Calsequestrin Proteins beim Menschen unbeeinflusst vom Alter sei. Allerdings sei das Verhältnis der SERCA2a- zur Calsequestrin-Expression altersabhängig. Die Expression des Calsequestrins bleibt Meyer et al. (1995) zufolge sogar über Endstadien dilatativer Kardiomyopathie hinweg relativ konstant. Auch in einem Modell mit transgenen Junctin überexprimierenden Mäusen wurden beständige Calsequestrinlevel im Atrium über die verschiedenen Alterstufen 3, 6 und 18 Wochen beschrieben (Kirchhefer et al. 2004). Dem gegenüber stehen neuere Erkenntnisse an isolierten humanen Myozyten aus dem rechten Atrium. Herráiz-Martínez et al. (2015) berichteten über altersabhängige Veränderungen in der intrazellulären Calciumhomöostase in

isolierten Myozyten aus dem humanen rechten Atrium. Die SERCA2- und CSQ2-Expression sei mit fortschreitendem Alter vermindert, was mit niedrigerem durch Koffein freisetzbarem SR-Calciumgehalt und einer Reduktion der Calcium Freisetzung-induzierten I_{CA} Inaktivierung einhergehe. Dieser Prozess sei mitverantwortlich für eine 3-fach-Abnahme der Amplitude des Calciumstroms und für die 50%ige Verlangsamung von dessen Abklingen bei über 75-jährigen Patienten. Diese Faktoren können möglicherweise eine progressive Abnahme der atrialen kontraktilen Funktion mit dem Alter begünstigen.

Im Folgenden werden unsere Ergebnisse vorzugsweise mit Blick auf altersabhängige Entwicklungen in den Kontext weiterer transgener Mausmodelle gesetzt. Song et al. (2007) nutzten zur Etablierung eines CSQ2-defizienten Mausmodells zwei Missense Mutationen, welche als Nullallele fungierten: D307H Missense Mutation (CASQ^{307/307}) und CASQ2 Null Mutation (CASQ^{ΔE9/ΔE9}). Beide Mutationen hatten identische Konsequenzen: Junge (15 Wochen alt), mutierte Mäuse boten strukturell normale Herzen ohne funktionelle Defizite dar, entwickelten allerdings stressinduzierte ventrikuläre Arrhythmien. Die alten (35 Wochen alt) Mäuse präsentierten, verglichen mit der gleichaltrigen WT-Gruppe, eine linksventrikuläre Hypertrophie und reduzierte Ejektionsfraktion. Es war zu einer signifikanten Vergrößerung des Atriums in den homozygoten CSQ2^{-/-} Linien gekommen (Song et al. 2007). Zudem hatten die CSQ2^{-/-} Knock-Out Mäuse mittleren Alters (14-20 Wochen) in der Elektrokardiographie eine signifikant langsamere basale HF im Vergleich zu CSQ2^{+/+} sowie mehr multiple Arrhythmien vor allem zu Beginn der Elektrokardiographien – vermutlich durch die Einwirkung milden Stresses im Zusammenhang mit Käfigtransfer für die Telemetrie – gehabt (Song et al. 2007). Gergs et al. (2017a) führten als Erste Versuche an dem spezifischen, nun von uns genutzten CSQ2-defizienten Mausmodell durch und haben dabei die Mäuse in die Altersgruppen Jung (6-8 Monate) sowie Alt (20-22 Monate) eingeteilt. Die grobe Untersuchung der jungen Mäuse, deren isolierter Herzen sowie die Echokardiographie haben keine strukturellen Differenzen offenbart. Anhand der Echokardiographie der jungen Mäuse konnten keine Unterschiede in der Herzfrequenz und der Ejektionsfraktion, welche durch Isoprenalininjektion allseits eine signifikante Steigerung erfahren haben, zwischen den Genotypen festgestellt werden. Die CSQ2^{-/-} wiesen ein gegenüber CSQ2^{+/+} verringertes Körpergewicht sowie ein vergrößertes links atriales und relatives Lungengewicht bei gleichem relativen Herzgewicht auf. Die alten CSQ2^{-/-} Mäuse boten hingegen klare Zeichen einer Herzinsuffizienz: Es seien im Vergleich mit den anderen Genotypen eine Vergrößerung des relativen Herzgewichts und eine Verminderung der Ejektionsfraktion aufgetreten (Gergs et al. 2017a). In den Experimenten an isolierten Vorhöfen habe sich eine tendenziell erhöhte basale Kontraktionskraft der jungen CSQ2^{-/-} präsentiert. Die spontane basale Schlagfrequenz sei in den isolierten rechten Vorhöfen verringert gewesen. Ein durchgeführtes Oberflächen-EKG habe gleiche Ergebnisse hinsichtlich der Herzfrequenz erbracht. So sei die basale Herzfrequenz der CSQ2^{-/-} vermindert gewesen (Gergs et al. 2017a). Anschließend habe Isoprenalin bei allen Genotypen einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz bewirkt, welcher bei den CSQ2^{-/-} jedoch geringer ausgefallen sei und folglich auch zu signifikant reduzierter Herzfrequenz post Isoprenalininjektion im Vergleich zu den CSQ2^{+/+} und CSQ2^{+/-} geführt habe. Bei den Experimenten seien

sowohl spontane als auch durch Isoprenalin getriggerte Arrhythmien bei CSQ2^{-/-} als auch bei CSQ2^{+/-} Tieren, jedoch nicht bei CSQ2^{+/+}, aufgetreten (Gergs et al. 2017a). Sato et al. (2003) erforschten die altersabhängigen Veränderungen an jungen (2-3 Monate alt) und gealterten (17 Monate alt) Mäusen mit kardial spezifischer Überexpression murinen kardialen Calsequestrins. Den daraus erhobenen Daten zufolge führe diese Überexpression bei den transgenen FVB/N Mäusen zu kompensierter ventrikulärer Hypertrophie mit linksatrialer Vergrößerung (Sato et al. 2003). Ein Anstieg des Körpergewichts aufgrund des Alters sei bei WT und HOM CSQ^{+/+} festgestellt wurden. Das relative links- sowie rechtsventrikuläre Gewicht sei in den HOM erhöht gewesen, allerdings ohne weiteren Progress mit fortschreitendem Alter. Das Vorhofgewicht sei bei beiden Genotypen mit dem Alter angestiegen und zudem bei den HOM signifikant erhöht gewesen. Im relativen Lungengewicht habe es weder Unterschiede noch Veränderungen gegeben (Sato et al. 2003). In der Echokardiographie habe es zwar keine Differenzen der HF gegeben. Doch habe das linksventrikuläre Fractional Shortening bei den HOM mit zunehmendem Alter abgenommen. In den Langendorff-Perfusionsversuchen hätten sich, so Sato et al. (2003), verringerte kontraktile Parameter gezeigt, welche sich mit dem Alter allerdings entgegen der Erkenntnisse aus der Echokardiographie nicht weiter verschlechtert hätten. Die in den Langendorff-Versuchen erhobene Herzfrequenz habe keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen offenbart (Sato et al. 2003).

Wie bereits diskutiert (s. 5.3.5), verändern sich im Allgemeinen mit fortschreitendem Alter auch das Immunsystem und damit verbunden mögliche inflammatorische sowie autoimmune Phänomene. Perez et al. (1991) analysierten die Sera von Menschen über 65 Jahren und verglichen diese mit einer Kontrollgruppe gesunder junger Erwachsener. Sie schlussfolgerten aus ihren Analysen, dass es eine größere Proportion an Autoimmunphänomenen in Älteren gebe. Butenko (1985) erforschte ebenso die altersassoziierten Veränderungen in der Immunität, welche sich durch eine reduzierte Immunantwort und eine größere Häufigkeit an Autoimmunität manifestierten. Altern des Immunsystems sei begleitet von der Suppression zellulärer und humoraler Elemente älterer Individuen. So seien die altersbezogenen Veränderungen des Immunsystems nicht die Konsequenz eines Verlusts oder Abfalls bestimmter Zellen, sondern fänden ihre Begründung in aktiver Unterdrückung der Regulation der Zelldifferenzierung und der Zell-Zell-Interaktion im Rahmen des ontogenetischen Programms des Organismus. Primäre Störungen des Immunsystems könnten hingegen sekundäre Phänomene des Alterungsprozesses verursachen. Bliznakov (1978) untersuchte die immunologische Seneszenz in Mäusen und stellte dabei fest, dass die humorale, hämolytische, primäre Immunantwort in alten (22 Monate alt) Mäusen im Vergleich zu der Immunantwort in jungen (10 Woche alt) Mäusen ausgeprägt unterdrückt sei. Dieser Unterdrückung liegen den Autoren zufolge eine Imbalance des T-Zell/B-Zell-Verhältnisses und eine Abnahme deren immunologischer Reaktionsfreudigkeit zugrunde.

Um der Bedeutung der altersabhängigen Entwicklung der verschiedenen CSQ2-Genotypen im Mausmodell Rechnung zu tragen, wurden in dieser Arbeit die Werte der alten Mäuse mit denen der jungen je Genotyp verglichen (s. 4), die aussagekräftigsten darunter hier zur Übersicht zusammengefasst und tabellarisch dargestellt. ↑ bedeutet

dabei, dass die Gruppe Alt einen signifikant höheren Wert aufweist als die Gruppe Jung. Dementsprechend steht ↓ für einen signifikant niedrigeren Wert in der Gruppe Alt in Relation zur Gruppe Jung. Bei - trat keine Abweichung der Ergebnisse der alten Mäuse zu denen der jungen Mäuse auf (Tab. 7).

