

Diana Lütke Schürmann

**Zur Bedeutung von kardialen Calsequestrin-
Mutationen**

2009

Pharmakologie und Toxikologie

Zur Bedeutung von kardialen Calsequestrin-Mutationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Pharmazie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Diana Lütke Schürmann
aus Eisenhüttenstadt

2009

Wissenschaftliche Betreuung: Priv.-Doz. Dr. U. Kirchhefer

Dekan:	Prof. Dr. A. Langner
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Kloft
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. J. Neumann
Tag der öffentlichen Verteidigung:	13.10. 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Münster, Universitätsklinikum, bzw. der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Zeit von Januar 2005 bis Januar 2008 unter der Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med J. Neumann und Frau Prof. Dr. rer. nat. C. Kloft angefertigt.

1. Einleitung.....	5
1.1. Allgemeine Betrachtung der CPVT.....	5
1.2. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens	8
1.3. Struktur und Lokalisation des Calsequestrins.....	10
2. Fragestellung.....	15
3. Material und Methoden.....	16
3.1. Mauslinien	16
3.1.1. Herstellung der transgenen Mauslinien	16
3.1.2. CSQ-transgene Mäuse.....	16
3.1.3. Mutagenese von CSQ und Herstellung der Konstrukte für die Expression in Insektenzellen	17
3.2. Genotypisierung	17
3.2.1. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus	17
3.2.2. Nachweis des Transgens mittels PCR	18
3.2.3. Agarosegelelektrophorese	18
3.3. Probeentnahme und Aufbereitung.....	19
3.3.1. Herzgewebe der Maus	19
3.3.2. Herstellung der Homogenate	19
3.3.2.1. Homogenate zum Nachweis von SR-Proteinen.....	19
3.4. Proteinbestimmungen.....	19
3.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
3.4.2. Proteinbestimmung nach Lowry	19
3.5. Untersuchung der Proteinexpression	20
3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
3.5.2. Coomassie-Färbung.....	20
3.5.3. Western Blot.....	21
3.5.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen	21
3.5.4.1. Nicht-radioaktive Detektion	21
3.5.4.1.1. NBT/BCIP	21
3.5.4.1.2. Autoradiographie	22
3.5.4.1.3. Quantifizierung der Proteinexpression.....	22

3.6. Arbeitstechniken mit DNA.....	22
3.6.1. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	22
3.6.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	23
3.7. Immunhistologische Untersuchungen.....	23
3.8. Echokardiographische Untersuchungen.....	24
3.9. Invasive hämodynamische Untersuchungen.....	24
3.9.1. Anästhesie	25
3.10. Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Transienten	25
3.10.1. Isolation der neonatalen Mauskardiomyozyten	27
3.10.1.1. Isolation ventrikulärer Mauskardiomyozyten	27
3.10.2. Aufreinigung der rekombinanten Proteine CSQ ^{NT/K206N}	28
3.10.3. Konstruktion und Expression eines GST-TRD-Fusionsproteins.....	28
3.10.4. Messung von Ca ²⁺ -Transienten an neonatalen Mauskardiomyozyten ...	29
3.11. Ca ²⁺ -Bindungstest	30
3.12. SR-Ca ²⁺ -Aufnahme	30
3.13. [³ H]Ryanodin-Bindungs-Untersuchung.....	30
3.14. Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe des Baculovirussystems.....	31
3.15. Kultur von Insektenzellen	32
3.15.1. Beginn der Insektenzellkultur	32
3.15.2. Kultur als Zellrasen.....	32
3.15.3. Kultur in Suspension	32
3.16. Adenovirales Expressionssystem.....	34
3.16.1. Klonierung der Shuttle-Vektoren	37
3.16.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen.....	37
3.16.3. Generierung des Virus in HEK293-Zellen	41
3.16.3.1. Anzucht und Kultur von HEK293-Zellen	41
3.16.4. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung.....	42
3.16.4.1. Vorbereitung der Zellen zur Titerbestimmung.....	42
3.17. Deglykosylierung der Glykoproteine mittels Glykosidase	43
3.17.1. Deglykosylierung mittels Endoglykosidase H (Endo H).....	43
3.18. Pull-Down-Assay	43
3.19. Bestimmung der Aminosäuresequenzen und Zuckerreste mittels Massenspektrometrie	44

3.20. Statistische Auswertung	45
3.21. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen	45
4. Ergebnisse.....	45
4.1. Überprüfung der CSQ ^{D307H} -Überexpression in den gentechnisch veränderten Mäusen.....	45
4.2. Vergleich der Herz-Morphologie von CSQ-transgenen und WT-Tieren.....	47
4.3. Histologie an transgenen Mäusen	49
4.4. Bestimmung der Überlebensrate.....	49
4.5. Untersuchung der Herzfunktion.....	50
4.5.1. Messung der Hämodynamik.....	50
4.5.2. Hämodynamische Untersuchungen	51
4.5.3. Echokardiographische Untersuchungen.....	51
4.6. Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration und der Zellverkürzung	54
4.7. Expression Ca ²⁺ -regulierender Proteine.....	56
4.8. SR-Ca ²⁺ -Wiederaufnahme	56
4.9. Ca ²⁺ -Bindungseigenschaften von CSQ ^{D307H}	58
4.10. Untersuchung von CSQ ^{K206N}	60
4.11. Generierung rekombinanter Adenoviren zur Expression von CSQ	61
4.11.1. Generierung der rekombinanten Adenoviren CSQ ^{K206N} und CSQ ^{NT}	63
4.12. Charakterisierung von pAdEasy-CSQ-Klonen.....	65
4.13. Untersuchung der Proteinexpression in verschiedenen Zellsystemen mittels Western Blot-Analyse	68
4.13.1. Adenovirale Infektion von HEK293-Zellen und Nachweis des..... Adenovirus-Hüllproteins	70
4.13.2. Untersuchung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der..... Viruskonzentration.....	71
4.13.3. Nachweis der adenoviralen Infektion und CSQ-Lokalisation durch..... Fluoreszenz in neonatalen Mauskardiomyozyten	73
4.14. Deglykosylierung von CSQ ^{NT} und CSQ ^{K206N}	75
4.15. Immunhistologische Untersuchung der Koloalisticn von CSQ ^{K206N} mit Mannosidase	77
4.16. Deglykosylierung von CSQ ^{NT} und CSQ ^{K206N} unter nicht-reduzierten und nicht-denaturierten Bedingungen	79

4.17. Ca ²⁺ -Bindung von CSQ ^{K206N}	81
4.18. Expression Ca ²⁺ -regulierender Proteine	85
4.19. Messung von Ca ²⁺ -Uptake und [³ H]Ryanodin-Bindung	86
4.20. Expression der Hitzeschockproteine	88
4.21. Ca ²⁺ -Transientenmessungen in adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten	91
4.22. Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen	98
5. Diskussion	100
5.1. Mutationen im CASQ2-Gen und CPVT	100
5.2. Untersuchung von CSQ ^{D307H} im transgenen Tiermodell	101
5.3. Untersuchung von CSQ ^{K206N} im adenoviralen Expressionsmodell	105
5.4. Veränderte Ca ²⁺ -Bindungs- und Polymerisations-Eigenschaften von CSQ ^{K206N}	106
5.5. Effekte der CASQ2-Mutation K206N auf die SR-Ca ²⁺ -Freisetzung	108
5.6. Beziehung zwischen Genotyp und dem klinischen Phänotyp	110
5.7. Vergleich mit anderen bekannten Mutationen	111
6. Zusammenfassung	114
7. Anhang	115
7.1. Puffer und Lösungen	115
7.2. Geräte und Bezugsquellen	125
7.3. Primer und PCR-Programme	127
8. Literaturverzeichnis	129
9. Danksagung	145

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
AMP	Ampicillinresistenzgen
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus-Promotor
COOH	C-terminales Ende
D	Aspartat (Einzelbuchstabencode der Aminosäure)
DAD	Delayed afterdepolarisation (späte Nachdepolarisation)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DCM	dilatative Kardiomyopathie
del	Deletion (Entfernen einer Base)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -Bakterien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatische Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FKBP12.6	FK 506-bindendes Protein
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GST	Glutathion-S-Transferase
H	Histidin (Einzelbuchstabencode der Aminosäure)
HEK 293	human embryonic kidney cells (menschliche embryonale Nierenzellen)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
His	Histidin-Erkennungssequenz
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IP ₃	Inositol-1,4,5,-trisphosphat
IU	infektiöse Einheiten
K	Lysin (Einzelbuchstabencode der Aminosäure)
Kan	Kanamycinresistenzgen
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Ktr.	Kontrolle
mCi	Milli-Curie = 37×10^6 Becquerel
MCS	multiple Klonierungsstelle
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MHC	schwere Kette des Myosin
MLC	leichte Kette des Myosins
MOI	Multiplicity of infection (Vielfaches der Infektion)
MOPS	3-(N-Morpholine)Propanesylphonic acid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Asparagin (Einzelbuchstabe der Aminosäure)
NaAc	Natriumacetat
NH ₂	N-terminales Ende
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i> (Replikations-Beginn)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin-Lösung
PI	PhosphorImager-Einheiten

PLC	Phospholipase C
PP	Serin/Threonin-Proteinphosphatase
PP1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 1
PP2A	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 2A
q.s.	<i>quantum satis</i> (soviel wie nötig)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> Linie 21 (Insektenzelllinie)
t ₅₀	Zeit in der 50% eines maximalen Effektes erreicht werden
Taq	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
U	<i>unit</i> (Einheit)
V	Volumen

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Betrachtung der CPVT

In Deutschland sterben ca. 120.000 Menschen pro Jahr an einem plötzlichen Herztod. Bei der Großzahl der verstorbenen älteren Patienten liegt ursächlich eine strukturelle Herzerkrankung, wie beispielsweise eine koronare Herzerkrankung oder eine dilatative Kardiomyopathie, vor. Etwa 5-10% der plötzlichen Herztodesfälle betreffen allerdings strukturell völlig herzgesunde Personen. Der Anteil jüngerer Menschen (<35 Lebensjahre) beträgt in dieser Gruppe sogar 10-20%. Die Prävalenz des plötzlichen Herztodes liegt in dieser Altersgruppe bei etwa 1:100.000. Ungefähr 1% dieser Fälle sind auf Mutationen kardialer Gene zurückzuführen. Diese kardialen mutationsbedingten Funktionsstörungen von Proteinen, die zu Veränderungen der Ca^{2+} -Ionenströme (I_{Ca}) und/oder der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase führen, werden ursächlich für angeborene Erkrankungen, wie der katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT), verantwortlich gemacht. Das klinische Erscheinungsbild einer CPVT reicht von asymptomatischen Verläufen bis hin zum plötzlichen Herztod. Die Prävalenz einer CPVT bewegt sich bei etwa 1:5000. Treten bei jungen Familienmitgliedern Symptome (z.B. Synkopen) auf, kann durch eine detaillierte Familienanamnese inklusive EKG, Ergometrie und molekulargenetischer Diagnostik in ca. 40% der Fälle eine Ursache gefunden werden. Durch diese Maßnahmen können auch weitere, potentiell bedrohte Familienmitglieder identifiziert und durch eine entsprechende Therapie vor einem plötzlichen Herztod geschützt werden. Häufig wird eine CPVT nicht erkannt, da sie bis zum Zeitpunkt des tödlichen Ereignisses symptomlos sein kann.

Ein besseres molekulares Grundlagenverständnis dieser kardialen Erkrankung verspricht eventuell neue Therapiemöglichkeiten.

Die CPVT wurde zuerst 1978 als Arrhythmieform beschrieben (Coumel et al. 1978). Sie tritt hauptsächlich nach dem dritten Lebensjahr bei Kindern mit anscheinend gesundem Herz auf. Es handelt sich um eine primäre Arrhythmie, die meist bei der diagnostischen Abklärung einer Synkope mit oder ohne Krampfanfall entdeckt wird. Die Synkopen treten meist bei körperlicher oder emotionaler Belastung auf. Das EKG ist unter Ruhebedingungen normal. Während körperlicher Aktivität oder bei

beschleunigtem Sinusrhythmus treten wiederholt stereotype ventrikuläre Extrasystolen auf. Zuerst sind sie einzeln und monomorph, werden dann bidirektional (Abb. 1.), treten in Salven auf und erzeugen schließlich eine bidirektionale oder polymorphe ventrikuläre Tachyarrhythmie. Es können darüber hinaus Salven einer supraventrikulären oder junktionalen Tachykardie auftreten. Während der Anfälle kann es zu Torsade de pointes und zum Kammerflimmern kommen. Die Tachyarrhythmie kann durch Stresstests und Injektion kleiner Dosen Isoprenalin induziert werden. Die Patienten werden derzeit mit β -Adrenozeptor-Antagonisten behandelt. β -Adrenozeptor-Antagonisten hemmen vor allem die durch Ca^{2+} -Ionen vermittelten arrhythmogenen und herzfrequenzsteigernden Wirkungen von Katecholaminen. Sie sind die einzigen Antiarrhythmika für die lebensverlängernde Wirkungen bei strukturellen Herzerkrankungen nachgewiesen wurden. So kann die Inzidenz und Letalität von Reinfarkten und plötzlichem Herztod durch eine Langzeittherapie mit Atenolol oder Metoprolol um 20-30% gesenkt werden (Schrör und Kelm 2004). Auch bei chronischer Herzinsuffizienz ist die erfolgreiche Anwendung der β -Rezeptorenblockade mit einer Verbesserung der Prognose verbunden (Packer et al. 2001). Ohne Behandlung ist die Prognose einer CPVT schlecht; so ist die Hälfte der Patienten bis zum 20. Lebensjahr verstorben. Die Krankheit wird autosomal-dominant oder rezessiv vererbt. Als Ursache wurden bei 40-50% der Patienten mit CPVT Mutationen im *RyR2*-Gen gefunden, das für den kardialen Ryanodin-Rezeptor (*RyR2*), dem Ca^{2+} -freisetzenden Kanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), kodiert. Dieser spielt eine zentrale Rolle bei der Kontraktion der Kardiomyozyten.