Tabelle 7: Altersabhängige Entwicklung je CSQ2 Genotyp

↑ erhöht im Vergleich der Gruppe Alt vs Jung; ↓ vermindert im Vergleich der Gruppe Alt vs Jung; - keine Veränderung im Vergleich der Gruppe Alt vs Jung

Genotyp		+/+	+/-	-/-
Gewicht	Körpergewicht	-	-	↑
	Herzgewicht	↑	-	↑
	Relatives Lungengewicht	-	-	-
Echokardiographie	EF nach Iso	-	-	↓
	Arteria pulmonalis VTI Ktr	↓	-	↓
	Herzfrequenz nach Iso	-	-	-
	LVESD nach Iso	-	-	↑
Immunantwort	Herz: T-Zell-Frequenz	↓		-
	Herz: B-Zell-Frequenz	↓		↓
	Med. LK: CD4+ CD44+	↑		-
	Med. LK: CD8+ CD44+	↑		-

Während CSQ2+/- also in den ausgewählten Parametern keine Veränderungen mit dem Alter zeigen, sind einige Entwicklungen bei CSQ2+/+ und CSQ2-/- zu erkennen, die bei den CSQ2+/+ und CSQ2-/- in die gleiche Richtung gehen. Es kommt mit fortschreitendem Alter zur Erhöhung des Herzgewichts und zur Abnahme der echokardiographisch bestimmten Herzfunktion, welche bei den CSQ2-/- deutlich stärker ausgeprägt ist. Auch die mittels Durchflusszytometrie ermittelte Immunantwort ist – entsprechend oben dargelegter Annahme und Studienlage – bei alten CSQ2+/+ und CSQ2-/- im Herzen reduziert, wobei hier die CSQ2+/+ mehr Parameter für eine Abnahme der Immunantwort mit dem Alter zeigen. Dagegen sind wider Erwarten vermehrt CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten ausschließlich alter CSQ2+/+ vorhanden.

5.5 Anwendbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und Ausblick

Wie vielfach beschrieben (Postma et al. 2002, Chopra et al. 2009, Kirchhefer et al. 2010, Priori et al. 2011, Faggioni et al. 2012a), werden Genmutationen des Menschen in Bereichen, die für CSQ2 codieren, mit einer erblichen Form ventrikulärer Arrhythmien, die durch physischen und/oder emotionalen Stress ausgelöst werden und als katecholaminsensitive polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT) definiert sind, in Zusammenhang gebracht. Eine Besonderheit dabei ist, dass sich die Herzen mit normalem Ruhe-EKG sowie normaler kardialer Kontraktilität präsentieren, während die Patienten bereits in jungem Alter ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod aufweisen. Beim Vergleich der Phänotypen betroffener Patienten mit CSQ2-Mutationen und einem CSQ2-defizienten Mausmodell gibt es laut zahlreicher

Forschungsergebnisse Gemeinsamkeiten, wie etwa das Auftreten catecholaminsensitiver polymorpher ventrikulärer Arrhythmien, aber auch Unterschiede, wie zum Beispiel das Auftreten echokardiographisch feststellbarer Veränderungen bei Mäusen (Knollmann et al. 2006), so dass die Resultate aus dem Mausmodell nur mit Einschränkungen auf den Menschen übertragen werden können (London 2001). Dennoch zeigte auch das Herz des Patienten aus dem in der Einleitung präsentierten Fallbericht (s. 1) – vergleichbar mit unseren Messungen an Mäusen – eine milde Kardiomegalie (440 g) mit konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie (1,7 cm Wanddicke) ohne strukturelle Abnormitäten (Rajagopalan et al. 2016). Myokardfibrosen, wie sie in den Herzen der alten CSQ2-/- Mäuse existierten (s. 4.8), sind bei Menschen mit CSQ2-Mutationen indes nicht festgestellt worden (Rossi et al. 2020). Unter anderem weil das Auftreten von anti-Herz Antikörpern in Zusammenhang mit Kardiomyopathien und plötzlichem Herztod steht (Bolte et al. 1978, Stefan 1982, Lowry et al. 1983, Zykov et al. 2009), wurde ein möglicher Zusammenhang einer CSQ2-Mutation mit Autoimmunphänomenen bei Mäusen erforscht. Hierbei wurde im Mausmodell keine deutliche Korrelation zwischen der analysierten altersabhängigen systolischen Abnahme der kardialen Funktion und dem Auftreten inflammatorischer Phänomene festgestellt. Ziel unserer Arbeit war, im erweiterten Sinne diesen Zusammenhang zu prüfen, um im nächsten Schritt weitere Informationen aus dem Mausmodell für das Vorhandensein bzw. das Nicht-Vorhandensein immunmodulatorischer Therapiemöglichkeiten für Patienten mit Mutationen der kardialen Isoform des Calsequestrins zu erlangen. Für Patienten mit inflammatorischer dilatativer Kardiomyopathie (DCMi) wurden so zum Beispiel neue Therapieoptionen mit Einsatz der immunmodulatorisch wirkenden Pharmaka, wie Kortikosteroiden und Azathioprin, aber auch der Immunadsorption eröffnet (Schultheiss et al. 2005).

Herraiz-Martinez et al. (2015) haben die altersabhängige Verschlechterung der Calcium Homöostase an menschlichen rechten Vorhöfen erforscht und dabei auch einen der ihr zugrundeliegenden Faktoren, nämlich die Abnahme der Calsequestrin 2 Protein-Werte, festgestellt. Um den Effekt des kardialen Calsequestrins im Alterungsprozess des Menschen weiter zu untersuchen, sind Studien an Patienten mit je heterozygoter und homozygoter CSQ2-Mutation sowie ohne CSQ2-Mutation als Kontrollgruppe durchzuführen. Yang et al. (2004) kreierte ein binäres transgenes Mausmodell mit Überexpression von kardialem Calsequestrin und purinergem Rezeptor P2X₄ (P2X₄R), präsentierten an diesem eine verbesserte kardiale Funktion sowohl an jungen als auch an älteren Mäusen und schlossen daher darauf, dass eine vermehrte Expression oder Aktivierung des P2X₄-Rezeptors einen neuen Therapieansatz bei Herzversagen darstellen könnte. Ob eine verstärkte Aktivierung oder Expression des P2X₄-Rezeptors auch im CSQ2-defizienten Tiermodell und im nächsten Schritt auf Menschen mit CSQ2-Mutationen positive Auswirkungen hat, gilt es zu erforschen. Während in dieser Arbeit weder in den Kontraktionsversuchen noch in der Echokardiographie signifikant vermehrte Kontraktilität festgestellt wurde, ist es unseres Wissens ungeklärt, ob Patienten mit CSQ2-Mutationen eine erhöhte Kontraktilität der Herzmuskulatur aufweisen. Dies könnte mittels intrakardialer Druckmessungen bei CPVT-Patienten weitergehend erforscht werden. Zusammenfassend sprechen die dargestellten Daten dafür, dass immunologische Veränderungen, zumindest diejenigen, die hier untersucht

wurden, Herzversagen nicht generell erklären können. Daher wird das Fazit gezogen, dass andere Mechanismen, die zu beleuchten sind, größere Relevanz in der altersabhängigen systolischen Abnahme der kardialen ventrikulären Funktion in CSQ2 Knock-Out Mäusen und in Extrapolation in Menschen mit CSQ2-Mutationen haben.

6 Zusammenfassung

In Herzen von Säugetieren ist die kardiale Isoform des Calsequestrins (CSQ2) das hauptsächliche Calciumionen-bindende Protein im sarkoplasmatischen Retikulum. Patienten mit CSQ2-Deletionen sind bereits in jungem Alter anfällig für katecholaminsensitive polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT), die mit dem Risiko eines plötzlichen Herztodes bei Nichtvorhandensein systolischer Herzinsuffizienz einhergehen. Um die Funktion des kardialen Calsequestrins besser zu charakterisieren, wurden homozygote CSQ2^{-/-} (HOM), heterozygote CSQ2^{+/-} (HET) und Wildtyp CSQ2^{+/+} Mäuse genutzt. Mithilfe des Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass in den CSQ2^{-/-} Mäusen kein und in den CSQ2^{+/-} Mäusen verringert CSQ2 exprimiert wurde. Die Mäuse wurden je nach ihrem Lebensalter in die Gruppen Jung (2-10 Monate) und Alt (11-23 Monate) eingeteilt. Die CSQ2-defizienten Mäuse entwickelten dabei altersabhängig eine kardiale Hypertrophie und systolische Funktionseinschränkungen. Es wurde die Fragestellung untersucht, ob diese altersabhängige Progression der Hypertrophie im CSQ2-defizienten Mausmodell mit entzündlichen und/oder Autoimmunphänomenen gegen myokardiales Gewebe einhergeht und ob diese ggf. schon vor der Entwicklung eines myokardialen Phänotyps auftreten. Das Körpergewicht der älteren weiblichen CSQ2^{-/-} war gegenüber dem der CSQ2^{+/-} vergrößert. Wenngleich das absolute Herzgewicht der jungen männlichen sowie der alten CSQ2^{-/-} beider Geschlechter im Vergleich mit dem der anderen Genotypen erhöht war, konnte keine Erhöhung des relativen Herzgewichts (Organgewicht/Körpergewicht) gefunden werden. Während das absolute Herzgewicht aller älteren männlichen Genotypen jeweils größer als das der jungen Vergleichsgruppen war, zeigte sich bei den alten Weibchen im Vergleich mit den jungen Tieren ein vergrößertes absolutes Herzgewicht ausschließlich bei den CSQ2^{-/-}. Interessanterweise war das relative Lungengewicht der jungen männlichen CSQ2^{+/-} höher als das der CSQ2^{+/+}. In den weiteren relativen Organgewichten von Lunge, Milz, Leber und Niere gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Echokardiographie wurde unter Isoflurannarkose vor und nach intraperitonealer Injektion von Isoprenalin durchgeführt. In alten männlichen CSQ2^{-/-} war die Ejektionsfraktion sowohl vor als auch nach Isoprenalininjektion vermindert, während die Ejektionsfraktion der weiblichen CSQ2^{-/-} Mäuse ausschließlich nach β -adrenerger Stimulation geringer als die der anderen Genotypen war. Dabei war nur die EF der alten CSQ2^{-/-} zum Ergebnis der jungen Vergleichsgruppe vermindert. Bei jungen Tieren gab es keine Unterschiede hinsichtlich der linksventrikulären Auswurfleistung. Isoprenalin bewirkte bei allen jungen Genotypen sowie bei den alten männlichen Mäusen einen signifikanten Anstieg der EF, während unter den alten weiblichen Mäusen nur die CSQ2^{+/-} Tiere derart auf Isoprenalin reagierten. Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser war bei alten CSQ2^{-/-} Mäusen – nicht aber bei jungen Tieren – sowohl vor als auch nach Isoprenalininjektion erhöht und stieg mit dem Alter an. Mittels Speckle Tracking Imaging wurden die regionalen Wandbewegungen des linken Ventrikels analysiert, wodurch bereits bei jungen CSQ2^{-/-} Mäusen eine Abnahme des Strains und der Strain Rate im Segment „Posterior Mitte“ – bei noch erhaltener linksventrikulärer