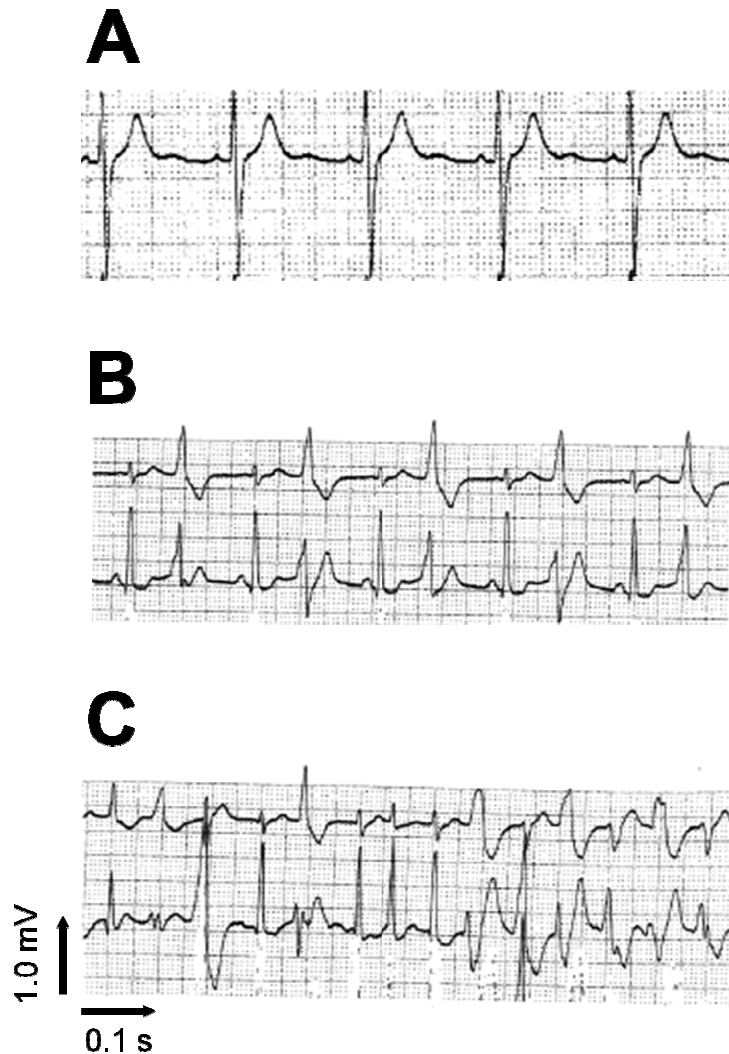


Abb. 1.1.: Elektrokardiographisches Bild der CPVT

Dargestellt ist das Elektrokardiogramm (EKG) verschiedener Formen einer catecholaminergen ventrikulären Tachykardie (CPVT).

(A) CPVT-Patient in Ruhe; **(B)** bidirektionale ventrikuläre Tachykardie; **(C)** CPVT-Patient unter Stress (erzeugt durch Infusion mit Isoprenalin) mit polymorphen ventrikulären Tachykardien und Fibrillationen.

Seltener auftretend, aber ebenso Ursache einer CPVT sind Mutationen im *CASQ2*-Gen (Lahat et al. 2001; Postma et al. 2002). Dabei handelt es sich um autosomal-rezessive Formen der CPVT. Bisher sind sieben Mutationen im *CASQ2*-Gen beim Menschen beschrieben worden. Jedoch ist über die funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen wenig bekannt.

1.2. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens

Die kontraktile Funktion der Herzmuskelzelle wird in erster Linie durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteuert (Ringer 1882). Die Ca^{2+} -Homöostase in Kardiomyozyten erfüllt drei wichtige Aufgaben:

1. Ca^{2+} vermittelt die Kopplung zwischen elektrischer Erregung und Kontraktion der Zelle, indem das in das Zytosol einströmende extrazelluläre Ca^{2+} große Ca^{2+} -Mengen aus dem intrazellulären Speicher des Sarkoplasmatischen Retikulums freisetzt (Beuckelmann und Wier 1988).
2. Eine Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter 200 nmol/l triggert die Relaxation des kontraktile Apparates und damit den Ruhezustand der Herzmuskelzelle.
3. Die Kraft der Kontraktion wird durch das Ausmaß des Ca^{2+} -Konzentrationsunterschiedes zwischen der Kontraktions- und Relaxationsphase (sog. Ca^{2+} -Transient) bestimmt.

Im Sinusknoten werden während des normalen Herzzyklus durch verschiedene Ionenkanäle Aktionspotentiale (AP) generiert, im Reizleitungssystem weitergeleitet und auf Muskelzellen übertragen. Als Folge der Depolarisation kommt es zu einer Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Sarkolemm (SL). Dies ermöglicht den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma der Herzmuskelzelle (Bers et al. 2001, Abb. 1.2.). Hier bedingen die Ca^{2+} -Ionen nach Bindung an den Ryanodin-Rezeptor die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Der am junktionalen SR stattfindende Vorgang wird auch als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben (Fabiato et al. 1975; Sham et al. 1995). Ein quartärer Proteinkomplex im junktionalen SR, der aus dem RyR, Triadin (TRD), Junctin (JCN) und Calsequestrin (CSQ) besteht, reguliert die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem SR. CSQ wird strukturell und funktionell durch die transmembranären Proteine JCN und TRD am RyR verankert (Guo et al. 1995; Zhang et al. 1997; Kirchhefer et al. 2002).

Durch das Öffnen des Ca^{2+} -Freisetzungskanals und die damit einhergehende Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von etwa 10^{-7} mol/l diastolisch auf etwa 10^{-5} mol/l systolisch an.

Das zytosolische Ca^{2+} führt zu einer Aktivierung von Troponin C und nachfolgend zu einem Gleiten der Myosinköpfechen an den Aktinfilamenten. Die Verknüpfung führt zur Verkürzung und zur Kontraktion des Herzmuskels.

Mit dem Abfall der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beginnt die Relaxationsphase. Das zytosolische Ca^{2+} wird in dieser Phase von der Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA2a) unter Spaltung von ATP entgegen dem transmembranären Gradienten in das SR aufgenommen. Damit leistet die SERCA2a den größten Beitrag zur Reduktion des zytosolischen Ca^{2+} während der Diastole (Bassani et al. 1994; Tada et al. 1996; Abb. 1.2.). SERCA2a wird durch Phospholamban (PLB), einem intrinsischen Protein des freien SR, reguliert (Simmerman und Jones 1998). PLB inhibiert SERCA2a, seine Phosphorylierung hebt diese inhibierende Wirkung auf. Sie führt zu einer erhöhten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Von dort gelangen die Ca^{2+} -Ionen auf unbekannte Weise in das junktionale SR, wo sie dann an CSQ bis zur erneuten Ca^{2+} -Freisetzung in der nächsten Systole gebunden werden (McLennan und Wong 1971, Mitchell et al. 1988). Das SR ist somit von grundlegender Bedeutung für die Kopplung zwischen elektrischer Erregung und Kontraktion.

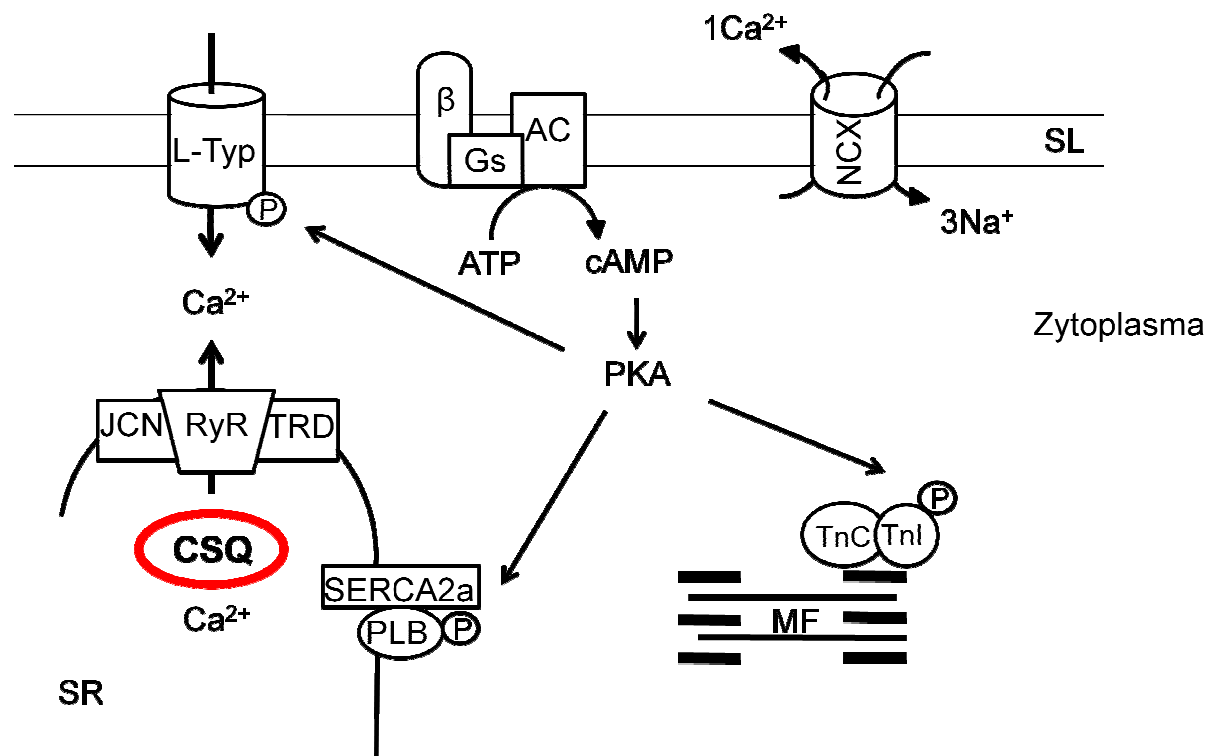


Abb. 1.2.: Schema zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase in der Herzmuskelzelle

Eine Stimulation der β -Adrenozeptoren (β) im Sarkolemma (SL) führt über ein stimulierendes G-Protein (G_s) zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase (AC). Durch die erhöhte Aktivität der AC wird vermehrt zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) aus Adenosin-triphosphat (ATP) gebildet. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche unter anderem den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und Phospholamban (PLB) phosphoryliert. SERCA2a transportiert Ca^{2+} in das SR. Neben SERCA2a kann der sarkoplasmale Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) freies Ca^{2+} aus der Zelle heraustransportieren. Im SR werden die Ca^{2+} -Ionen an das Ca^{2+} -Speicherprotein Calsequestrin (CSQ) gebunden. CSQ bildet zusammen mit den transmembranären Proteinen des junctionalen SR, Triadin (TRD), Junctin (JCN) und dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (RyR) einen quartären Proteinkomplex. Während jeder Kontraktion wird Ca^{2+} über den RyR aus dem SR in das Zytoplasma freigesetzt. Dort bindet es an regulatorische Proteine der Myofilamente (MF) wie z.B. den Troponin-Komplex. Zum Troponin-Komplex gehören das Ca^{2+} -bindende Troponin (TnC) und der Troponin-Inhibitor (TnI).

1.3. Struktur und Lokalisation des Calsequestrins

Calsequestrin ist ein mit geringer Affinität, aber hoher Kapazität (bis zu 40 Mol Ca^{2+} pro Mol CSQ) (Mitchell et al. 1988) Ca^{2+} -bindendes Protein. Von zwei verschiedenen Genen werden die Skelettmuskelisoform (CASQ1) bzw. Herzmuskelisoform (CASQ2) kodiert. Die kardiale Isoform des CSQ besitzt zusätzlich 31 Aminosäuren am C-

terminalen Ende und wurde aus dem Hundeherzen kloniert (Scott et al. 1988). Das CASQ2-Gen besteht aus 11 Exonen und kodiert für 410 Aminosäuren (Frank et al. 2001). Das prozessierte Protein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 47,419 kDa. Nach Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids von 19 Aminosäuren beträgt das Molekulargewicht 45,269 kDa. Das scheinbare Molekulargewicht in SDS-Gelen beträgt hingegen etwa 55 kDa (Mitchell et al. 1988).

Calsequestrin ist im Lumen des SR lokalisiert. Dort ist es im junktionalen SR lokalisiert (Meissner et al. 1975). Es setzt sich aus linearen Polymeren, geformt durch CSQ-Monomere und -Dimere bei millimolarer Ca^{2+} -Konzentration zusammen (Park et al. 2004). Die polymere Form des CSQ bindet mit hoher Kapazität zweimal soviel Ca^{2+} wie die monomere Form des CSQ (Park et al. 2004). Zusätzlich zur Ca^{2+} -Speicherfunktion kann CSQ die RyR2-Aktivität über eine Protein-Protein-Interaktion zusammen mit TRD und JCN regulieren (Zhang et al. 1997; Abb. 1.3.). Zwar gibt es keine direkte physische Interaktion zwischen CSQ und dem RyR2, aber über TRD und JCN bindet CSQ auch an den RyR2, womit eine Beeinflussbarkeit des RyR2 möglich wird (Beard et al. 2004). CSQ dient dabei als luminaler Ca^{2+} -Sensor (Györke et al. 2004). Somit wirkt CSQ, durch Modulation der RyR-Aktivität und der Speicherung von Ca^{2+} , als Regulator der Ca^{2+} -Freisetzung.