Auswurfleistung – detektiert werden konnte. Unter basalen Bedingungen war hinsichtlich der Arteria pulmonalis das VTI der alten sowie der Spitzenfluss der jungen CSQ2^{-/-} reduziert, was einen möglichen Hinweis auf ein reduziertes rechtsventrikuläres Schlagvolumen – zusätzlich zu der eingeschränkten Auswurfleistung des linken Ventrikels – liefert. In dem begleitend zur Echokardiographie aufgezeichneten EKG wurde eine reduzierte basale Herzfrequenz der alten CSQ2^{-/-} ersichtlich, wohingegen es nach Isoprenalininjektion keine Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen den Genotypen gab. Die jungen Mäuse präsentierten keine Unterschiede hinsichtlich der Herzfrequenz. Jedoch stieg durch β -adrenerge Stimulation in beiden Altersgruppen ausschließlich die Herzfrequenz der CSQ2^{+/-} und CSQ2^{-/-} signifikant an. An isolierten Vorhöfen junger CSQ2^{+/+} und CSQ2^{-/-} Mäuse wurden Kontraktionsversuche inklusive einer einfachen Hypoxiephase durchgeführt. Die Hypoxiephase bewirkte bei beiden Genotypen einen signifikanten Abfall der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe, der auch in der Reoxygenierungsphase Fortbestand hatte. Bemerkenswert ist, dass die relative Kontraktionskraft der jungen CSQ2^{-/-} gegenüber den CSQ2^{+/+} in der Hypoxiephase signifikant vermindert war. Beim Vergleich der Schlagfrequenzen der rechten Vorhöfe war auffällig, dass die relative Schlagfrequenz der CSQ2^{-/-}, nicht jedoch die der CSQ2^{+/+}, in der Reoxygenierungsphase im Vergleich zum Kontrollwert verringert war. Die reduzierte Vorhofschlagfrequenz der CSQ2^{-/-} nach Hypoxie ergänzt die Erkenntnisse zur reduzierten basalen Herzfrequenz. In alten CSQ2^{-/-} Herzen existierten Myokardfibrosen, welche in den Herzen der CSQ2^{+/+} Geschwistertiere nicht in diesem Ausmaß vorkamen. Um mögliche inflammatorische und/oder Autoimmunphänomene beurteilen zu können, wurden Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz-Histologie und Panamá Blot eingesetzt. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurden das Herz, die herzdrainierenden mediastinalen Lymphknoten, die subiliakalen Lymphknoten und die Milz analysiert. Weder bei den alten noch bei den jungen Tieren konnten Beweise für eine gesteigerte inflammatorische Aktivität gefunden werden. Im Rahmen der Immunfluoreszenz-Histologie wurde das Antikörperniveau von IgM, IgG und dsDNA überprüft. Es wurden keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert. Zur Durchführung des Panamá-Blots wurden Black-six-Maus naives Herzextrakt, sekundäre IgM Antikörper sowie IgG Antikörper verwendet. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen CSQ2^{+/+}, CSQ2^{+/-} und CSQ2^{-/-}.

In dieser Arbeit wurde das CSQ2-Defizienz-Mausmodell näher charakterisiert und dabei zum ersten Mal der Fokus auf inflammatorische und/oder Autoimmunphänomene gegen myokardiales Gewebe gerichtet. Diese inflammatorischen und/oder Autoimmunphänomene können jedoch – so die vorliegenden Ergebnisse – die altersabhängige Progression der Hypertrophie im CSQ2-Defizienz-Mausmodell und in Extrapolation in Patienten nicht erklären.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Ansari F, Lahooti H, Stokes L, Edirimanne S, Wall J (2018) Correlation between thyroidal and peripheral blood total T cells, CD8(+) T cells, and CD8(+) T- regulatory cells and T-cell reactivity to calsequestrin and collagen XIII in patients with Graves' ophthalmopathy. *Endocr Res* 43: 264-274
- Altin JG, Sloan EK (1997) The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75: 430-445
- Baltogiannis GG, Lysitsas DN, di Giovanni G, Ciconte G, Sieira J, Conte G, Kolettis TM, Chierchia GB, de Asmundis C, Brugada P (2019) CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Front Cardiovasc Med* 6: 92
- Beard NA, Wei L, Dulhunty AF (2009) Ca(2+) signaling in striated muscle: the elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin. *Eur Biophys J* 39: 27-36
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- Biagini E, Berardini A, Graziosi M, Rosmini S, Pazzi C, Rapezzi C (2012) [Gender effect on cardiomyopathy]. *G Ital Cardiol (Rome)* 13: 424-431
- Bliznakov EG (1978) Immunological senescence in mice and its reversal by coenzyme Q10. *Mech Ageing Dev* 7: 189-197
- Bohm M, Bruckner R, Neumann J, Nose M, Schmitz W, Scholz H (1988) Adenosine inhibits the positive inotropic effect of 3-isobutyl-1-methylxanthine in papillary muscles without effect on cyclic AMP or cyclic GMP. *Br J Pharmacol* 93: 729-738
- Bohm M, Bruckner R, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J (1986) Role of guanine nucleotide-binding protein in the regulation by adenosine of cardiac potassium conductance and force of contraction. Evaluation with pertussis toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 332: 403-405
- Boknik P, Drzewiecki K, Eskandar J, Gergs U, Hofmann B, Treede H, Grote-Wessels S, Fabritz L, Kirchhof P, Fortmuller L, Muller FU, Schmitz W, Zimmermann N, Kirchhefer U, Neumann J (2019) Evidence for Arrhythmogenic Effects of A2A-Adenosine Receptors. *Front Pharmacol* 10: 1051
- Bolli R (1991) Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther* 5 Suppl 2: 249-268
- Bollmann P, Werner F, Jaron M, Bruns TA, Wache H, Runte J, Boknik P, Kirchhefer U, Muller FU, Buchwalow IB, Rothmund S, Neumann J, Gergs U (2020) Initial Characterization of Stressed Transgenic Mice With Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Protein Phosphatase 2C. *Front Pharmacol* 11: 591773
- Bolte HD, Schultheiss P (1978) Immunological results in myocardial diseases. *Postgrad Med J* 54: 500-504
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203
- Butenko GM (1985) Ageing of the immune system and diseases. *IARC Sci Publ*: 71-83
- Cain BS, Meldrum DR, Joo KS, Wang JF, Meng X, Cleveland JC, Jr., Banerjee A, Harken AH (1998) Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 32: 458-467
- Chakravarty H, Bal C, Yadav M, Jena N, Bal NC, Sharon A (2019) First Insight on Small Molecules as Cardiac Calsequestrin Stabilizers. *ACS Omega* 4: 11508-11514
- Chopra N, Knollmann BC (2009) Cardiac calsequestrin: the new kid on the block in arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 20: 1179-1185
- Chung CP, Lee WJ, Peng LN, Shimada H, Tsai TF, Lin CP, Arai H, Chen LK (2021) Physio-Cognitive Decline Syndrome as the Phenotype and Treatment Target of Unhealthy Aging. *J Nutr Health Aging* 25: 1179-1189

- Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP (2002) Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech* 59: 264-272
- Cobb MA, Odedra R, Latif N, Dunn MJ (1994) Use of indirect immunofluorescence and western blotting to assess the role of circulating antimyocardial antibodies in dogs with dilated cardiomyopathy. *Res Vet Sci* 56: 245-251
- Cohrs P, Schulz LC (1958) Lymphknoten. In: Bargmann W, Becker V, Berberich J, Cohrs P, Dobberstein J, Doerr W, Eickhoff W, Fankhauser R, Fischer K, Frauchiger E, v. Gavallér B, Gebauer H, Gerhard L, Häupl K, Henschen F, Hieronymi E, Hieronymi G, Hoffmann G, Jaffé R, Kelemen G, Köhler H, Kötsche W, Krahnert R, Lauche A, Liebegott G, Meessen H, Mendheim H, Merté HJ, Mitscherlich E, Nachtsheim H, Pallaske G, Preisseecker E, Randerath E, Renk W, Röhrer H, Rohrschneider W, Rubarth S, Schermer S, Schlumberger HG, Schulte F, Schulz LC, Stochdorph O, Stünzi H, Tamaschke C, Thomas E, Veith G, Wunderer H, Cohrs P, Jaffé R, Meessen H (eds.) *Pathologie der Laboratoriumstiere: Erster Band*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 311-329
- Damiani E, Volpe P, Margreth A (1990) Coexpression of two isoforms of calsequestrin in rabbit slow-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 11: 522-530
- de Boer RA, De Keulenaer G, Bauersachs J, Brutsaert D, Cleland JG, Diez J, Du XJ, Ford P, Heinzel FR, Lipson KE, McDonagh T, Lopez-Andres N, Lunde IG, Lyon AR, Pollesello P, Prasad SK, Tocchetti CG, Mayr M, Sluijter JPG, Thum T, Tschope C, Zannad F, Zimmermann WH, Ruschitzka F, Filippatos G, Lindsey ML, Maack C, Heymans S (2019) Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 21: 272-285
- de Lucia C, Wallner M, Eaton DM, Zhao H, Houser SR, Koch WJ (2019) Echocardiographic Strain Analysis for the Early Detection of Left Ventricular Systolic/Diastolic Dysfunction and Dyssynchrony in a Mouse Model of Physiological Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 74: 455-461
- di Barletta MR, Viatchenko-Karpinski S, Nori A, Memmi M, Terentyev D, Turcato F, Valle G, Rizzi N, Napolitano C, Gyorke S, Volpe P, Priori SG (2006) Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 114: 1012-1019
- Dirksen WP, Lacombe VA, Chi M, Kalyanasundaram A, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Zhou Z, Vedamoorthyrao S, Li N, Chiamvimonvat N, Carnes CA, Franzini-Armstrong C, Gyorke S, Periasamy M (2007) A mutation in calsequestrin, CASQ2D307H, impairs Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ handling and causes complex ventricular arrhythmias in mice. *Cardiovasc Res* 75: 69-78
- Djukic M, Nau R, Sieber C (2014) [The ageing immune system]. *Dtsch Med Wochenschr* 139: 1987-1990
- Dorner MF, Boknik P, Kopp F, Buchwalow IB, Neumann J, Gergs U (2021) Mechanisms of Systolic Cardiac Dysfunction in PP2A, PP5 and PP2A_xPP5 Double Transgenic Mice. *Int J Mol Sci* 22
- Dulhunty AF, Beard NA, Pouliquin P, Kimura T (2006) Novel regulators of RyR Ca²⁺ release channels: insight into molecular changes in genetically-linked myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 27: 351-365
- Elies J, Yanez M, Pereira TMC, Gil-Longo J, MacDougall DA, Campos-Toimil M (2020) An Update to Calcium Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol* 1131: 183-213
- Faggioni M, Knollmann BC (2012a) Calsequestrin 2 and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1250-1260
- Faggioni M, Kryshtal DO, Knollmann BC (2012b) Calsequestrin mutations and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Pediatr Cardiol* 33: 959-967
- Faggioni M, Savio-Galimberti E, Venkataraman R, Hwang HS, Kannankeril PJ, Darbar D, Knollmann BC (2014) Suppression of spontaneous ca elevations prevents atrial fibrillation in calsequestrin 2-null hearts. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 7: 313-320
- Fischer H, Fischer J, Boknik P, Gergs U, Schmitz W, Domschke W, Konturek JW, Neumann J (2006) Reduced expression of Ca²⁺-regulating proteins in the upper gastrointestinal tract of patients with achalasia. *World J Gastroenterol* 12: 6002-6007

- Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* 65: S173-176
- Gaburjakova M, Bal NC, Gaburjakova J, Periasamy M (2013) Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart. *Cell Mol Life Sci* 70: 2935-2945
- Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ (2000) Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 45: 330-338
- Gergs U (2019) Molekulare Grundlagen für die Regulation der Kontraktilität im gesunden und kranken Herzen.
- Gergs U, Baumann M, Bockler A, Buchwalow IB, Ebelt H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klockner U, Ponicke K, Rueckschloss U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H788-798
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-40834
- Gergs U, Buxel ML, Bresinsky M, Kirchhefer U, Fehse C, Horing C, Hofmann B, Marusakova M, Cinakova A, Schwarz R, Pockes S, Neumann J (2021a) Cardiac Effects of Novel Histamine H₂ Receptor Agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 379: 223-234
- Gergs U, Fahrion CM, Bock P, Fischer M, Wache H, Hauptmann S, Schmitz W, Neumann J (2017a) Evidence for a functional role of calsequestrin 2 in mouse atrium. *Acta Physiol (Oxf)* 219: 669-682
- Gergs U, Gerigk T, Wittschier J, Schmidbauer CT, Rottger C, Mahnkopf M, Edler H, Wache H, Neumann J (2021b) Influence of Serotonin 5-HT₄ Receptors on Responses to Cardiac Stressors in Transgenic Mouse Models. *Biomedicines* 9
- Gergs U, Jung F, Buchwalow IB, Hofmann B, Simm A, Treede H, Neumann J (2017b) Pharmacological and physiological assessment of serotonin formation and degradation in isolated preparations from mouse and human hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 313: H1087-H1097
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, Kunstler B, Misslinger N, Au B, Mahnkopf M, Wache H, Neumann J (2020) Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H₂-Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 374: 479-488
- Gergs U, Mangold W, Langguth F, Hatzfeld M, Hauptmann S, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Neumann J (2019) Alterations of protein expression of phospholamban, ZASP and plakoglobin in human atria in subgroups of seniors. *Sci Rep* 9: 5610
- Gergs U, Rothkirch D, Hofmann B, Treede H, Robaye B, Simm A, Muller CE, Neumann J (2018) Mechanism underlying the contractile activity of UTP in the mammalian heart. *Eur J Pharmacol* 830: 47-58
- Ginsburg KS, Bers DM (2004) Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca²⁺ load and Ca²⁺ current trigger. *J Physiol* 556: 463-480
- Glukhov AV, Kalyanasundaram A, Lou Q, Hage LT, Hansen BJ, Belevych AE, Mohler PJ, Knollmann BC, Periasamy M, Gyorke S, Fedorov VV (2015) Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex1. *Eur Heart J* 36: 686-697
- Gombosova I, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Muller FU, Muller T, Vahlensieck U, Schmitz W, Bodor GS, Neumann J (1998) Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol* 274: H2123-2132
- Gopinath B, Adams CL, Musselman R, Tani J, Wall JR (2007) Antibodies against calsequestrin and type XIII collagen are good markers for chronic upper eyelid retraction. *Ocul Immunol Inflamm* 15: 81-88
- Gopinath B, Musselman R, Adams CL, Tani J, Beard N, Wall JR (2006) Study of serum antibodies against three eye muscle antigens and the connective tissue antigen collagen XIII in patients with Graves' disease with and without ophthalmopathy: correlation with clinical features. *Thyroid* 16: 967-974

- Gunji K, Kubota S, Stolarski C, Wengrowicz S, Kennerdell JS, Wall JR (1999) A 63 kDa skeletal muscle protein associated with eye muscle inflammation in Graves' disease is identified as the calcium binding protein calsequestrin. *Autoimmunity* 29: 1-9
- Gupta RC, Neumann J, Durant P, Watanabe AM (1993) A1-adenosine receptor-mediated inhibition of isoproterenol-stimulated protein phosphorylation in ventricular myocytes. Evidence against a cAMP-dependent effect. *Circ Res* 72: 65-74
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
- Harman D (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7124-7128
- Hasler P, Zouali M (2005) Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol* 233: 102-108
- Haury M, Grandien A, Sundblad A, Coutinho A, Nobrega A (1994) Global analysis of antibody repertoires. 1. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities. *Scand J Immunol* 39: 79-87
- Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P (2014) Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 349: g4227
- Herraz-Martinez A, Alvarez-Garcia J, Llach A, Molina CE, Fernandes J, Ferrero-Gregori A, Rodriguez C, Vallmitjana A, Benitez R, Padro JM, Martinez-Gonzalez J, Cinca J, Hove-Madsen L (2015) Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 106: 76-86
- Hoehn M, Zhang Y, Xu J, Gergs U, Boknik P, Werdan K, Neumann J, Ebel H (2015) Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodeling but restores the regulation of beta-catenin by glycogen synthase kinase 3beta. *Int J Cardiol* 183: 39-46
- Hoit BD, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA (1995) In Vivo Echocardiographic Detection of Enhanced Left Ventricular Function in Gene-Targeted Mice With Phospholamban Deficiency. *Circulation Research* 77: 632-637
- Holdcroft A (2007) Gender bias in research: how does it affect evidence based medicine? *J R Soc Med* 100: 2-3
- Ihara Y, Suzuki YJ, Kitta K, Jones LR, Ikeda T (2002) Modulation of gene expression in transgenic mouse hearts overexpressing calsequestrin. *Cell Calcium* 32: 21-29
- Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 101: 1385-1393
- Kamkin A, Kiseleva I, Wagner KD, Leiterer KP, Theres H, Scholz H, Gunther J, Lab MJ (2000) Mechano-electric feedback in right atrium after left ventricular infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 32: 465-477
- Kardiologie DGfP (2018) Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Tachykardie Herzrhythmusstörungen im Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalter (EMAH-Patienten).
- Keppner L, Heinrichs M, Rieckmann M, Demengeot J, Frantz S, Hofmann U, Ramos G (2018) Antibodies aggravate the development of ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315: H1358-H1367
- Kim CW, Aronow WS, Dutta T, Frenkel D, Frishman WH (2020) Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Cardiol Rev* 28: 325-331
- Kirchhefer U, Baba HA, Hanske G, Jones LR, Kirchhof P, Schmitz W, Neumann J (2004) Age-dependent biochemical and contractile properties in atrium of transgenic mice overexpressing junctin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2216-2225
- Kirchhefer U, Wehrmeister D, Postma AV, Pohlentz G, Mormann M, Kucerova D, Muller FU, Schmitz W, Schulze-Bahr E, Wilde AA, Neumann J (2010) The human CASQ2 mutation K206N is associated with hyperglycosylation and altered cellular calcium handling. *J Mol Cell Cardiol* 49: 95-105
- Kirchhof P, Degen H, Franz MR, Eckardt L, Fabritz L, Milberg P, Laer S, Neumann J, Breithardt G, Haverkamp W (2003) Amiodarone-induced postrepolarization refractoriness suppresses induction of ventricular fibrillation. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 257-263

- Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺-release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 116: 2510-2520
- Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BE, Weissman NJ, Jones LR, Morad M (2000) Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol* 525 Pt 2: 483-498
- Koehler U, Hildebrandt O, Krönig J, Grimm W, Otto J, Hildebrandt W, Kinscherf R (2018) Chronische Hypoxie und kardiovaskuläres Risiko. *Herz* 43: 291-297
- Konietzko N, Matthys H (1976) Kardiopulmonale Adaptation an akute Hypoxie. *Klinische Wochenschrift* 54: 1161-1167
- Kornyeyev D, Petrosky AD, Zepeda B, Ferreira M, Knollmann B, Escobar AL (2012) Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca²⁺(+) release and reduces rate-dependent Ca²⁺(+)-alternans in intact mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol* 52: 21-31
- Kranias EG, Hajjar RJ (2012) Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulome. *Circ Res* 110: 1646-1660
- Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M (2001) A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 69: 1378-1384
- Lammerich A, Böhm J, Schimke I, Wagner KD, Storch E, Günther J (1996) Effects of hypoxia, simulated ischemia and reoxygenation on the contractile function of human atrial trabeculae. *Mol Cell Biochem* 160-161: 143-151
- Leenhardt A, Denjoy I, Guicheney P (2012) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5: 1044-1052
- Leitman M, Lysyansky P, Sidenko S, Shir V, Peleg E, Binenaum M, Kaluski E, Krakover R, Vered Z (2004) Two-dimensional strain—a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 17: 1021-1029
- Linck B, Boknik P, Huke S, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Müller FU, Neumann J, Tanriseven Z, Vahlensieck U, Baba HA, Jones LR, Philipson KD, Schmitz W (2000) Functional properties of transgenic mouse hearts overexpressing both calsequestrin and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 648-657
- Linzbach AJ (1948) Herzhypertrophie und kritisches Herzgewicht. *Klin Wochenschr* 26: 459-463
- Liu J, Rigel DF (2009) Echocardiographic examination in rats and mice. *Methods Mol Biol* 573: 139-155
- Lompre AM, Lambert F, Lakatta EG, Schwartz K (1991) Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. *Circ Res* 69: 1380-1388
- London B (2001) Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12: 1089-1091
- Lowry PJ, Thompson RA, Littler WA (1983) Humoral immunity in cardiomyopathy. *Br Heart J* 50: 390-394
- Lu YC, Weng WC, Lee H (2015) Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int* 2015: 526524
- Luss H, Schafers M, Neumann J, Hammel D, Vahlhaus C, Baba HA, Janssen F, Scheld HH, Schober O, Breithardt G, Schmitz W, Wichter T (2002) Biochemical mechanisms of hibernation and stunning in the human heart. *Cardiovasc Res* 56: 411-421
- McFarland TP, Milstein ML, Cala SE (2010) Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49: 556-564
- Melegari A, Bonaguri C, Russo A, Luisita B, Trenti T, Lippi G (2012) A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev* 11: 713-716

- Meredith PJ, Kristie JA, Walford RL (1979) Aging increases expression of LPS-induced autoantibody-secreting B cells. *J Immunol* 123: 87-91
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. (1995) Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92: 778-784
- Meyer W, Neumann J, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Scholz J, Starbatty J, Steinkraus V, Doring V, Kalmar P, et al. (1988) Inotropic response in CHF: myocarditis vs dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 115: 1346-1348
- Milei J, Storino R, Fernandez Alonso G, Beigelman R, Vanzulli S, Ferrans VJ (1992) Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. *Cardiology* 80: 424-437
- Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H (2013) A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev* 12: 509-519
- Muller L, Pawelec G (2015) As we age: Does slippage of quality control in the immune system lead to collateral damage? *Ageing Res Rev* 23: 116-123
- Neumann J, Binter MB, Fehse C, Marusakova M, Buxel ML, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021a) Amitriptyline functionally antagonizes cardiac H2 histamine receptors in transgenic mice and human atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394: 1251-1262
- Neumann J, Bodicker K, Buchwalow IB, Schmidbauer C, Ramos G, Frantz S, Hofmann U, Gergs U (2022) Effects of acute ischemia and hypoxia in young and adult calsequestrin (CSQ2) knock-out and wild-type mice. *Mol Cell Biochem* 477: 1789-1801
- Neumann J, Fahrion C, Fabian S, Gergs U (2016) Cardiac calsequestrin and ageing. *The FASEB Journal* 30: 1197.1192-1197.1192
- Neumann J, Grobe JM, Weisgut J, Schwelberger HG, Fogel WA, Marusakova M, Wache H, Bahre H, Buchwalow IB, Dhein S, Hofmann B, Kirchhefer U, Gergs U (2021b) Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart. *Front Pharmacol* 12: 582916
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P (1988) Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet* 2: 936-937
- Neumann J, Schwarzer D, Fehse C, Schwarz R, Marusakova M, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021c) Functional interaction of H2-receptors and 5HT4-receptors in atrial tissues isolated from double transgenic mice and from human patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394: 2401-2418
- Neumann J, Voss R, Laufs U, Werner C, Gergs U (2021d) Phosphodiesterases 2, 3 and 4 can decrease cardiac effects of H2-histamine-receptor activation in isolated atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394: 1215-1229
- Notomi Y, Lysyansky P, Setser RM, Shiota T, Popovic ZB, Martin-Miklovic MG, Weaver JA, Oryszak SJ, Greenberg NL, White RD, Thomas JD (2005) Measurement of ventricular torsion by two-dimensional ultrasound speckle tracking imaging. *J Am Coll Cardiol* 45: 2034-2041
- Novak P, Soukup T (2011) Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. *Physiol Res* 60: 439-452
- Paolini C, Quarta M, Nori A, Boncompagni S, Canato M, Volpe P, Allen PD, Reggiani C, Protasi F (2007) Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol* 583: 767-784
- Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK, Kang C (2004) Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem* 279: 18026-18033
- Pascale JM, de Austin E, de Moreno NO, Ledezma C, de Marquez E, Blanco R, Quiroz E, Calzada J, Vincensini AR, de Martin MC, et al. (1995) [Optimization of the immunoelectrophoresis technic (western blot) for the confirmation of human immunodeficiency virus infection (HIV) in Panama]. *Rev Med Panama* 20: 58-64
- Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD, Penn MS (2009) Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H811-820
- Penn RG (1970) The effect of age, species and adrenaline on the recovery of isolated atria from anoxia. *Br J Pharmacol* 39: 309-316

- Perez L, Rodriguez C, Sepulveda JA, Silva MC (1991) [Autoimmune phenomena in the elderly]. *Rev Med Chil* 119: 287-292
- Phoon CKL, Turnbull DH (2016) Cardiovascular Imaging in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 6: 15-38
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91: e21-26
- Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MM, Guicheney P, Wilde AA (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet* 42: 863-870
- Priori SG, Chen SR (2011) Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res* 108: 871-883
- Rajagopalan A, Pollanen MS (2016) Sudden death during struggle in the setting of heterozygosity for a mutation in calsequestrin 2. *Forensic Sci Med Pathol* 12: 86-89
- Ramos G, Hofmann U, Frantz S (2016) Myocardial fibrosis seen through the lenses of T-cell biology. *J Mol Cell Cardiol* 92: 41-45
- Rehmani T, Salih M, Tuana BS (2019) Cardiac-Specific Cre Induces Age-Dependent Dilated Cardiomyopathy (DCM) in Mice. *Molecules* 24
- Rieckmann M, Delgobo M, Gaal C, Buchner L, Steinau P, Reshef D, Gil-Cruz C, Horst ENT, Kircher M, Reiter T, Heinze KG, Niessen HW, Krijnen PA, van der Laan AM, Piek JJ, Koch C, Wester HJ, Lapa C, Bauer WR, Ludewig B, Friedman N, Frantz S, Hofmann U, Ramos GC (2019) Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses. *J Clin Invest* 129: 4922-4936
- Rizzo S, Basso C, Troost D, Aronica E, Frigo AC, Driessen AH, Thiene G, Wilde AA, van der Wal AC (2014) T-cell-mediated inflammatory activity in the stellate ganglia of patients with ion-channel disease and severe ventricular arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 7: 224-229
- Rossi D, Gamberucci A, Pierantozzi E, Amato C, Migliore L, Sorrentino V (2020) Calsequestrin, a key protein in striated muscle health and disease. *J Muscle Res Cell Motil*
- Sato Y, Schmidt AG, Kiriazis H, Hoit BD, Kranias EG (2003) Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin. *Mol Cell Biochem* 242: 19-25
- Saubier B, Krause T, Geibel A (2000) [Non-invasive diagnostic procedures for heart failure: echocardiography, myocardial perfusion scintigraphy and radionuclide ventriculography]. *Ther Umsch* 57: 298-304
- Schauenstein K, Wick G, Herzog F, Steinbatz A (1975) Investigation of the recovery phenomenon in immunofluorescence after laser excitation. *J Immunol Methods* 8: 9-15
- Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Lassner D, Gross U, Poller W, Pauschinger M (2005) Kardiomyopathien. *Der Internist* 46: 1245-1258
- Shaker JL, Deftos L (2000) Calcium and Phosphate Homeostasis. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A, Wilson DP (eds.) *Endotext*. South Dartmouth (MA)
- Shay JW (2016) Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov* 6: 584-593
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947
- Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, Berul CI, Eldar M, Seidman CE, Seidman JG (2007) Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 117: 1814-1823
- Stefan J (1982) [Heart antibodies in sudden death]. *Soud Lek* 27: 33-38
- Sulakhe PV, Vo XT (1995) Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* 149-150: 103-126