Die kardialen Formen des CSQ zwischen verschiedenen Spezies sind sehr homolog. So ist das kardiale CSQ des Menschen, des Hundes und Kaninchens auf Protein- und DNA-Ebene zu über 90% homolog (Yano und Zarain-Herzberg 1994). CSQ vom Hund enthält eine hohe Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren. Es gibt 58 Aspartat- und 51 Glutamatreste, dies entspricht 28% der gesamten Aminosäurereste. Dagegen gibt es nur 11% basische Aminosäurereste (31 Lysin und 9 Argininreste). Die Struktur des CSQ ist durch die Anwesenheit von drei Polypeptid-Domänen, die eine scheibenähnliche Form (Fachausdruck: Disk) bilden, charakterisiert (Wang et al. 1998; Park et al. 2004; Kim et al. 2007). Die Polymerisation des CSQ wird durch die gegensätzliche Funktion von Ca^{2+} und K^+ reguliert (Park et al. 2003). Ca^{2+} unterstützt die Aggregation, wohingegen K^+ die Ca^{2+} -induzierte Polymerisation von CSQ durch Konkurrieren an denselben Bindungsstellen der Proteinoberfläche hemmt (Ikemoto et al. 1972). Beide Ionen, Ca^{2+} und K^+ , bewirken eine dichtere Konformation von CSQ, aber im Gegensatz zum Ca^{2+} , ist K^+ nicht in der Lage, die monomeren CSQ-Moleküle in lineare Polymere zu verbinden (Aaron et al. 1984; Slupsky et al. 1987). Lichtstreuungsexperimente zeigen, dass bei 500 mM KCl Hunde-CSQ fast

ausschließlich als Monomer existiert, während es bei einer Konzentration von 300 mM KCl unter Zusatz von 1 mM CaCl_2 hauptsächlich zur Bildung von Dimeren kommt (Kim et al. 2007). Eine weitere Reduktion von KCl auf 70 mM und ein Zusatz von 1 mM CaCl_2 führt zur Bildung höherer Oligomere bis hin zu Hexameren. Eine allmähliche Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann zuerst zur Faltung von CSQ und dann zur Bildung von „Kopf-zu-Kopf-Dimeren“, durch Einfügen der ausgedehnten N-terminalen Domäne von einem Monomer in die hydrophobe Spalte des benachbarten Monomers, führen. Des Weiteren bewirkt die Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Polymerisation durch eine Ca^{2+} -vermittelte Verbindung der Dimere, den sogenannten „Rücken-zu-Rücken-Dimeren“ (Park et al. 2003; Valle et al. 2008). Im CSQ-Polymer wird die „Rücken-zu-Rücken-Paarung“ der Dimere durch elektrostatische Interaktionen zwischen der negativ geladenen Seite des einen Dimers und der positiv geladenen Seite des anderen Dimers stabilisiert (Wang et al. 1998; Park et al. 2003). Diese Modellvorstellung wird durch Kristallstrukturuntersuchungen des CSQ (Wang et al. 1998) und ebenso durch biochemische Daten bestätigt (Park et al. 2003), worin eine Deletion der N-terminalen Domäne zu einer zufälligen Aggregation des CSQ führte, wohingegen die Trunkierung des C-terminalen Teils die Oligomerisierung des CSQ über die Dimere beeinträchtigte.

Sieben verschiedene Mutationen des humanen *CASQ2*-Gens stehen bisher in Verbindung mit dem Auftreten einer rezessiven autosomalen Form der CPVT (Lahat et al. 2001; Postma et al. 2002; Terentyev et al. 2006; di Barletta et al. 2006), welche zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase führen können.

Eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase des SR kann zu der Entstehung von Ca^{2+} -Überladungen beitragen. Dies kann auf einer vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme in das SR oder einer vermehrten Ca^{2+} -Speicherung im bzw. Freisetzung aus dem SR beruhen (Liu et al. 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathogenetische Beziehung zwischen *CASQ2*-Mutationen, strukturellen Veränderungen des translatierten Proteins und CPVT genauer zu untersuchen.

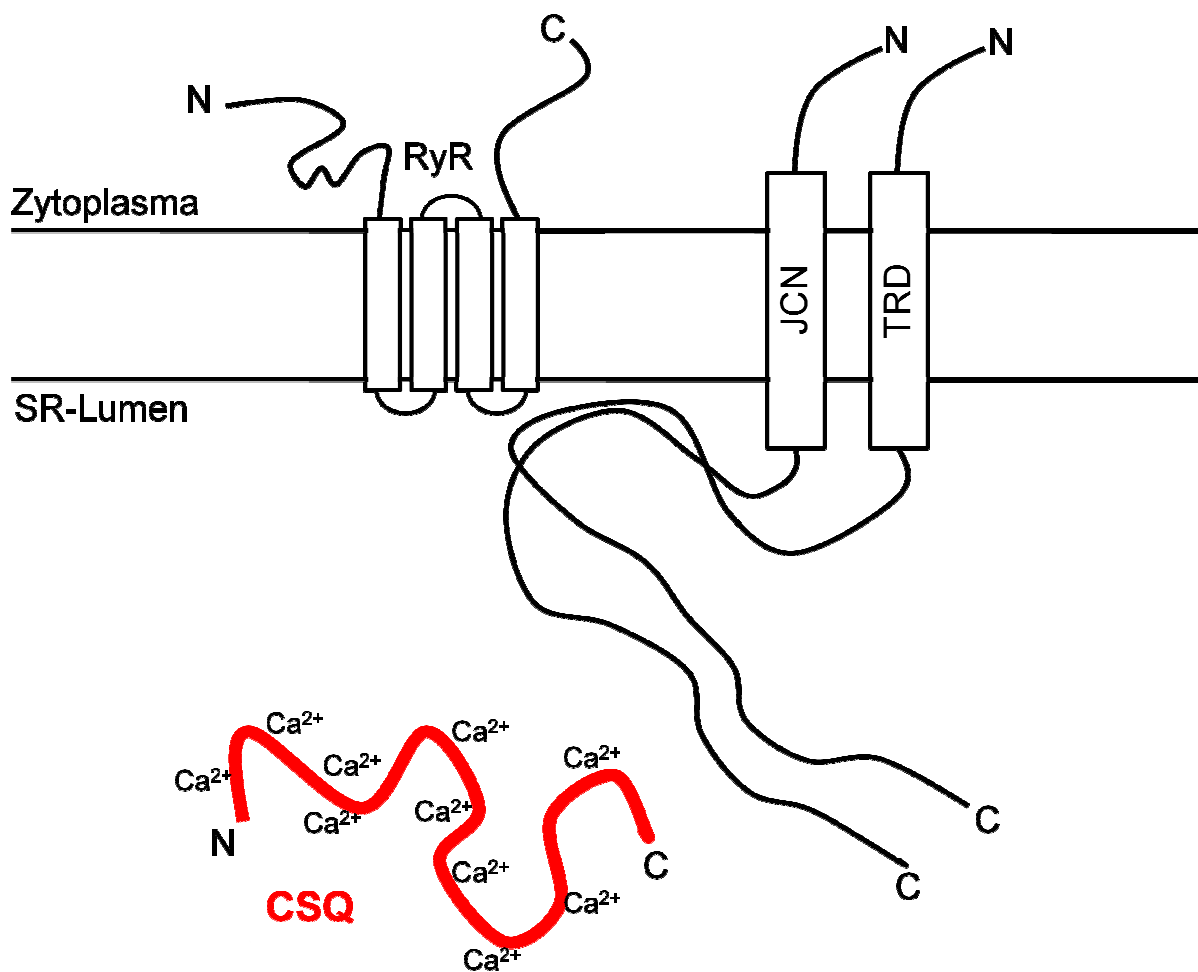


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der Proteininteraktion von Ryanodin-Rezeptor, Junctin, Triadin und Calsequestrin im junctionalen sarkoplasmatischen Retikulum (quartärer Proteinkomplex) (modifiziert nach Bers 2007)

Der Ryanodin-Rezeptor (RyR) befindet sich auf der zytosomatischen Seite des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Junctin (JCN) und Triadin (TRD) sind transmembranäre Proteine. Sie koppeln über elektrostatische Wechselwirkungen an Calsequestrin (CSQ) und verankern somit CSQ am Ryanodin-Rezeptor.

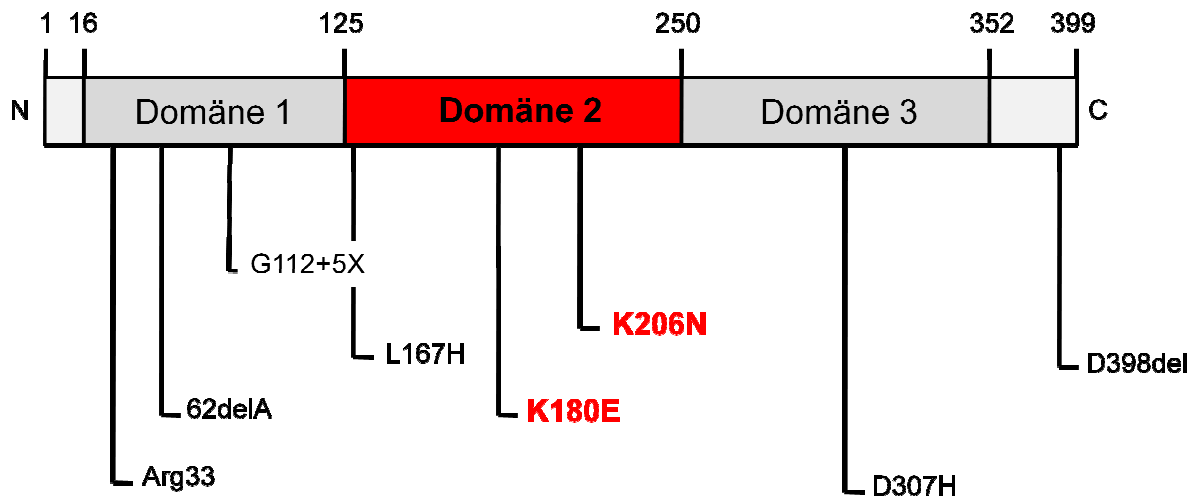


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des CSQ

Menschliches CSQ besteht aus 399 Aminosäuren und enthält drei verschiedene funktionelle Domänen. Die erste und dritte Domäne ist für die Polymerisierung verantwortlich. Die zweite Domäne enthält eine konservierte Sequenz. Wird diese durch eine Genmutation verändert, so führt dies zu Struktur- und vermutlich auch zu Funktionsdefekten. Domäne 3 ist für die Polymerisation und Ca^{2+} -Bindung sowie für die spezifische Interaktion mit Triadin (TRD) und Junctin (JCN) verantwortlich. Die Amino- und Carboxytermini sind jeweils mit N bzw. C markiert. Das N-terminale Ende besitzt einen hohen Anteil basischer Reste. Das C-terminale Ende des Proteins besitzt einen hohen Anteil negativ geladener Aminosäuren. Bekannte Mutationen im CASQ2, entstanden durch Basenaustausch, Deletion oder Insertion, sind dargestellt. Domäneneinteilung nach Park et al. 2003.

2. Fragestellung

Calsequestrin hat im Herzen einen wesentlichen Anteil an der physiologischen Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch seine Beteiligung an der Speicherung und Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR der Herzmuskelzelle.

Aufgrund der Funktionen des CSQ sollten im Rahmen dieser Arbeit die Konsequenzen eines mutierten CSQ-Proteins auf die Regulationsmechanismen der Ca^{2+} -Homöostase untersucht werden. Wir haben somit die Hypothese aufgestellt, dass ein mutiertes CSQ-Protein zu einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase führt, was mit dem Auftreten einer CPVT beim Patienten assoziiert sein könnte.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden verschiedene Modellsysteme entwickelt und etabliert. So sollte die bereits bekannte CASQ2-Mutation D307H einerseits im transgenen Mausmodell und die neuen, noch nicht beschriebenen Mutationen K206N und K180E andererseits in Sf9-Insektenzellen mittels Baculoviren und in neonatalen Mauskardiomyozyten mit Hilfe eines adenoviralen Systems exprimiert werden.

Folgende Hypothesen sollten im Einzelnen getestet werden:

1. Mutationen im CASQ2-Gen führen in der transgenen Maus und in neonatalen Mauskardiomyozyten zu einer veränderten Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit.
2. Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase im Maus- und Zellmodell können für veränderte Ca^{2+} -Transienten verantwortlich gemacht werden.
3. Mutationen im CASQ2-Gen führen in Herzen transgener Mäuse zur Entwicklung von Arrhythmien.

Mit der Untersuchung der Mutationen durch die Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollten Ursachen für das Entstehen getriggelter Arrhythmien aufgedeckt und dadurch potentielle therapeutische Ansätze in der Behandlung der CPVT erarbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Mauslinien

Für die Experimente wurden die transgenen FVBN-Mauslinien CSQ-NT und CSQ-D307H verwendet. Als Kontrolle dienten jeweils gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere. Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin[®], Spezialfutter GmbH und Co. KG, Lage, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt.