- Swazina K, Waldherr K, Maier K (2004) Prescriptive gender stereotypes through the ages. *ZEITSCHRIFT FÜR DIFFERENTIELLE UND DIAGNOSTISCHE PSYCHOLOGIE* 25: 165-176
- Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J (1996) Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. *Circulation* 94: 1109-1117
- Tani J, Gopinath B, Nguyen B, Wall JR (2007) Extraocular muscle autoimmunity and orbital fat inflammation in thyroid-associated ophthalmopathy. *Expert Rev Clin Immunol* 3: 299-311
- Thews G (1969) Physiologie des Sauerstofftransportes und Pathophysiologie der Gewebshypoxie. In: Frey R, Halmágyi M, Lang K, Thews G (eds.) *Hypoxie: Grundlagen und Klinik Bericht über das Hanns Baur-Gedächtnis-Symposium am 13 und 14 Oktober 1967 in Mainz*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1-11
- Tournoux F, Petersen B, Thibault H, Zou L, Raher MJ, Kurtz B, Halpern EF, Chaput M, Chao W, Picard MH, Scherrer-Crosbie M (2011) Validation of noninvasive measurements of cardiac output in mice using echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 24: 465-470
- Townsend D (2015) Diastolic dysfunction precedes hypoxia-induced mortality in dystrophic mice. *Physiol Rep* 3
- Tyberg JV, Yeatman LA, Parmley WW, Urschel CW, Sonnenblick EH (1970) Effects of hypoxia on mechanics of cardiac contraction. *Am J Physiol* 218: 1780-1788
- Unsold B, Schotola H, Jacobshagen C, Seidler T, Sossalla S, Emons J, Klede S, Knoll R, Guan K, El-Armouche A, Linke WA, Kogler H, Hasenfuss G (2012) Age-dependent changes in contractile function and passive elastic properties of myocardium from mice lacking muscle LIM protein (MLP). *Eur J Heart Fail* 14: 430-437
- van der Werf C, Kannankeril PJ, Sacher F, Krahn AD, Viskin S, Leenhardt A, Shimizu W, Sumitomo N, Fish FA, Bhuiyan ZA, Willems AR, van der Veen MJ, Watanabe H, Laborde J, Haissaguerre M, Knollmann BC, Wilde AA (2011) Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 57: 2244-2254
- van Driel B, Nijenkamp L, Huurman R, Michels M, van der Velden J (2019) Sex differences in hypertrophic cardiomyopathy: new insights. *Curr Opin Cardiol* 34: 254-259
- von Zglinicki T (2000) Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 99-110
- Wagner K-D (1998) Effekte von Hypoxie und Reoxygenierung auf die kontraktile Funktion von humanen Vorhoftrabekeln und Rattenpapillarmuskeln- Möglichkeiten der Protektion. Institut für Physiologie der Humboldt-Universität zu Berlin. Humboldt-Universität zu Berlin
- Walford RL (1976) Letter: When is a mouse "old"? *J Immunol* 117: 352
- Wallukat G (2002) The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27: 683-690
- Wei Q, Xu X, Chen L, Wang T, Xie L, Yu FC, Song SF, Sheng ZQ, Tong JY (2022) Effects of chronic intermittent hypoxia on left cardiac function in young and aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 322: R241-R252
- Wieliczko M, Matuszkiewicz-Rowinska J (2013) [Calcium homeostasis]. *Wiad Lek* 66: 299-302
- Wilcox HB, Andrus EC (1938) Anaphylaxis in the Isolated Heart. *J Exp Med* 67: 169-180
- Williams AM, Shave RE, Cheyne WS, Eves ND (2017) The influence of adrenergic stimulation on sex differences in left ventricular twist mechanics. *J Physiol* 595: 3973-3985
- Woythaler JN, Singer SL, Kwan OL, Meltzer RS, Reubner B, Bommer W, DeMaria A (1983) Accuracy of echocardiography versus electrocardiography in detecting left ventricular hypertrophy: comparison with postmortem mass measurements. *J Am Coll Cardiol* 2: 305-311
- Yang A, Sonin D, Jones L, Barry WH, Liang BT (2004) A beneficial role of cardiac P2X4 receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1096-1103
- Yuan X, Kronstrom M, Hellenius ML, Cederholm T, Xu D, Sjogren P (2018) Longitudinal changes in leukocyte telomere length and mortality in elderly Swedish men. *Aging (Albany NY)* 10: 3005-3016
- Zamanian M, Qader Hamadneh LA, Veerakumarasivam A, Abdul Rahman S, Shohaimi S, Rosli R (2016) Calreticulin mediates an invasive breast cancer phenotype through the transcriptional dysregulation of p53 and MAPK pathways. *Cancer Cell Int* 16: 56

- Zamanian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R (2013) Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res* 19: 149-154
- Zarain-Herzberg A, Fliegel L, MacLennan DH (1988) Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *J Biol Chem* 263: 4807-4812
- Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem* 272: 23389-23397
- Zykov KA, Tatenkulova SN, Masenko VP, Kuznetsova TV, Rvacheva AV, Belenkov lu N (2009) [Characteristics of autoimmune reactions in chronic cardiac failure of different etiology]. *Ter Arkh* 81: 22-28

8 Thesen

1. Das transgene Tiermodell eines konstitutiven Calsequestrin 2 Knock-Outs konnte erfolgreich generiert werden.
2. Kardiales Calsequestrin hat Einfluss auf die Morphologie der Mäuse, wobei es keine makroskopischen Unterschiede zwischen den Genotypen gibt. CSQ2 Knock-Out führt zu erhöhtem Körpergewicht, zu vergrößertem absoluten Herzgewicht und zur Myokardfibrose.
3. Alter und Geschlecht beeinflussen die Morphologie, die Herzfunktion und die β -adrenerge Stimulierbarkeit der CSQ2^{-/-} Mäuse.
4. CSQ2-Defizienz reduziert im Zusammenspiel mit fortschreitendem Alter die Ejektionsfraktion, außerdem das rechtsventrikuläre Schlagvolumen und erhöht den LVESD.
5. β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin bewirkt bei allen jungen Genotypen sowie bei den alten männlichen Mäusen einen signifikanten Anstieg der EF, während unter den alten weiblichen Mäusen nur die CSQ2^{+/-} Tiere derart auf Isoprenalin reagieren.
6. Bereits die Herzen junger CSQ2^{-/-} Tiere haben regionale Wandbewegungsstörungen, welche mittels Speckle Tracking Imaging detektiert werden können.
7. CSQ2-Defizienz bewirkt in Verknüpfung mit höherem Alter eine reduzierte basale Herzfrequenz.
8. Junge CSQ2^{-/-} Mäuse unterscheiden sich abhängig von Hypoxie und Reoxygenierung in einigen Parametern der Herzmechanik von CSQ2^{+/+} Mäusen, während es unter physiologischen Bedingungen keine Unterschiede gibt.
9. CSQ2 Knock-Out geht nicht mit einer gesteigerten Entzündungsaktivität einher. Daher können Autoimmunphänomene die Abnahme der Herzleistung von CSQ2 Knock-Out Mäusen nicht erklären.

Anlagen

Material

Puffer und Lösungen

Das Wasser stammte aus einer Reinstwasseranlage, in der mittels Filtern und Ionenaustauschern Wasser mit einem elektrischen Widerstand von mehr als 18 MegaOhm erzeugt wurde (H_2O_{Reinst}).

Tierexperimentelle Versuche

Narkose vor Organentnahme

Pentobarbital 0,5 g/10ml NaCl 0,9 isotonische Kochsalzlösung

Heparin-Natrium 25 000 I.E./5ml; 1000 I.E. intraperitoneal

Narkose bei Echokardiographie

Narkoseeinleitung: 2 Volumenprozent Isofluran, Sauerstoff Fluss 1,5l/min

Narkoseerhalt: 1,5 Volumenprozent Isofluran, Sauerstoff Fluss 1,5l/min

Tyrode-Lösung

Stamm I NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005% (g/V), $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 0,56 % (g/V)

Stamm II $NaHCO_3$ 5,00 % (g/V)

Stamm III $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 0,29 % (g/V)

Ascorbinsäure 0,28 mM, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 1,8 mM, Glucose 5,05 mM, KCl 5,4 mM, $MgCl_2 \times 6H_2O$ 1,1 mM, NaCl 119,8 mM, Na_2 -EDTA 0,05 mM, $NaHCO_3$ 22,6 mM, $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 0,42 mM, pH 7,4

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen

Genotypisierung

Agarosegel Agarose 1%, Ethidiumbromid 0,01%, TAE-Puffer

DEPC-Wasser DEPC 0,1% (V/V)

Ladepuffer Bromphenolblau, Glycerol 50%, TAE-Puffer 50%

Natriumazetat-Lösung Natriumazetat 3 M, pH 6

2xPCR Super master mix Taq DNA Polymerase dNTP, $MgCl_2$

(Biotool B 46018)

TAE-Puffer EDTA 59,5 mM, Eisessig 0,99 M, Tris-Base 1,99 M
gelöst in H_2O_{Reinst}

TE-Puffer EDTA 0,25 mM, pH 8, Tris-HCl 10 mM

TE/SDS EDTA 100 mM, pH 8, SDS 0,50%, Tris-HCl 50 mM

Primer, PCR-Programm

Primer

Biomers.net GmbH, Ulm

Vorwärtsprimer: 6116-P9: 5'-AAATAGATCACCGGCTTCCC-3'

Rückwärtsprimer: 6116-P11: 5'-GCCCTGCTCCCTGGATAAAG-3'

Produktgröße (bp): (WT) 1200 (KO) 931

PCR-Programm: Schritte der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem PCR Gerät Eppendorf Mastercycler

Denaturierung	94°C	2 Min.	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30 Sek.	34 Zyklen
Annealing	57°C	20 Sek.	
Elongation	72°C	90 Sek.	
Elongation	72°C	5 Min.	1 Zyklus
Hold	16°C		
Lagerung	4°C		