3.1.1. Herstellung der transgenen Mauslinien

Die kardiale CSQ^{NT} cDNA des Hundes, eingefügt in den pTRE2-Vektor, wurde mit Primern amplifiziert, welche eine *Sal* I- und *Sac* I-Restriktionsschnittstelle besaßen. Das amplifizierte cDNA Fragment wurde mit *Sal* I und *Sac* I geschnitten und in eine α -MHC-Promotor-Expressionskassette kloniert. Ziel war die Überexpression im Herzen der Maus. Des weiteren wurde der pVL1393-Vektor, welcher die CSQ^{D307H}-cDNA in den *Bam*H I-*Xba* I Klonierungsstellen enthält, mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Not* I geschnitten. Nach der anschließenden Einklonierung dieses Fragments in das pBluescriptII-Plasmid wurde die CSQ^{D307H}-cDNA ebenfalls in die *Sal* I- und *Sac* I-Restriktionsschnittstellen des α -MHC-Promotor-Expressionsvektors eingefügt.

Die korrekte Richtung der beiden cDNA-Fragmente (CSQ^{NT} und CSQ^{D307H}) in der Expressionskassette wurde durch eine Sequenzierung bestätigt (GATC, Konstanz).

3.1.2. CSQ-transgene Mäuse

Die Oozyteninjektion der α -MHC-CSQ-Expressionskassette zur Herstellung der CSQ-transgenen Mäuse wurde von Prof. Brosius in der Medizinischen Fakultät in Münster durchgeführt. Die CSQ-transgenen Tiere zeigten eine herzspezifische Überexpression von Calsequestrin, die durch den α -MHC-Promotor (α -Isoform der schweren Kette des Myosins) kontrolliert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit werden Mäuse, die das Calsequestrin überexprimieren, als CSQ-transgene Tiere bezeichnet.

3.1.3. Mutagenese von CSQ und Herstellung der Konstrukte für die Expression in Insektenzellen

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Ventrikel des Hundes, wie durch Chomczynski und Sacchi (1987) beschrieben, isoliert. Die Einzelstrang-cDNA wurde durch eine standardisierte RT-PCR synthetisiert und unter Benutzung der Taq DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) und CSQ-Oligonukleotide amplifiziert. Der Vorwärts-Primer enthielt eine 5'-konstruierte *EcoR* I-Restriktionsenzym-Schnittstelle. Der Rückwärts-Primer enthielt eine *Xba* I-Schnittstelle. Das amplifizierte cDNA-Fragment wurde unter Benutzung des DNA-Aufreinigung-Systems (Promega) aufgereinigt. Nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Xba* I wurde das resultierende CSQ-Fragment in pTRE2 und pAlter-1 einkloniert. Das Einfügen der CSQ^{NT}-cDNA wurde durch Sequenzierung (GATC) bestätigt. Der pAlter-1-Vektor mit der einklonierten Hunde-CSQ^{NT}-cDNA wurde für die gerichtete Mutagenese mit dem „Altered sites®II in vitro Mutagenesis System“ (Promega) genutzt. Für die Herstellung der CSQ^{D307H}-Mutation wurde eine Base in der DNA ausgetauscht. Hierbei wurde das Guanin 919 durch Cytosin ersetzt, so dass die Aminosäure 307 von Aspartat zu Histidin mutiert wurde. Die mutierte CSQ-cDNA wurde sequenziert. In beide Plasmide, pTRE2-CSQ^{NT} und pAlter, wurde eine *BamH* I-Restriktionsenzym-Schnittstelle eingebaut. Danach wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Xba* I geschnitten. Die verdauten Plasmide wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA aus dem Gel extrahiert (siehe 3.6.1.). Das CSQ^{NT}- bzw. CSQ^{D307H}-Fragment wurde jeweils in die *BamH* I- und *Xba* I-Klonierungsstellen des Baculovirus-Transfervektors pVL1393 einkloniert und in Sf9-Insektenzellen transformiert.

3.2. Genotypisierung

3.2.1. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus

Mit einem sterilen Skalpell und nach örtlicher Betäubung mittels Kältespray wurden ca. 0,3 cm von der Schwanzspitze einer Maus abgetrennt. Die Gewebeprobe wurde mit 700 µl TE/SDS-Puffer (siehe 7.1.) und 40 µl 1%-iger Proteinase K-Lösung versetzt und für ca. 12 h bei 55 °C lysiert. Um die genomische DNA von Lipiden und Proteinen zu reinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Die Lösung wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol

und einem Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1 V/V/V) versetzt. Nach jedem Schritt wurde zentrifugiert (15 800 x g, 3 min, RT) und die obere wässrige Phase in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt. Verunreinigungen wurden durch dieses Verfahren denaturiert und sammelten sich in der organischen unteren Phase oder der Interphase an, während die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase verblieben. Die genomische DNA wurde durch Zusatz von 70 µl Natriumacetat (3,0 M, pH 6) und 800 µl absolutem Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 800 x g, 20 min, RT). Das Sediment wurde, um Salzreste zu entfernen, mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl sterilem, bidestillierten Wasser aufgenommen und bei 65°C für 10 min gelöst.

3.2.2. Nachweis des Transgens mittels PCR

Der Nachweis, ob ein Transgen ins Genom einer Maus integriert wurde, erfolgte aus genomischer DNA, die aus der Schwanzspitze der Maus isoliert wurde (siehe 3.2.1.). Es wurden 100 ng der genomischen DNA in der PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz von 50 µl enthielt 0,4 mM dNTP-Mix (0,25 mM/Nucleotid), 1 µM des jeweiligen spezifischen Vorwärts-Primers (CSQ-P1), 1 µM des jeweiligen spezifischen Rückwärts-Primers (CSQ-P2) und 2.5 U Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf®). Die PCR wurde in einem PCR-Gerät (Mastercycler Personal, Eppendorf® bzw. Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) durchgeführt. Die Primersequenzen und die PCR-Programme sowie die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente sind in Tab. 7. aufgeführt.

3.2.3. Agarosegelelektrophorese

Mittels der nativen Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe getrennt werden. Je nach gewünschtem Trennbereich wurde eine entsprechende Menge Agarose in 50 ml TAE-Puffer (siehe 7.1.) aufgekocht. Um die DNA später durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar zu machen, wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Proben wurden in einem 1x Probenpuffer (siehe 7.1.) auf das Gel aufgetragen.

3.3. Probeentnahme und Aufbereitung

3.3.1. Herzgewebe der Maus

Mäuse, die für eine Versuchsreihe benötigt wurden, wurden jeweils am gleichen Tag durch Kohlendioxid für die Untersuchungen getötet. Zur Organentnahme wurde der Thoraxraum vollständig eröffnet und das Herz entnommen. Das Gewebe wurde anschließend in kalter, physiologischer Kochsalzlösung gespült und anhaftendes Bindegewebe entfernt. Abweichend wurden die Herzen für die Untersuchungen für 10 min in Normal-Tyrode (siehe 7.1) bei 37°C gespült. Die Herzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.2. Herstellung der Homogenate

3.3.2.1. Homogenate zum Nachweis von SR-Proteinen

Tiefgefrorenes Myokardgewebe der Maus wurde in Histidin/Saccharose-Puffer (siehe Anhang) grob zerkleinert und anschließend mit einem Polytron PT-10 (Kinematica AG, Littau, Schweiz) für 90 s und bei 20.000 rpm homogenisiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Aliquote von diesen Homogenaten wurden bei -80°C eingefroren.

3.4. Proteinbestimmungen

3.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Proben, die kein SDS enthielten, wurde mit dem „Bio-Rad Protein Assay Reagenz“ (Sigma-Aldrich®) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Bradford, 1976). Als Proteinstandard wurde Albumin aus Rinderserum (Sigma-Aldrich®) verwendet.

3.4.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in SDS-haltigen Proben nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

3.5. Untersuchung der Proteinexpression

3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Jede Probe wurde mit dem entsprechenden Homogenisierungspuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und mit der gleichen Menge Probenpuffer versetzt (siehe 7.1.). Enthielt der Homogenisierungspuffer SDS, so wurde Probenpuffer ohne SDS verwendet. Bei Homogenisierungspuffern, die kein SDS enthielten, wurde SDS-haltiger Probenpuffer verwendet, so dass jede Probe auf eine SDS-Endkonzentration von 5% eingestellt wurde. Die Proben wurden nun 10 min auf 95°C erhitzt (Laemmli 1970). Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt (Lindemann und Watanabe 1985). Benutzt wurden ein 8%iges bzw. ein 10%iges Polyacrylamid-Trenngel (Porzio und Pearson 1977) und ein 4%iges Polyacrylamid-Sammelgel (nach Laemmli 1970). Die Zusammensetzung ist im Anhang beschrieben (siehe 7.1.). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4°C bei 40 mA für 30 min (Sammelgel) und bei 60 mA für 150 min (Trenngel) in einer Hoefer SE 600 Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) in einem vorgekühlten Elektrodenpuffer (siehe 7.1.). Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsstandard (14 kDa bis 94 kDa, Amersham[®] Biosciences, Freiburg) mitgeführt. Für den Nachweis des Ryanodin-Rezeptors wurde ein 5%iges Polyacrylamid-Trenngel ohne Sammelgel benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4°C mit 60 mA pro Gel für 3 h. Es wurde ein Hochmolekulargewichtsstandard mitgeführt (53 kDa bis 212 kDa, Amersham[®] Biosciences).

3.5.2. Coomassie-Färbung

Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau (Merck, Schwalbach) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele 40 min in der Färbelösung gefärbt (siehe 7.1.) und mit Entfärbelösung (siehe 7.1.) durch mehrmaligen Wechsel entfärbt. Die entfärbten Gele wurden in destilliertem Wasser gewaschen und 2 h in einem Vakuum-Geltrockner (Biorad[®], München) zwischen Cellophan-Papier (Biorad[®], München) getrocknet.

3.5.3. Western Blot

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einer Elektrophoresekammer (Hoefer, San Francisco, USA) im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen (Towbin et al. 1979; Gershoni 1988). Der Transfer wurde mit 1,5 A für 3 h bei 4°C bzw. 1,5 A für 10 h für hochmolekulare Proteine (RyR2) in Transferpuffer durchgeführt (siehe 7.1.). Durch eine Färbung der Membranen mit Ponceau-S-Lösung (siehe 7.1.) wurde der Transfer kontrolliert und gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixiert.

3.5.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Je nach Molekulargewicht der zu identifizierenden Proteine wurde der entsprechende Größenbereich der Ponceau-S-gefärbten Membranen ausgeschnitten und in bidestilliertem Wasser vollständig entfärbt. Zur Blockade unspezifischer Antikörperbindung wurden die Membranen mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung (in Puffer C, siehe 7.1.) bzw. in 2%iger BSA-Lösung (in Puffer C) für 45 min inkubiert. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper (bei 4°C über Nacht) wurden die Streifen mit den Puffern A und C in der Reihenfolge A-C-C-A für je 5 min gewaschen. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (für 2 h bei RT) wurden die Membranen bei nicht-radioaktiver Detektion dreimal für 10 min mit TBS, pH 9.4 (siehe 7.1.) gewaschen sowie einmal mit AP-Puffer (siehe 7.1.) gespült, bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (A-C-C-A, je 5 min). Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung oder mit Autoradiographie unter Verwendung von [¹²⁵I]-markiertem Protein A. Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tab. 7.1. aufgeführt und wurden in den dort angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

3.5.4.1. Nicht-radioaktive Detektion

3.5.4.1.1. NBT/BCIP

Nachdem der ungebundene sekundäre Antikörper durch abwechselndes Waschen mit Puffer A-C-C-A entfernt wurde, wurde die Membran in AP-Puffer äquilibriert und die Membranstreifen durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-Toluidin-Salz-Lösung (BCIP; 1.7%; Stammlösung siehe 7.1.) und Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT; 3.3%; Stammlösung siehe 7.1.) in AP-Puffer detektiert. Hierbei findet eine farbstoff erzeugende Redoxreaktion statt, bei der BCIP als Substrat der am zweiten Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase dient. BCIP wird nach einer Dephosphorylierung oxidativ in einen wasserunlöslichen blauen Indigofarbstoff überführt. Als Oxidationsmittel dient dabei das NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem wasserunlöslichen blauen Farbstoff reagiert und somit eine Farbverstärkung bewirkt.

3.5.4.2. Autoradiographie

Die Membranstreifen wurden für 2 h mit [¹²⁵I]-Protein A (1:1000 in 2% BSA-Lösung) bei RT inkubiert und anschließend je zweimal für je 5 min in Puffer A und Puffer C gewaschen. Die Membranen wurden für 10 min getrocknet, auf Trockenpapier fixiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in PhosphorImager[®]-Kassetten exponiert.

3.5.4.3. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch Densitometrie mit der ImageQuant[®]-Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Dabei wurden unspezifische Hintergrundsignale von jedem Signal subtrahiert.

3.6. Arbeitstechniken mit DNA

3.6.1. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Zur Gelextraktion der DNA wurde der „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen[®]) verwendet und die Aufarbeitung gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur Isolation der DNA

aus Agarosegelen wird ein Silica-Material/Glasmilch verwendet. Silica-Material bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und kann, nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden (Vogelstein 1979). Der DNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.6.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der DNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD_{260}/OD_{280} gebildet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

3.7. Immunhistologische Untersuchungen

Die adenoviral infizierten neonatalen Mausekardiomyozyten wurden für 5 min mit Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS-Puffer (4°C) gewaschen. Nachdem das endogene Maus-IgG mit unkonjugiertem Fab-Fragment von Ziegen-IgG (gerichtet gegen Maus-IgG, 100 µg/ml⁻¹ PBS; Dianova, Hamburg, D) für 30 min bei RT in PBS geblockt wurde, wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit dem polyklonalen CSQ-Antikörper (ABR Affinity BioReagents, Dianova) oder den monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen Mannosidase II (Abcam, Cambridge, UK) oder α-Aktinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 3 µg/ml in PBS verwendet.

Der gebundene erste Antikörper wurde mit konjugiertem Cy3 anti-Kaninchen-IgG (Dianova) oder konjugiertem Streptavidin Cy5 anti-Maus-Antikörper (1:300, Invitrogen) für 30 min detektiert. Abschließend wurden die Zellkerne für 15 s mit DAPI (5 µg/ml PBS, Sigma, Deutschland) gegengefärbt und mit Vectashield (Linaris) fixiert. Die immungefärbten Zellen wurden auf einem Zeiss Axiophot2 Mikroskop (Carl Zeiss Vision GmbH, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

3.8. Echokardiographische Untersuchungen

Echokardiographische Untersuchungen der Herzfunktion transgener Mäuse wurden freundlicherweise zusammen mit Frau Dr. Larissa Fabritz, Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Münster, mittels M-Mode und Doppler durchgeführt. Die zu untersuchenden Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion mit 25 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin narkotisiert. Nach Rasur des Felles im Abdominalbereich wurden die Tiere in Rückenlage auf einer im ca. 45° Winkel geneigten Fläche mittels Klebestreifen fixiert. Auf den linken Hemithorax bzw. Abdomen wurde angewärmtes Ultraschallgel aufgetragen. Die Ultraschalluntersuchung wurde mit einem Philips SONOS 5500 Doppler-Echokardiographie System (SONOS 5500, B1 Software Package, Medical Systems; Bothell, Washington, USA) durchgeführt. Das Gerät war mit einem 15 MHz Hochfrequenzschallkopf für zweidimensionale und M-Mode Messungen und einem 12 Hz Hochfrequenzschallkopf für Doppleruntersuchungen ausgestattet (Ultrasound Sector Transducer s12 Model Nr. 21380A Philips Medical Systems; Bothell; Washington, USA).

Aufnahmen im M-Mode wurden herangezogen, um die Kontraktilität und Dicke der Ventrikelwand zu beurteilen. Dazu wurden Messpunkte innen und außen an der Ventrikelwand festgesetzt und so die Wanddicke gemessen. Des Weiteren wurden die Durchmesser des linken Ventrikels am Ende der Systole (LVEDs [mm]) und am Ende der Diastole (LVEDd [mm]) ebenfalls durch Festlegung zweier Messpunkte bestimmt. Eine weitere Messgröße zur Beurteilung der Kontraktilität des Herzens ist der Prozentsatz der Verkürzung des Ventrikels in % („fractional shortening“; FS%), der sich berechnet aus $100 \times (LVED - LVEDD) / LVEDD$. Eine weitere Meßgröße, um die Kontraktionsfähigkeit des Ventrikels zu beurteilen, ist die Geschwindigkeit der Umfangsverkürzung (velocity of circumferential shortening; Vcf [circumferential / s]). Dies berechnet sich aus $FS / \text{Auswurfzeit [circ / s]}$.

3.9. Invasive hämodynamische Untersuchungen

Die Messung der linksventrikulären Funktion mittels invasiver Hämodynamik ermöglicht die *in vivo*-Erfassung physiologischer Parameter wie Herzfrequenz,

mittlerer arterieller Druck, systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit.

3.9.1. Anästhesie

Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 13-17 $\mu\text{l/g}$ KG i.p. einer 2,5%-igen Avertin[®]-Lösung (Tribromethanol; Sigma-Aldrich[®]).

3.10. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten

Die relative Konzentration der im Intrazellularraum befindlichen freien Ca^{2+} -Ionen wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1 (Grynkiewicz et al. 1985) bestimmt. Von dem hier verwendeten lipophilen und daher membranpermeablen Indo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) werden nach Eintritt in die Zelle die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten. Dadurch wird Indo-1 in seine Ca^{2+} -sensitive, membranimpermeable Form überführt (siehe Abb. 3.1.) Der Farbstoff wurde durch eine Xenon-Lampe mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und die anteilige Emission des vom Indikator ausgesandten Lichtes einer Wellenlänge von 405 und 495 nm durch zwei Photomultiplier registriert (PTI, Princeton, NJ, USA). Indo-1 besitzt die Eigenschaft, sein Emissionsmaximum nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen von 495 nm nach 405 nm zu verschieben. Deshalb kann aus dem Quotienten der Emissionen bei 405 und 495 nm die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985). Alle Experimente wurden bei 25°C durchgeführt, um einen Verlust von Indo-1 aus dem Intrazellularraum, der bei höheren Temperaturen leicht auftritt, während der Messungen zu vermeiden (Di Virgilio et al. 1988; Kao 1994).

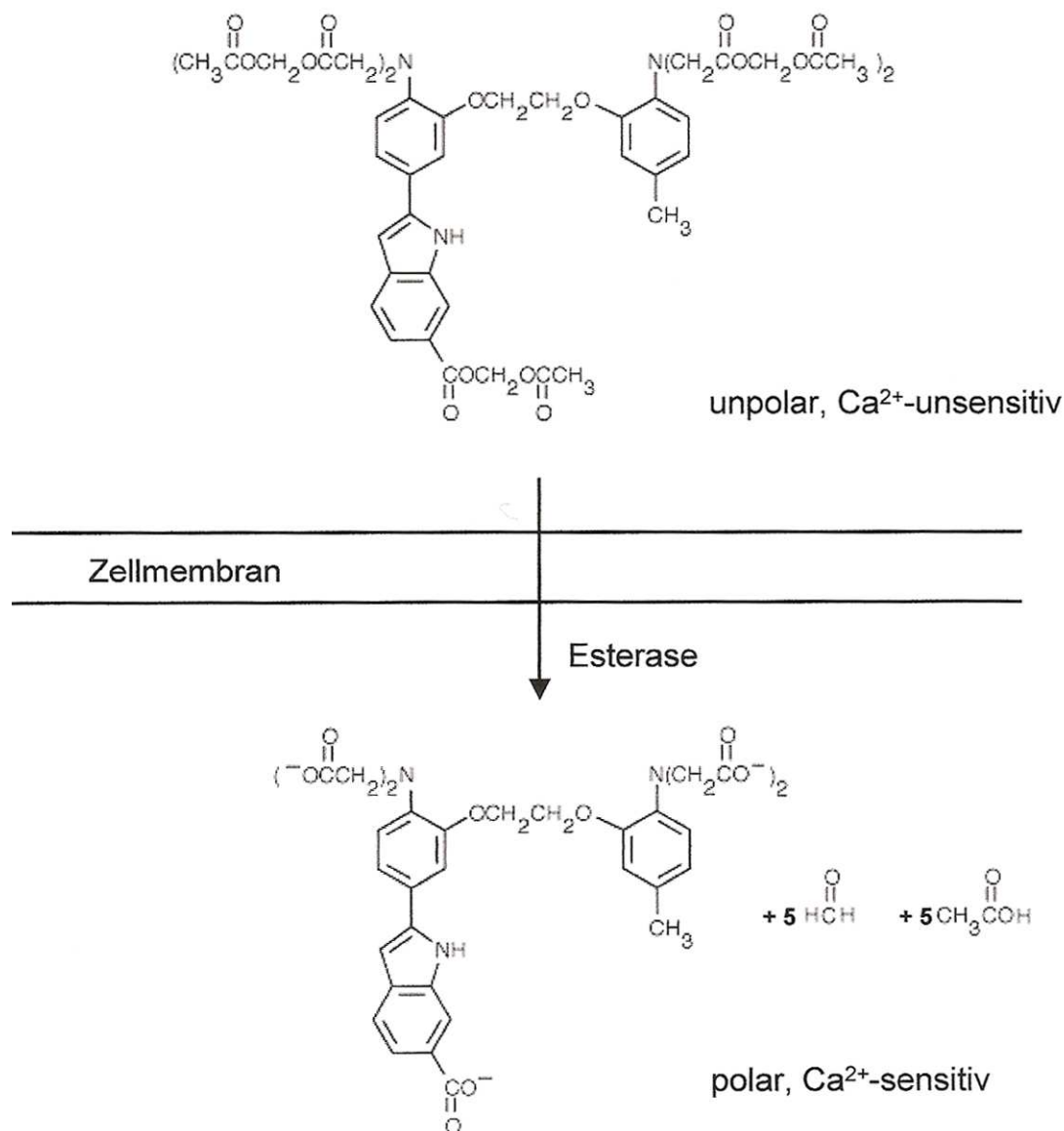


Abb. 3.1.: Graphische Darstellung der Zellbeladung mit dem Acetoxymethyl-Esterderivat von Indo-1

Dargestellt ist die Überführung des membranpermeablen, unpolaren und Ca²⁺-unempfindlichen Farbstoffs Indo-1/AM in die membranimpermeable, polare und damit Ca²⁺-sensitive Form (Indo-1) nach Abspaltung der Estergruppen durch unspezifische zelluläre Esterasen.

3.10.1. Isolation der neonatalen Mauskardiomyozyten

Die Myozyten wurden am ersten postnatalen Tag aus den neonatalen Mäuseherzen nach einem anerkannten Protokoll (siehe 3.10.1.1.) isoliert. 24 h nach der Ausplattierung wurden die Myozyten mit den Adenoviren (MOI 10) infiziert und bei 5% CO₂-Begasung bei 37°C inkubiert. Die experimentellen Untersuchungen erfolgten 72 h nach der Infektion. Für Ca²⁺-Transientenmessungen wurden die Myozyten auf Plastik Coverslips in 6er Multi-dishes ausplattiert. Chamber Slides wurden für immunozytochemische Untersuchungen der infizierten Myozyten genutzt. Für biochemische Studien wurden die mit verschiedenen Adenoviren infizierten kultivierten Myozyten geerntet, mit PBS gewaschen, in 30 mM Histidin (pH=7.4) und 250 mM Saccharose (\pm 1% SDS) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (VirSonic600, Virtis, Gardiner, New York) homogenisiert.

3.10.1.1. Isolation ventrikulärer Mauskardiomyozyten

Die Herzen wurden entnommen und in 30 ml HEPES-gepuffertes DMEM gegeben. Unter der Sterilbank wurden die Zellen 2-3 mal geschwenkt und mit 10 ml frischem HEPES-gepuffertem DMEM gewaschen. Anschließend erfolgte die Überführung der Herzen in eine Petrischale, wo ca. 1 mm³ Stückchen geschnitten wurden. Die Atria wurden abgeschnitten und verworfen. Die Herzstückchen mitsamt DMEM-Medium wurden danach in eine Spinnerflasche gegeben. Unreines DMEM wurde vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und verworfen. Des Weiteren erfolgte die Zugabe der 0,02 mg/ml Kollagenase-Enzymlösung (mind. 10 ml, max. 20 ml). Der Vorverdau wurde für 5 min im Wasserbad bei 37°C unter minimalem Rühren durchgeführt. Danach wurde die Enzymlösung abgenommen und verworfen. Die Herzen rotierten weiterhin leicht in der Schwebe. Des Weiteren wurden 10 ml Enzymlösung zugegeben und für 7 min unter 37°C gerührt. Nach dem Absinken der Gewebestückchen wurden 6 ml (bzw. 16 ml bei 20 ml Verdau) mit der Pipette abgenommen und in einem Falcon mit 2 ml NCS (5% Serum vom neugeborenen Kalb) gemischt und damit zum Verdaustopp gebracht (bei 20 ml Kollagenase, 4 ml NCS).

3.10.2. Aufreinigung der rekombinanten Proteine CSQ^{NT/K206N}

Die Insektenzellen, infiziert mit CSQ^{NT}, wurden durch Ultraschallbehandlung homogenisiert. Die Homogenate wurden in eiskalten 100 mM Na₂CO₃ (pH=11.4) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 49,000 x g für 30 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde zu 50 mM MOPS, 500 mM NaCl und 1 mM DTT gegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Diese Mischung wurde dann auf eine Phenyl-Sepharose-Säule gegeben, wobei diese vorher mit Puffer A (10 mM MOPS, 0,1 mM EGTA, 500 mM NaCl, 1 mM DTT und 0,02% NaN₃, pH=7.0) equilibriert wurde. Die Säule wurde danach mit Puffer A gewaschen. Die Elution von CSQ^{NT} erfolgte mit Puffer A, der mit 10 mM CaCl₂ ergänzt wurde. Im Gegensatz dazu konnte CSQ^{K206N} nicht an die Phenyl-Sepharose-Säule gebunden werden. Daher wurden die Insektenzellen, infiziert mit CSQ^{K206N} und CSQ^{NT}, mit Ultraschall behandelt. Der Homogenisierungspuffer wurde ergänzt mit 10% Glycerol und 0,1% Triton X-100. Die Homogenate wurden dann bei 10,000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand zu einem TALON-Harz (Metall-Affinitäts-Harz, Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) für die Reinigung des rekombinanten Polyhistidin-markierten Proteins gegeben. Nach der Bindung des 6xHistidin-markierten CSQ^{NT/K206N} an das Harz wurde das Protein durch Applikation von 150 mM Imidazol eluiert. Die Identität beider Proteine konnte durch Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele und Immunoblotts bestätigt werden. Die rekombinanten Proteine konnten durch dieses Aufreinigungsverfahren ungefähr zu 90% gereinigt werden.

3.10.3. Konstruktion und Expression eines GST-TRD-Fusionsproteins

Ein GST-Fusionsprotein wurde aus Full-Length cDNA von Hunde-TRD hergestellt. Der pBluescriptII-Vektor mit dem Insert für TRD wurde von L.R. Jones (Indianapolis, IN, USA) bereitgestellt. Die TRD-cDNA wurde aus dem Vektor mit *EcoR* V und *Not* I ausgeschnitten und in die Enzymschnittstellen *Stu* I und *Not* I von pAcGHLT-A, einem Baculovirus-Transfer-Vektor mit einer 6xHistidin-Erkennungssequenz und einem GST-Tag, eingefügt. TRD wurde in Insektenzellen exprimiert und mit einer Ni-NTA (Ni²⁺-Nitrilotriacetic Acid)-Agarose, die spezifisch Proteine mit einem His-Tag bindet, gereinigt.