Western-Blot

Gele:

Sammelgel 4% Acrylamid (30%) 13,16%, APS 1%, H₂O 61,05%,
Sammelgelpuffer 24,73%, TEMED 0,06%

Trenngel 10% Acrylamid (30%) 31,60%, APS 0,38%, Glycerol 7,90%, H₂O 12,64%,
Porziopuffer 47,39%, TEMED 0,08%

Lösungen und Puffer:

Proteinstandard Albumin 1 mg, H₂O_{Reinst} 1 ml

Stammlösung A Na₂CO₃ 2%, NaOH 0,1

Stammlösung B H₂O 4, K⁺-Na⁺-Tartrat 1%

Stammlösung C CuSO₄ 0,50%

Lösung D Lösung A 49 ml, Lösung B 0,5 ml, Lösung C 0,5 ml

Lösung E (Folin-Ciocalteu) Folin 1, H₂O_{Reinst} 2

Porziopuffer (2x) EDTA 0,12 mM, Glycin 0,6 M, Glycin 10%, pH 8,8,
Polyacrylamid 0,40%, SDS 0,20%, Tris-Base 0,2;
Lagerung bei 4°C

<i>Glycerol/H₂O</i>	1:1 Gemisch (Lagerung bei 4°C)
Acrylamid:	30% (Fertiglösung, Roth)
Trenngelpuffer (Standard, 4x)	pH 8,8, SDS 0,40%, Tris-Base 1,5 M
Sammelgelpuffer (4x)	pH 6,8, SDS 0,40%, Tris-Base 0,5 M
TEMED	Fertiglösung (Sigma)
APS (Ammoniumpersulfat)	15ml 1g auf 10ml H ₂ O (10%) Lagerung bei 4°C max. 1 Woche
<i>Elektrophoresepuffer (10%)</i>	Glycin 1,2 M, pH 8,8, SDS 0,40%, Tris-Base 0,4 M gelöst in 1l H ₂ O _{Reinst}

Der Elektrophoresepuffer wurde verwendet in einer Verdünnung von 1:10; Lagerung bei 4°C

Probenpuffer:

Standard-Lämmli (4x) Bromphenolblau 0,004%, Glycerol 40%, pH 6,8,
SDS 8%, Tris-Base 0,25 M

Vor Gebrauch 12mg DTT pro ml zugeben, danach bei -20°C lagern.

High-SDS-Lämmli (4x) Bromphenolblau 0,004%, Glycerol 40%, pH 6,8,
SDS 20%, Tris-Base 0,25 M

Vor Gebrauch 12mg DTT pro ml zugeben, danach bei -20°C lagern.

Transferpuffer (Standard) Na₂HPO₄ 40mM, NaH₂PO₄ 7,9mM, pH>8
in 5l H₂O_{Reinst} gelöst; Lagerung bei 4°C

TBS NaCl 150 mM, pH 7,4, Tris base 10 mM

TBST TBST
+0,1% (v/v) (= Standard) Tween 20 (10 x TBS + 10 ml)

AP-Puffer MgCl₂ x 6 H₂O 5 mM, NaCl 100 mM, pH 9,4,
Triethanolamin 100 mM; Lagerung bei 4°C

Blockierungspuffer:

Milchpulver TBST + 5% (w/v) Magermilchpulver
max. 24h bei 4°C lagern oder mit Na-Azid versetzen

BSA TBST +2% (w/v) BSA
max. 24h bei 4°C lagern oder mit Na-Azid versetzen

Färbelösungen:

NBT-Lsg. 50 mg, DMF 700 µl, H₂O 300 µl, 5% in Dimethylformamid; Lagerung bei 4°C

BCIP-Lsg. Toluidin-Salz: 5% in Dimethylformamid (=50 mg/ml), Na-Salz in H₂O lösen, Lagerung einige Tage bei 4°C möglich

NBT/BCIP-Mischung NBT-Lsg. 66 µl, BCIP-Lsg. 33 µl, AP-Puffer 10 ml

Coomassie-Färbung

Färbelösung Coomassie brilliant blue R250 2,5 g, Eisessig 50 ml, Methanol 450 ml, Wasser 500 ml

Entfärbelösung Eisessig 500 ml, Methanol 1500 ml, Wasser 3000 ml

Ponceau-Rot Ponceau S 0,20%, Trichloressigsäure 2% in H₂O_{Reinst}

Stripping:

Strippingpuffer DTT 0,50%, NaOH 100 mM, SDS 2%

Antikörper:

Anti-CSQ Acris GmbH, SP5340P

Anti-Rabbit IgG (whole molecule), Alkaline Phosphatase, A3687-1MC, Sigma-Aldrich GmbH, München

1. Antikörper			
<u>Protein</u>	<u>Größe</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Block</u>
CSQ-1	54/55	1: 1000	Milchpulver 5%
CSQ-2	54/55	1: 1000	BSA 2%

2. Antikörper			
1. Antikörper	Medium 1. AK	2. Antikörper	Medium 2. AK
CSQ	5% Milchpulver/TBST	Anti-rabbit-IgG	5% Milchpulver in TBST

Panamá-Blot

Proben und Proteinmessung:

RIPA Lyse und Extraktions Puffer, Thermo Fisher Scientific

Natriumchlorid 150 mM, Natrium-Desoxycholsäure 1 %, Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,1 %, NP-40 1%, pH 7,6, Tris-HCl 25 mM

Inhibitoren:

Halt™ Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail 100x, Thermo Fisher Scientific

Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100x, Thermo Fisher Scientific

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific

Probenpuffer 10mL (Lämmli-Puffer)

β-Mercaptoethanol 2% (20µL/1 mL Probenpuffer), Bromphenolblau 0.04% (0.004 g), Glycerin 40% (4mL), pH 6.8 (2.25 mL aus 1M), SDS 8% (0.8 g), Tris 252mM

SDS-Gelelektrophorese, Gel Präparation

Mini-PROTEAN® TGX Stain-FreeTMPrecast Gels, 4-15%, IPG well comb 7cm strip, Bio-Rad Laboratories

10x SDS-Elektrophorese-Puffer dH2O, Glycin 960 mM (75,07 g/mol), pH 3.8, SDS 0.1%
Tris 124mM

Western Blot

AP-Puffer: MgCl₂ 1mM, NaCl 150mM, Tris-HCl 100mM (pH 9)

CAPS-Puffer 10x CAPS 22.13 g, dH₂O 900mL (100mM) mit 2N NaOH auf pH11 titrieren, dH₂O auf 1000mL auffüllen

CAPS-Elektroblot-Puffer CAPS-Puffer 10x 200mL, MetOH 200mL,
Deionisiertes Wasser 1600mL

Methanol, Sigma Aldrich®

Antikörper

In Ziegen gewachsene Anti-Maus Antikörper von Sigma Aldrich®

Anti-Maus IgG (gamma-Kette)-Alkaline Phosphatase Antikörper

Anti-Maus IgM (µ-Kette)-Alkaline Phosphatase Antikörper

Gebrauchswaren

Western Blot Membran, GE Health Care Nitrocellulose Blotting Membran 0,45µm

Filter Papier Roth Blottingpapiere 0,35 mm

Fluorescence-activated cell-sorting (FACSing)

Antikörper

BD bioscience, Heidelberg; Biolegend®, Koblenz

Spezi- fität	Kon- jugiert	Klon	CAT Num- mer	Ziel- spezies	Wirt	Firma	Konzen- tration Herz	Konze- n- tration LN
CD16/3 2		2.4G 2	55314 2	Maus	Ratte	BD bio- scienc e	1:500	
TCR beta chain	PE/Cy7 A647	H57- 597	10922 2	Maus	Hamst er	bio- legend	1:200	1:300- 400
CD4		RM4- 5 und GK1. 5		Maus	Ratte	bio- legend	1:200	1:300- 400

CD62L	A488	MEL-14	104420	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD44	APC/Fire 750	IM7	103062	Maus/Mensch	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD44	PE/CY7	IM7	103029	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD8	PercP	53-6.7	100731	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD19		6D5	115524	Maus	Ratte	biolegend	1:200	1:300-400
CD19	A647	6D5	115522	Maus	Ratte	biolegend		
CD19	PE/CY7	6D5	115519	Maus	Ratte	biolegend	1:200	1:300-400
MHCII								
CD80	PacBlue	16-10A1	104723	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD86	PacBlue	GL-1	105021	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
CD45	BUV395	30-F11	564279	Maus	Ratte	BD bioscience	1:200	
CD45	BV421	30-F11	103134	Maus	Ratte	biolegend	1:200	1:300-400
CD45	A488	30-F11	103122	Maus	Ratte	biolegend	1:200	1:300-400
CD45	APC/Cy7	30-F11	103116	Maus	Ratte	biolegend	1:200	1:300-400

Granulozyten und Monozyten:

Spezifität	Konjugiert	Klon	CAT Nummer	Zielspezies	Wirt	Firma	Konzentration Herz	Konzentration LN
Granulozyten								
Gr-1/Ly6G	APC/Cy7	1A8	127623	Maus	Ratte	biolegend	1:400	
Ly6C	PerCP/Cy5.5	HK1.4	455932	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
Ly6C	PE/Cy7	HK1.4	128017	Maus	Ratte	biolegend	1:100	1:200
Monozyten								

CD11b/Ma c-1	PE/Dazzle	m1/7 0	10125 5	Maus/ Mensch	Ratte	bio- legend	1:200	1:300- 400
CD11b/Ma c-1	PE	m1/7 0	10120 8	Maus	Ratte	bio- legend	1:200	1:300- 400

FACS-Lösungen

123count™ eBeads Counting Beads, 01-1234-42 eBioscience

PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung): 10-fach konzentriert:

KCl 2,0 g, KH₂PO₄ 2,0 g, NaCl 80 g, Na₂HPO₄ 14,4 g, pH-Wert 7,2-7,4 aufgefüllt mit deionisiertem H₂O auf 1000ml

FACS-Puffer

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) Natriumazid 0,10%,

BSA= Albumin Fraktion V, proteasefrei 1% EDTA 1 mM

Kollagenase Typ 2, 300 IU/mg, LS004176 Worthington

Immunofluoreszenz-Histologie

Objekt-Präparation

Herzgewebeschnitte der AID-/- / μ S-/- Linie (aus eigener Zucht)

Färbung

PBS

Blockierungs-Puffer: Carbo-free blocking solution 10x concentrate in PBS-Tween (0.05%)
Vector Laboratories, Inc. Bulingame, Eching, Deutschland

Waschpuffer: PBS-Tween 0.05%

Serum

Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488 Ziege Life Technologies, Darmstadt

Anti-Maus IgM, Alexa Fluor 546 Ziege Life Technologies, Darmstadt

Anti-Maus DAPI, Hoechst 33258 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Mowiol-Lösung

dH₂O 6 ml, Glycerol 6,0 g (2,4 % (w/v)) Mowiol
2,4 g (1 % (w/v)), Mowiol 2,4 g (1 % (w/v)),
Trispuffer 12ml 0,2 M, pH=8,5 (0,05 M)

Kanal und Expositionszeit

Kanal	Antikörper	Belichtungszeit
Blau	DAPI	0,010s
Grün	Ig G	0,150s
Rot	Ig M	0,150s

Substanzen

Substanzen	Hersteller	Bezugsquelle
Aceton 99,5%	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Acrylamid 30%	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts	Philadelphia, USA
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Sigma Aldrich® Chemie GmbH	München
Ascorbinsäure	Merck	Darmstadt
Aquasonic 100, Ultrasound Transmission Gel	MGSS GmbH	Hannover
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer	Leverkusen
Beta-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Blockierungs-Puffer: Carbo-free blocking solution 10x concentrate in PBS-Tween (0.05%)	Vector Laboratories, Inc. Bulingame	Eching
Bovines Serum-Albumin	Merck	Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-Phosphat (BCIP)	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
CaCl ₂	Merck	Darmstadt
CAPS, 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Coomassie brilliant blue R250		
CuSO ₄	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Dibutryl-cAMP	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
DEPC-Lösung	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
dNTP	MBI Fermentas	Heidelberg
ECF dilution buffer	GE Healthcare	Berlin
ECF Substrat	GE Healthcare	Berlin
EDTA	Calbiochem, gehört zu Merck	Darmstadt

Elektrodengel CV-Tronic	C+V Pharma-Depot GmbH	Versmold
ENaCl 0,9 Isotonische Kochsalzlösung Fresenius Infusionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg v.d.H.
Essigsäure 100%	Merck	Darmstadt
Ethanol 96% vergällt	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Ethanol 100%	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH	Neu-Ulm
Folin		
Formamid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
GeneRuler 1kb DNALadder	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Glucose	Merck	Darmstadt
Glycerin, CAS 56-81-5	Merck	Darmstadt
Glycerol	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Glycin	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Haarentfernungs-Gelcreme Veet For Men	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH	Heidelberg
Halt™ Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail 100x	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100x	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Hank's Salt Solution	Biochrom/Merck	Berlin
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH	Ulm
Hydrophobic barrier pen	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Isofluran, Forene® 100% (V/V)	AbbVie Deutschland GmbH&Co. KG	Ludwigshafen
(+)-Isoproterenol, Hydrochloride	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
KCl	C. Roth GmbH	Karlsruhe
K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, New Jersey, USA
Magermilchpulver	TSI GmbH	Zeven
Methanol		
MgCl ₂	Merck	Darmstadt
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels, 4-15%, IPG well comb 7cm strip	Bio Rad Laboratories	München

Mowiol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Natriumazetat	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natrium-Desoxycholsäure	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt
Na ₂ -EDTA	C. Roth GmbH	Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck	Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
PCR-Puffer, 15mM MgCl ₂	Ampliqon	Odense, Dänemark
2x PCR Super Master Mix	BioTool AG	Kirchberg, Schweiz
Pentobarbital	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Phenol	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
Polyacrylamid	C. Roth GmbH	Karlsruhe
Ponceau S		
Proteinase K	Sigma Aldrich® Chemie GmbH	München
RIPA Lyse und Extraktions Puffer	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON Biotechnology	Korea
Saccharose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Sauerstoff	Praxair Deutschland GmbH	Düsseldorf
Taq-DNAPolymerase	Ampliqon	Odense, Dänemark
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva	Heidelberg
Toluidin-Salz		
Trichloressigsäure	Merck	Darmstadt
Triethanolamin		
Tris, 2-Amino-2-Hydroxymethyl- 1,3-Propanediol, CAS-77-86-1	AppliChem GmbH	Darmstadt
TRIS Hydrochlorid	C. Roth GmbH	Karlsruhe

Tween 20	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
VLE RPMI 1640 Medium, Merck, Darmstadt	Merck	Darmstadt
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
123count™ eBeads Counting Beads	eBioscience, gehört zu Thermofisher	Darmstadt

Geräte

Gerät	Hersteller	Bezugsquelle
Bio Dancer	New Brunswick Scientific Co.	Edison, New Jersey, USA
Biophotometer	Eppendorf-Netheler- Hinz-GmbH	Hamburg
Contura HS61	Wella Professionals	Schwalbach
Dispergierer: T 10 basic ULTRA- TURRAX® ika t10 basic ultra-turrax	IKA-Werke GmbH&CO.KG	Staufen im Breisgau
Eppendorf® Microcentrifuge 5415	Eppendorf-Netheler- Hinz-GmbH	Hamburg
Eppendorf® Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler- Hinz-GmbH	Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hoefer	San Francisco, USA
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	Life Technologies	Gaithersburg, USA
Flowjo Single Cell Analysis Software v10	BD bioscience	Heidelberg
Hund Wetzlar SM33	Helmut Hund GmbH	Wetzlar
Isometric Transducer	Kent Scientific Corporation	Torrington, CT, USA
Kontraktionsmessanlage	Föhr Medical Instruments GmbH	Seeheim
Lauda Thermostat C20 CP	LAUDA DR. R. WOBSER GMBH & CO. KG	Lauda- Königshofen
Mettler Type P-1200	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
MicroScan MS550D	VisualSonics	Toronto, Kanada
Mikrodesmembrator S	Sartorius Stedim Biotech GmbH	Göttingen
Mikroskop Immunofluoreszenz, Zeiss Axioskop 2 Plus	Carl Zeiss AG	Oberkochen
Milli-Q® Integral Wasseraufbereitung	Sigma-Aldrich	München
Miniblotter® 28SL	Immunetics, Inc.	Boston, MA, USA

Oxygen Regulator EZ	E-Z Anaesthesia	Palmer, PA, USA
PCR Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH	Hamburg
pH-Meter STH 600	WTW GmbH	Weilheim
Power Lab 8/35	ADInstruments Ltd	Oxford, UK
Prism 8	GraphPad Software	San Diego, USA
Sigma 3-18 Zentrifuge	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	München
Takt- und Impulsgenerator TIG 7000	ELV Elektronik AG	Leer
ThermaSonic Gel Warmer	Parker Laboratories Inc.	Fairfield, NJ, USA
Transfer-Einheit TE 62	Hofer	San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences	Freiburg
Verdampfer Isofluran	Völker GmbH	Kaltenkirchen
Visual Sonics Vevo® 2100 Imaging System	VisualSonics	Toronto, Kanada
Waage Typ AT261 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
XS 205 Dual Range	Mettler-Toledo GmbH	Gießen

Sonstige Materialien

Material	Hersteller	Bezugsquelle
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling-Berzdorf
Cellstar® Tubes	greiner-bio-one	Frickenhausen
Cell Strainer MACS SmartStrainers 30µm und 70µm	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
3 M Transpore™ und Durapore Medizinische Pflaster	3 M Deutschland GmbH	Neuss
GE Health Care Nitrocellulose Blotting Membran 0,45µm	GE Healthcare	Berlin
Kontraktionsversuche: 4 Doppelwandgefäße 4 Elektroden Haken Halterungsstäbe 4 Stative	Emka	Paris

Publikationsübersicht

Bödicker K, Neumann J, Gergs U, Ramos G, Frantz S, Hofmann U (2018) Age-dependent progression of hypertrophy and systolic heart failure in cardiac calsequestrin (CSQ2) knock-out mice is not caused by autoimmune phenomena. Clin Res Cardiol 107 (Suppl 1): P400

Neumann J, Bödicker K, Buchwalow IB, Schmidbaur CT, Ramos G, Frantz S, Hofmann U, Gergs U (2021) Effects of acute ischemia and hypoxia in young and adult calsequestrin (CSQ2) knock-out and wild type mice. Mol Cell Biochem. 2022 Mar 21. doi: 10.1007/s11010-022-04407-2

Erklärungen

- (1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
- (2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.
- (3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Eschwege, Juli 2022

Konrad Bödicker

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Doktorvätern Herrn Professor Dr. med. Joachim Neumann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Hofmann für die Überlassung dieses Themas, für ihre Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Angelegenheiten sowie für ihr zielführendes Engagement.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg sowie des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale). Ausdrücklich danke ich Frau Sonja Reber, Frau Pia Willmy, Frau Stephanie Simmrodt sowie Herrn PD Dr. Ulrich Gergs und Herrn PhD Gustavo Ramos für ihre Betreuung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Igor B. Buchwalow danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Meiner Familie und meinen Freunden sei herzlichster Dank für die kontinuierliche Begleitung, Unterstützung und Motivation auf meinem Lebensweg ausgesprochen.