3.10.4. Messung von Ca^{2+} -Transienten an neonatalen Mauskardiomyozyten

Isolierte, neonatale Mauskardiomyozyten (siehe 3.10.1.) wurden in der Perfusionskammer eines inversen Mikroskops (Diaphot 200 Nikon, Tokio, Japan) für 10 min im Meßpuffer (siehe 7.1.) mit 25 μM Indo-1/AM und 2,5% Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Meßpuffer für 10 min perfundiert (2 ml/min), um überschüssigen Farbstoff aus dem Perfusionsbad zu entfernen (Yao et al. 1998). Die Zellen wurden durch Platin-Elektroden mit einer Frequenz von 0,5 Hz bei einer Spannung von 50 V elektrisch stimuliert. Die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der einzelnen Kardiomyozyten, welche im folgenden auch als Ca^{2+} -Transienten bezeichnet wird, wurde registriert (Abb. 3.2.). Die Messdaten wurden mit einem handelsüblichen Computersystem und der Software FelixTM (Ver. 1.1; PTI, Brunswick, New Jersey, USA) erfasst und ausgewertet.

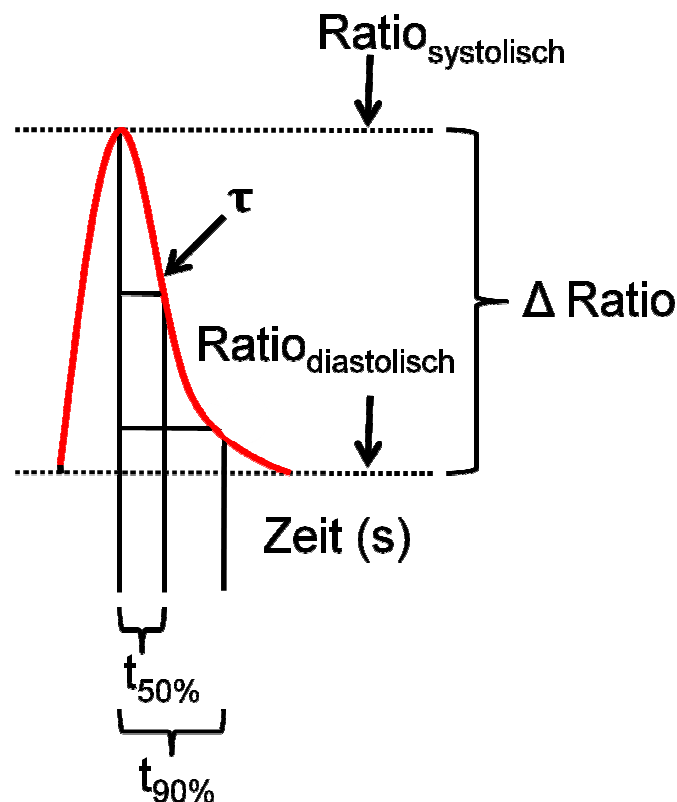


Abb. 3.2.: Graphische Darstellung eines einzelnen Ca^{2+} -Transienten

Es ist dargestellt ein einzelner Ca^{2+} -Transient, exemplarisch gemessen in einer Kardiomyozyte der neonatalen Maus, welche mit einer Spannung von 50 V und einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert wurde. Bei den Transienten wurde jeweils die diastolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{diastolisch}}$), die systolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{systolisch}}$), die Differenz

zwischen systolischer und diastolischer Ratio (Δ Ratio), die Zeit bis zum Abfall auf die halbmaximale relative Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} ($t_{50\%}$) und die Zeit bis zum Abfall auf 10 % der maximalen Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} ($t_{90\%}$) ermittelt. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wird als Quotient der Wellenlängen von 405 und 495 nm gemessen.

3.11. Ca^{2+} -Bindungstest

Die Ponceau-Färbung wurde mit TBS-Puffer (pH=7.4) von der Nitrozellulosemembran gewaschen. Die Membran wurde dann in 10 mM Imidazol (pH=6.8), 60 mM KCl und 5mM MgCl_2 für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran für 10 min mit 1 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /ml im gleichen Puffer unter Zusatz von 1 mM EGTA oder verschiedenen Ca^{2+} Konzentrationen (1 μM bis 1 mM) inkubiert. Die Membran wurde danach zweimal für je 5 min mit bidestillierten Wasser gespült, getrocknet und in PhosphorImager-Kassetten für fünf Tage exponiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte anschließend nach dem Scannen der Kassetten im PhosphorImager (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA).

3.12. SR- Ca^{2+} -Aufnahme

Die Aufnahme von Ca^{2+} in Mauserzhomogenate wurde mit $^{45}\text{CaCl}_2$ durch die Mikrofiltrations-Technik gemessen. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM MOPS (pH=7.0), 3 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 3 mM ATP, 5 mM NaN_3 , 10 mM Kaliumoxalat ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) und 50 μM CaCl_2 . Dem Reaktionsansatz wurden die Homogenate bei 37°C zugeführt. Die Reaktion wurde nach 1, 2, 3, 5 und 10 min durch Filtern der 40 μg Proteinaliquots durch 0,45 μm Filter (Promega, Mannheim, Deutschland) beendet. Dann erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 7,5 ml 150 mM NaCl. Durch Oxalat präzipitiertes $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wurde mittels Flüssigszintillation gemessen.

3.13. [^3H]Ryanodin-Bindungs-Untersuchung

Für die Detektion der [^3H]Ryanodin-Bindung an den RyR wurden 20 μg des homogenisierten Proteins von adenoviral infizierten Myozyten bei 37°C für 60 min in 20 mM MOPS (pH=7,1), 1 mM CaCl_2 , 0,6 M NaCl und 15 nM [^3H]Ryanodin inkubiert.

Nicht-spezifische Bindungen wurden im gleichen Puffer, ergänzt durch 10 μ M Ryanodin, ermittelt. Die Proben wurden filtriert, mit 150 mM NaCl gespült und die verbleibende Radioaktivität auf dem Filter quantifiziert.

3.14. Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe des Baculovirussystems

Das Baculovirussystem ist ein eukaryotisches Expressionssystem. Im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen sind die exprimierten rekombinanten Proteine in der Regel funktionell aktiv und verfügen über posttranslationale Modifikationen (z.B. Methylierung, Phosphorylierung, Acylierung, Glykosylierung). Auch Proteine mit hohem Molekulargewicht können exprimiert werden. Schließlich ist die simultane Expression verschiedener Gene möglich.

Die korrekte zoologische Bezeichnung des Baculovirus ist *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Es gehört zur Gruppe der Baculoviridae, einer Gruppe von DNA-Viren mit großem, doppelsträngigem Genom. Es infiziert verschiedene Insektenarten, nicht jedoch Vertebraten. Dies erleichtert die Handhabung und ist ein Vorteil bei der Expression onkogener oder toxischer Proteine.

Das Fremdgen kann wegen der Größe des Baculovirusgenoms nicht direkt inkloniert werden. Daher wird das Fremdgen zunächst in einen Transfervektor inkloniert, der homologe Bereiche des Baculovirusgenoms enthält. Nach Kotransfektion der Baculovirus-DNA und des Transfervektors in Insektenzellen wird das Fremdgen durch homologe Rekombination in die Baculovirus-DNA integriert. Das Fremdgen wurde an Stelle des Polyhedrin-Gens in das Baculovirus-Genom integriert. Polyhedrin ist ein Hüllprotein der Baculoviren, das in großer Menge in der späten Phase der Infektion gebildet wird. In der Natur werden die Baculoviren in Polyhedrin eingehüllt, um sie vor Austrocknung zu schützen und so ihre Verbreitung zu sichern. In vitro wird es nicht benötigt.

3.15. Kultur von Insektenzellen

Bei den Insektenzellen handelt es sich um eine Zelllinie aus Ovarienzellen der Art *Spodoptera frugiperda*, einer amerikanischen Schmetterlingsart (Vaughn et al. 1977). Es wurden Zellen der Zelllinie Sf9 (Invitrogen) verwendet.

3.15.1. Beginn der Insektenzellkultur

Die in 1 ml Gefriermedium enthaltenen 1×10^7 Zellen (Invitrogen) wurden mit 4 ml TNM-FH Medium (siehe 7.1.) in eine 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben und bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde 30 min und nochmals 24 h nach der Aussaat der Zellen gewechselt. Nach Ausbildung eines zusammenhängenden Zellrasens wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette gelöst und mit einer Zelldichte von $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml Medium in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.15.2. Kultur als Zellrasen

Die Insektenzellen wurden bis zur Ausbildung eines Zellrasens bei 27°C inkubiert. Das verbrauchte Medium wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zelldichte und Vitalität der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (0,4%ige Lösung, Life Technologies, Kalifornien, USA) bestimmt. Pro 25 cm²-Zellkulturflasche wurden $0,75 \times 10^6$ Insektenzellen ausgesät. Dies entsprach einer Zelldichte von $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml Medium.

3.15.3. Kultur in Suspension

100 ml TNM-FH mit 0,1% Pluronic^R F-68 (Gibco/Life Technologies) wurden mit $1,5 \times 10^8$ Zellen in einem verschließbaren Erlenmeyerkolben versetzt. Dies entsprach einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 27°C auf einem Rundschtüttler mit 90 Umdrehungen/min inkubiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden sie mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einen neuen Erlenmeyerkolben überführt und die Suspensionskultur fortgeführt.

3.15.4. Generierung der rekombinanten Baculoviren in Sf9-Insektenzellen durch homologe Rekombination

Transfektor und Baculovirus-DNA wurden in Sf9-Insektenzellen kotransfiziert. Durch Rekombination homologer Bereiche des Transfektors und der Baculovirus-DNA wurden die rekombinanten Baculoviren generiert (Abb. 3.3.). Die verwendete Baculovirus-DNA (Baculo Gold[®], Pharmingen) war vom Hersteller bereits linearisiert und die für die Replikation notwendigen DNA-Sequenzen waren deletiert. Erst durch Rekombination mit dem linearisierten Transfektor konnten vermehrungsfähige Baculoviren entstehen. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination und erleichterte die Selektion eines positiven Klons.

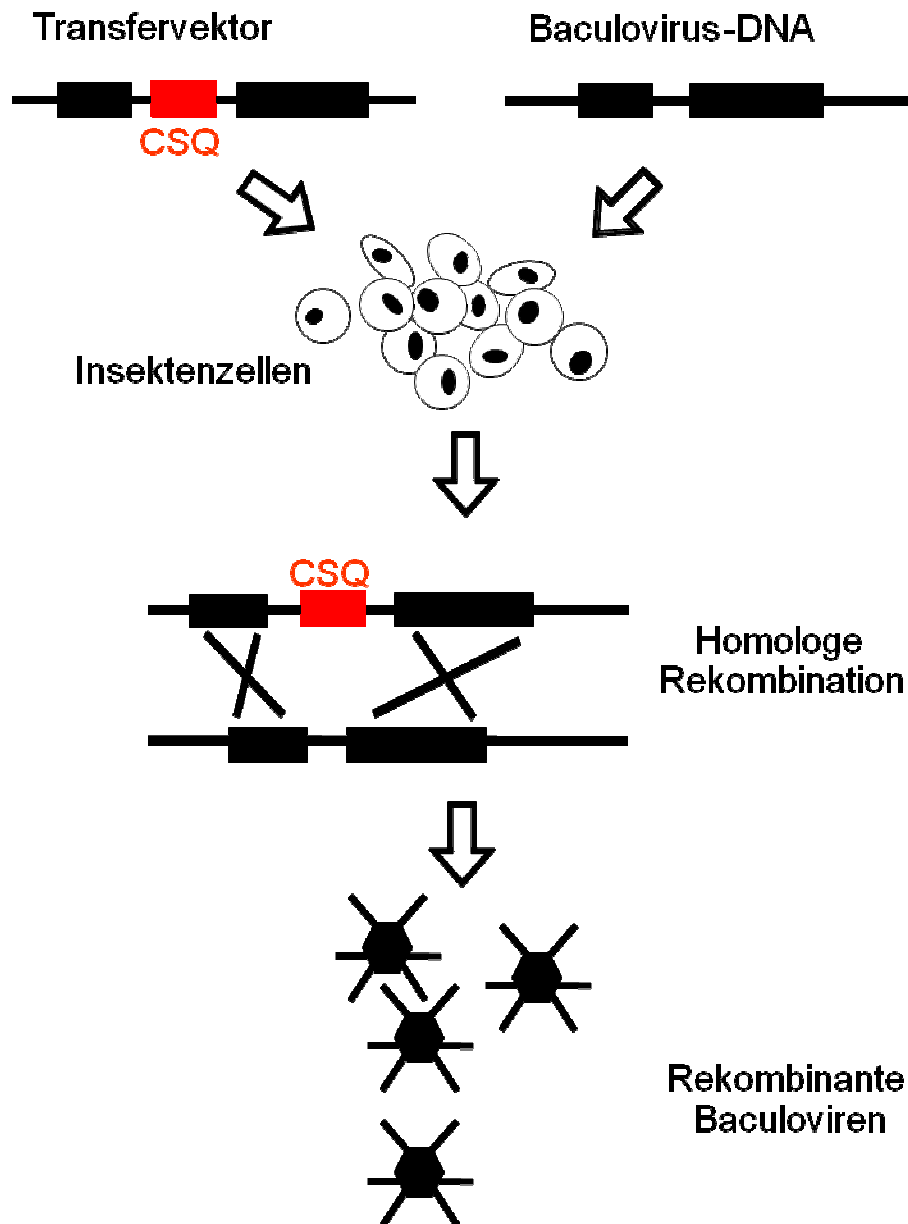


Abb. 3.3.: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren von CSQ

Der rekombinante Transfervektor und die linearisierte Baculovirus-DNA wurden in Sf9-Insektenzellen kotransfiziert. Durch Rekombination homologer DNA-Bereiche wurde das Fremdgen (hier CSQ) in das Virusgenom integriert. Es entstanden vermehrungsfähige, rekombinante Baculoviren, welche die cDNA für das Fremdgen enthielten.

3.16. Adenovirales Expressionssystem

Die verwendeten Adenoviren gehören zum Serotyp 5, einer Gruppe nicht-onkogener Adenoviren. Sie besitzen eine doppelsträngige, lineare DNA mit einer Länge von ca.

35 kb. Sie sind durch Deletion der Gene E1 und E3 nicht replikationsfähig. Die E1-Region ist an der Initiation der Transformation beteiligt. Das E1-Genprodukt ist für den Zusammenbau infektiöser Viren essentiell. Die E3-Region ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essentiell. Das E3-Genprodukt verhindert in vivo eine Immunität der Wirtszellen. E3-Deletionsmutanten unterscheiden sich in ihrer Replikationskompetenz nicht vom Wildtyp. Die Deletion des in vitro nicht notwendigen E3-Gens ermöglicht die Aufnahme von Fremdgenen bis zu 7.5 kb (Benihoud et al. 1999). Eine Vermehrung der Viren ist nur in Zelllinien möglich, welche die deletierten Gene E1 und E3 exprimieren und daher komplettieren können (Graham et al. 1977). Dazu gehören z.B. humane embryonale Nierenzellen (HEK 293).

Abb. 3.4. fasst schematisch die einzelnen Schritte zur Herstellung eines rekombinanten, replikationsdefizienten Adenoviruses mit Hilfe des AdEasy-Systems am Beispiel des Adenoviruses Ad-CSQ zusammen. Das zu exprimierende Fremdgen (z.B. CSQ^{NT}) wurde zunächst in einen Shuttle-Vektor einkloniert (He et al. 1998). Die direkte Einklonierung des Fremdgens in das AdEasy-Genom ist aufgrund fehlender singulärer Schnittstellen und aufgrund der Größe der DNA (36 kb) schwierig.

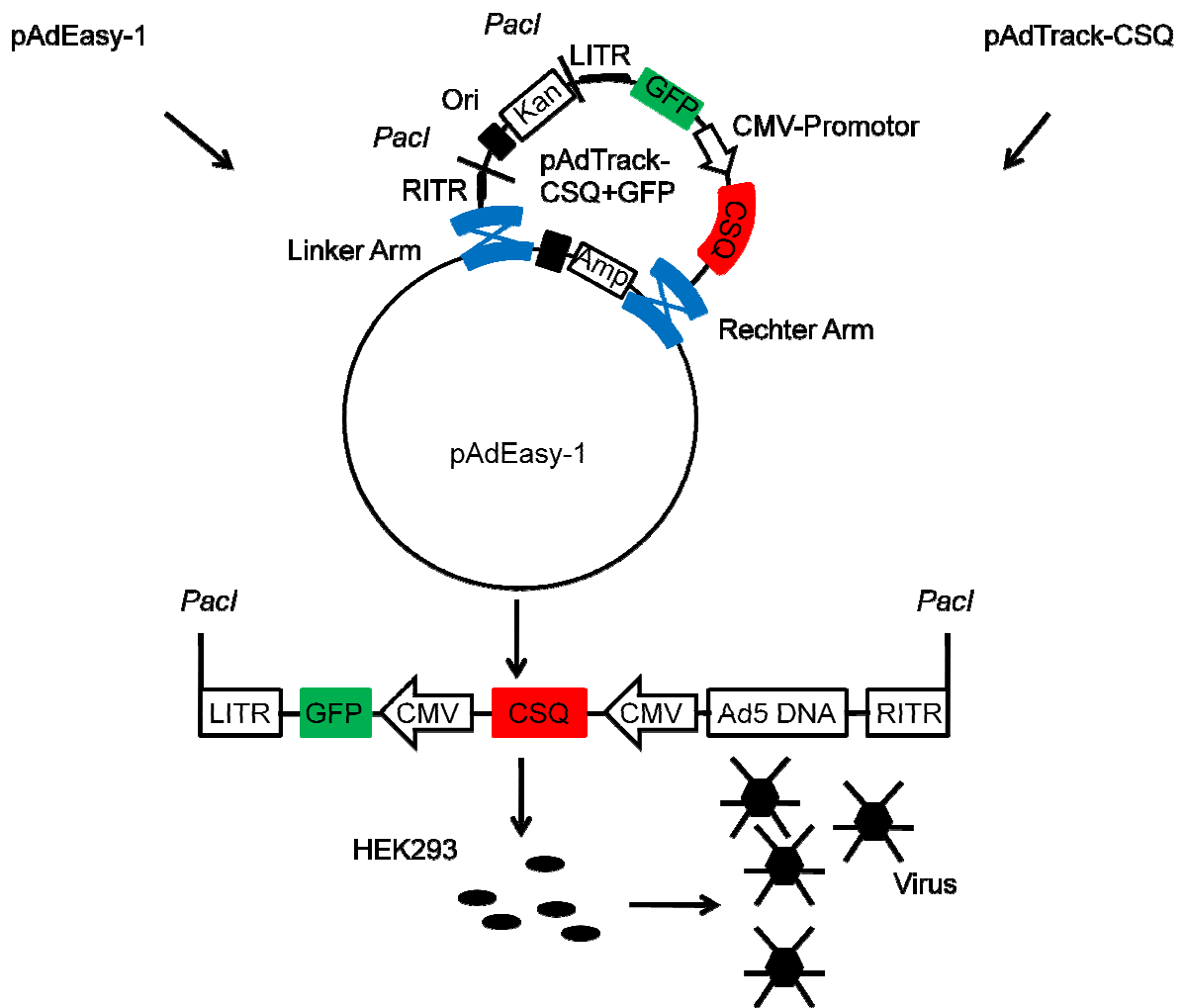


Abb. 3.4.: Schema der Generierung rekombinanter Adenoviren

Calsequestrin (CSQ) wurde in die multiple Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert. Das erhaltene Plasmid (pAdTrack-CSQ) wurde linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Co-Transformation in den *E.coli*-Stamm BJ5183 zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycin-Resistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektioniert. Das mit der Restriktionsendonuclease *Pac I* linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK293-Zellen transfiziert, welche in der Lage sind, die Deletionen ($\Delta E1$, $\Delta E3$) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Ad5 DNA, genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5; Amp, Ampicillinresistenzgen; CMV, Cytomegalievirus-Promotor; GFP, grün fluoreszierendes Protein; LITR/RITR, linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz; pA, Polyadenylierungssignal.

CSQ wurde in die multiple Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert. Der rekombinante Shuttle-Vektor pAdTrack-CSQ wurde mit dem Restriktionsenzym *Pme* I linearisiert. Durch Rekombination homologer Bereiche (linker und rechter Arm) des Shuttle-Vektors und der adenoviralen DNA (pAdEasy-1) wurde das Fremdgen in das Adenovirus-Genom eingefügt. Durch Linearisierung mit *Pac* I wurde die linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz (LITR, RITR) freigesetzt. Die Virus-DNA wurde in humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) transfiziert. Diese sind in der Lage, die Genprodukte der deletierten Bereiche (*E1* und *E3*) von pAdEasy-1 zu komplettieren und infektiöse, aber replikationsdefiziente Viren (AdCSQ-Viren) zu bilden. Als Reportergen diente das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).

3.16.1. Klonierung der Shuttle-Vektoren

pAdTrack-CSQ^{NT}

Die kodierende Sequenz (CSQ^{NT}) wurde mit *Kpn* I aus dem Baculovirus-Transfervektor pVL1393-CSQ^{NT} herausgeschnitten und in die Schnittstelle des Restriktionsenzym *Kpn* I der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert. pAdEasy-CSQ ist in Abb. 3.5. dargestellt.

pAdTrack-CSQ^{K206N/K180E}

Die kodierende Sequenz der CSQ-Mutanten CSQ^{K206N} und CSQ^{K180E} wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Hind* III aus dem Baculovirus-Transfervektor herausgeschnitten und in die *Kpn* I-*Hind* III-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert. pAdEasy-CSQ ist in Abb. 3.5. dargestellt. Als Kontrolle diente der Transfervektor pAdTrack-CMV ohne eingebautes Fremdgen (Ad-Ktr., Abb. 3.5.).

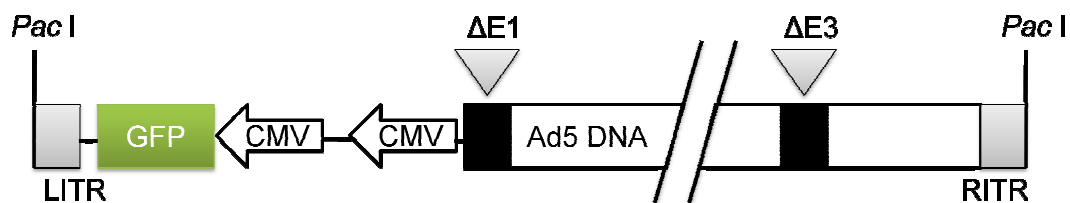
3.16.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen

Herstellung elektrokompetenter Zellen (*E. coli* BJ 5183)

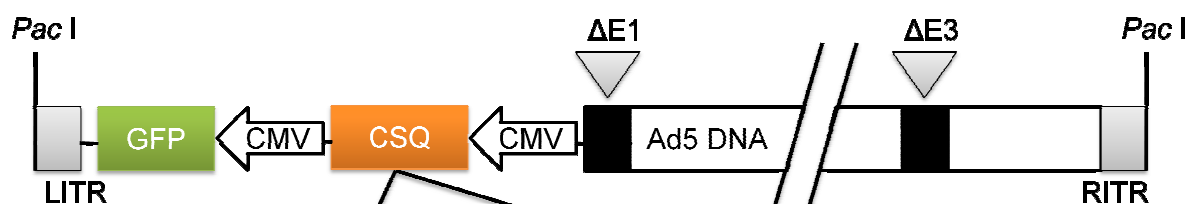
5 ml LB-Medium wurden mit 50 µl *E. coli* BJ5183 inkubiert und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bei 37°C und 180 rpm inkubiert bis eine optische Dichte von

0,6 bis 0,8 bei 578 nm erreicht wurde. Die Kultur wurde für 1 h auf Eis gestellt und anschließend bei 2.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellrückstand zweimal in 100 ml Waschpuffer (10% Glycerol in sterilem bidestilliertem Wasser) gewaschen. Der gewaschene Zellrückstand wurde in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Davon wurden 19 ml Waschpuffer abgenommen und der Zellrückstand in dem verbleibenden Waschpuffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Ad-Ktr.



Ad-CSQ



		206		
CSQ-NT	5´-AAA GGG GTT GCA AAG AAA TTG TCC TTG AAG-3´			
	Lys Gly Val Ala Lys Lys Leu Ser Leu Lys			
CSQ-K206N	5´-AAA GGG GTT GCA AAG AAC TTG TCC TTG AAG-3´			
	Lys Gly Val Ala Lys Asn Leu Ser Leu Lys			
		180		
CSQ-NT	5´-GAG TCA GAG TAT TAT AAG GCT TTT GAG GAG-3´			
	Glu Ser Glu Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Glu			
CSQ-K180E	5´-GAG TCA GAG TAT TAT GAG GCT TTT GAG GAG-3´			
	Glu Ser Glu Tyr Tyr Glu Ala Phe Glu Glu			

Abb. 3.5.: Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der generierten rekombinanten Adenoviren, die durch homologe Rekombination des pAdTrack-CMV-Transfervektors mit pAdEasy-1 und anschließender Linearisierung durch die Restriktionsendonuclease *Pac* I erhalten wurden. Die DNA- und Proteinsequenzen der Mutationen CSQ^{K206N} und CSQ^{K180E} sind mit den veränderten Basentriplets rot dargestellt. NT steht für die Native Form der CSQ-cDNA.

Linearisierung der DNA mit *Pme* I

Die rekombinanten Vektoren pAdTrack-CSQ^{NT} und pAdTrack-CSQ^{K206N} wurden mit *Pme* I linearisiert. Dazu wurden 30 µg des rekombinanten pAdTrack zunächst für 2 h mit jeweils 20 U *Pme* I verdaut. Nach 2 h wurden nochmals 20 U *Pme* I zugegeben. Eine Rekombination kann nur erfolgen, wenn der pAdTrack-Vektor vollständig geschnitten ist. *Pme* I wurde hitzeinaktiviert, die linearisierte DNA mit einem NaAc/Ethanol-Gemisch ausgefällt, in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und die 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP) in einer Endkonzentration von 1,5 U/µl für 1,5 h bei 37°C dephosphoryliert. Die CIP wurde für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert.

Phenolextraktion

Um die Proteine des Restriktionsverdau zu entfernen, wurde die DNA durch eine Phenolextraktion gereinigt. Das Volumen der Ansätze wurde mit sterilem Wasser auf 200 µl erhöht. Anschließend wurden 200 µl gesättigtes Phenol (pH 7,9) zugegeben. Dieses Gemisch wurde geschüttelt und für 5 min bei 15.800 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 200 µl Chloroform/Ethanol (1:1) ausgeschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und die darin enthaltene DNA mittels NaAc/Ethanol-Fällung präzipitiert. Die DNA-Rückstände wurden in insgesamt 60 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Proben auf einem 1%igen TAE-Agarosegel (siehe 7.1.) geladen und nach der Gelelektrophorese mit einem Massenstandard verglichen.

Elektroporation

100 ng pAdEasy-1 wurden mit 500, 600, 700, 800 und 900 ng linearisierten und aufgereinigten AdTrack-Konstrukten (pAdTrack-CSQ^{NT} und pAdTrack-CSQ^{K206N})

gemischt. Jeder Ansatz wurde mit 40 µl der elektrokompetenten *E. coli* BJ 5183 gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Gene Pulser[®]-Küvette, Biorad). Als Kontrollen dienten ein Ansatz, der nur 100 ng pAdEasy-1 sowie ein Ansatz, der 100 ng des rekombinanten pAdTrack enthielt. Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer (Gene Pulser[®], Biorad) bei 2500 V, 200 Ohm und 25 µF. Auf den elektroporierten Ansatz wurden sofort 500 µl SOC-Medium (siehe 7.1.) gegeben, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. An Stelle des sonst üblichen LB-Mediums wurde SOC-Medium verwendet, um das Wachstum der Zellen zu fördern und so die Effizienz der Elektroporation zu steigern. Die Zellsuspension wurde aus den Küvetten in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und bei 37°C und maximaler Schüttelfrequenz (Thermomixer) für 60 min geschüttelt. Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Diese enthielten für den Kontrollansatz, der nur pAdEasy-1 enthielt, 100 µg/ml Ampicillin, für alle übrigen Ansätze 50 µg/ml Kanamycin. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Selektion eines rekombinanten Klons

Von den Platten wurden 20 bis 60 Klone gepickt. Diese wurden zunächst in 20 µl steriles bidestilliertes Wasser gegeben, anschließend in 2 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt. 20 µl davon wurden in eine PCR zum Nachweis von pAdEasy eingesetzt. Der PCR-Ansatz bestand aus 20 µl Wasser (mit gepickter Kolonie), 1x PCR-Enhancer (TaqMaster, Eppendorf), 40 mM dNTP (10 mM/Nukleotid), 50 pmol des Primers AdEasy-forward, 50 pmol des Primers AdEasy-reverse, 0,06 U Eppendorf Master Taq-Polymerase in 1x PCR-Puffer (Eppendorf). Die Primersequenzen und das verwendete PCR-Programm sind in Tab. 7.1. angegeben.

Aus den über Nacht geschüttelten Kulturen wurden positive Klone entnommen, die DNA isoliert und durch nochmalige PCR auf pAdEasy bzw. CSQ überprüft. Die zum Nachweis von CSQ verwendeten Primer und das PCR-Programm sind in Tab. 7.3. angegeben. Der PCR-Ansatz war analog dem der pAdEasy-PCR zusammengesetzt. Ein positiver Klon wurde in einen anderen *E. coli*-Stamm (XL1 Blue) mittels Elektroporation umtransformiert. Die DNA wurde präparativ gewonnen. Der Klon wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Pac* I, *Spe* I und *Bam*HI überprüft.

3.16.3. Generierung des Virus in HEK293-Zellen

3.16.3.1. Anzucht und Kultur von HEK293-Zellen

Zur Kultivierung von HEK293-Zellen wurden bei -80°C gelagerte HEK293 Zellen durch schnelle Zugabe von 1 ml vorgewärmtem HEK-Medium (siehe 7.1.) aufgetaut und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml HEK-Medium gegeben. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz bei 37°C in einem Inkubator bei 5% CO₂ kultiviert. Die Zellpassage erfolgte bei ca. 95% Konfluenz im Verhältnis 1:3 (ein Teil der Zellen abgenommen und 3 Teile HEK-Medium zugegeben).

Vorbereitung der DNA für die Transfektion

Die zu transfizierende DNA (pAdEasy-CSQ^{NT} bzw. pAdEasy-CSQ^{K206}) wurde zunächst mit *Pac*I linearisiert. Dazu wurden 10 µg DNA mit 20 U *Pac*I für 4 h bei 37°C geschnitten. Danach wurde das Enzym hitzeinaktiviert (80°C, 20 min). Die DNA wurde mittels NaAc/Ethanol-Präzipitation ausgefällt, um Proteine zu entfernen. Die gefällte DNA wurde in sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der Gehalt wurde photometrisch ermittelt.

Transfektion

Zur Transfektion wurden 5 µg des linearisierten pAdEasy-CSQ^{NT} bzw. pAdEasy-CSQ^{K206N} in 150 µl DMEM (Sigma) vorgelegt und mit 30 µl Superfect[®] (Qiagen) gut gemischt. Der Ansatz wurde zur Bildung von Mizellen für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde zum Transfektionsansatz 1 ml HEK-Medium (siehe 7.1.) gegeben. Diese Mischung wurde vorsichtig auf die zu 70% konfluenten HEK-Zellen in einer 25 cm²-Schale gegeben und der Ansatz für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 9 ml HEK-Medium zugegeben und der Ansatz im Brutschrank mehrere Tage inkubiert bis einige Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht eine grüne GFP-Fluoreszenz (GFP, grün fluoreszierendes Protein) zeigten. Die Expression des GFP war das Zeichen für eine erfolgreiche Transfektion.

Ernte der Zellen

Zum Zeitpunkt der Ernte sah man an einigen Zellen eine grüne Fluoreszenz. Die Zellen wurden im Medium mit einer Pipette vom Boden abgelöst und bei 51 x g (RT, 4 min) abzentrifugiert (Zentrifuge Universal 16 R). Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS+Mg²⁺ (siehe 7.1.) gewaschen und in 300 µl 100 mM HEPES, pH 7.4 (siehe 7.1.)

resuspendiert. Das in HEPES gelöste Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang wurden die Zellen aufgebrochen und die Viren freigesetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die lysierten Zellbestandteile wurden bei 91 x g für 4 min abzentrifugiert und der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert.

Erste Infektion

Eine 75 cm²-Schale mit 75% konfluenten HEK293-Zellen wurde mit 50 µl des Überstandes der Transfektion infiziert. Die Infektion erfolgte in 2 ml DMEM + Pen/Strep (siehe 7.1.) ohne Serum für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden 20 ml HEK-Medium hinzugegeben und die Schale bei 37°C inkubiert bis einige Zellen unter der UV-Lampe grün fluoreszierten (4 bis 7 Tage).

3.16.4. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung

Die Zellen der ersten Infektion wurden wie oben beschrieben geerntet. Zur Amplifikation wurden zu 75% konfluente HEK293-Zellen in 75 cm²-Schalen mit je 10 µl Viruslösung der ersten Infektion infiziert (siehe 3.16.3.1.). Bereits nach einem Tag fluoreszierten einige Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht. Die Zellen wurden geerntet, als ca. 80% der Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigten. Die Zellen aus der Schale wurden in 1 ml 100 mM HEPES, pH 7.4 lysiert. Zur weiteren Vermehrung des Virus wurden weitere 75 cm²-Schalen mit je 5 µl des Überstandes der ersten Amplifikation infiziert. Nach 3 - 5 Tagen leuchteten alle Zellen grün. Die Zellen wurden in 5 ml 100 mM HEPES, pH 7.4 lysiert. Das Virus wurde in dieser Weise weiter amplifiziert, wenn der Titer nicht ausreichend hoch (ca. 10⁸ bis 10¹⁰ IU/ml) war.

3.16.4.1. Vorbereitung der Zellen zur Titerbestimmung

HEK293-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 70% wurde die Infektion vorgenommen.

Infektion der Zellen zur Titerbestimmung

Zur Infektion wurden Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ der Virusstammlösung in serumfreiem HEK-Medium hergestellt. In jede Kammer wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Um den Zellrasen nicht zu

schädigen, wurde darauf verzichtet, das serumhaltige Medium vor der Infektion abzunehmen. Pro Verdünnung wurden 10 Kammern infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität wurden einige Kammern nicht infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Schalen ausgewertet. Dabei wurde die GFP-Expression der Viren betrachtet. Eine Kammer zählte als positiv, wenn mindestens eine Zelle bei Betrachtung unter UV-Licht grün leuchtete.

Auswertung der Titerbestimmung

Es wurde die Anzahl positiver Kammern pro Verdünnung ausgezählt. Die niedrigste Viruskonzentration, die nach diesem Zeitpunkt ein vollständiges Ablösen der Zellen vom Boden auslöst, entspricht einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 10. Die MOI gibt das Verhältnis von Viruszahl (IU) zu Zellzahl wieder. Damit ist eine vergleichbare Infektion mit den verschiedenen Adenoviren möglich.

3.17. Deglykosylierung der Glykoproteine mittels Glykosidase

3.17.1. Deglykosylierung mittels Endoglykosidase H (Endo H)

Die Myozyten wurden mit den rekombinanten Adenoviren infiziert und in einen Endo H-Puffer (50 mM Natrium-Citrat, (pH=5,5) und 0,5% SDS) homogenisiert. Die Proben wurden für 3 min gekocht und auf 37°C equilibriert. Nach Zugabe von 0,2 M PMSF (Proteaseinhibitor) wurden die Glykoproteine mit 15 mU Endo H (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) bei 37°C für 7,5 oder 15 min deglykosyliert. Die Probe wurde parallel zu einer unbehandelten Probe auf ein SDS-Gel geladen, nachdem die Reaktion mit 15% GDM-Puffer gestoppt wurde.

3.18. Pull-Down-Assay

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte durch einen Pull-Down Assay. Der Pull-Down-Assay ist eine in vitro-Technik, bei der in der vorliegenden Arbeit ein Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein verwendet wird, um einen potentiellen Bindungspartner zu identifizieren. Hierzu wird zunächst das GST-Fusionsprotein an eine immobilisierte Glutathion-Sepharose-Säule gebunden. Anschließend wird diese Säule mit einem Lysat der zu untersuchenden Proteine

inkubiert. Proteine, die mit dem an GST fusionierten Proteinen interagieren können, binden an die Säule, während alle weiteren nicht-interagierenden Proteine durch Waschen entfernt werden können. Im letzten Schritt des Assays werden das Fusionsprotein und seine Bindungspartner von der Säule eluiert und mittels Standard-SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse identifiziert.

Für die Untersuchung wurde das Fusionsprotein GST-TRD an eine Glutathionsäule gekoppelt. Vor dem Einsatz der Glutathion-„Beads“ (Perlen) wurden diese vom Ethanol gereinigt. Dazu wurden die „Beads“ zweimal mit dem 5-10fachen „Bead“-Volumen PBS-Waschpuffer gewaschen und anschließend bei 500 x g für 3-5 min zentrifugiert. 1 ml gereinigte Glutathion-„Beads“ und 5 mg des GST-Fusionsproteins wurden für 1 h bei 4°C inkubiert. Die „Beads“ wurde n danach bei 500 x g für 3-5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die SDS-PAGE aufgehoben. Die „Beads“ wurden dann 2 x mit dem 5fachen „Bead“-Volumen PBS-Waschpuffer gewaschen und erneut bei 500 x g für 3-5 min zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 300 µg CSQ^{NT} bzw. CSQ^{K206N} zum gekoppelten GST-TRD. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf der Rotierscheibe in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ oder 1 mM EGTA. Danach wurden die „Beads“ mit PBS-Waschpuffer gewaschen und erneut bei 500 x g für 3-5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Fusionsprotein GST-TRD eluiert. Dazu wurde ein 1 x „Bead“-Volumen GST-Elutions-Puffer auf die „Bead-Matrix gegeben, vorsichtig gemischt, und für 2 min bei RT inkubiert und bei 500 x g für 3-5 min zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt. Schließlich wurden die eluierten Fraktionen gesammelt, gepoolt und auf ein 8%iges Porziogel aufgetragen.

3.19. Bestimmung der Aminosäuresequenzen und Zuckerreste mittels

Massenspektrometrie

Das Verfahren basiert auf einem sogenannten Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Q-TOF-Massenspektrometer). Üblicherweise werden Proben für die Q-TOF-Massenspektrometrie als Lösung zugeführt. Diese wird mit Hilfe eines zugeführten Gases vernebelt, und aus den winzigen Tröpfchen entstehen charakteristische Ionen, die das Q-TOF-Gerät misst. Die Untersuchungen und das Spektrometer (Q-TOF Micro-Hybrid Quadrupol-Orthogonal Time of Flight Mass

Spectrometer) wurden freundlicherweise zusammen mit Prof. G. Pohlentz, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, UKM Münster durchgeführt.

Die Experimente zur Analyse der Spezies und Anzahl von Zuckerresten wurden mit einem Quadrupol-Flugzeit (Q-TOF)-Hybridmassen-spektrometer durchgeführt. Die wesentliche Komponente des Q-TOF ist ein Quadrupol-Massenanalysator. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) können Aminosäuresequenzen von Peptidionen bestimmt werden. Es kommt zu einer Fragmentierung der Peptidbindungen entlang der Peptidkette.

3.20. Statistische Auswertung

Aus mehreren unabhängigen Einzelversuchen wurde das arithmetische Mittel und der dazugehörige Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet und als Mittelwert \pm SEM angegeben. Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student für unverbundene Stichproben ermittelt. P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als signifikant bewertet. Bei einem Vergleich von drei und mehr Gruppen wurde die statistische Signifikanz durch einen ANOVA-Test berechnet, an den sich ein F-Test für verbundene und unverbundene Stichproben anschloss (Wallenstein et al. 1980).

3.21. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Zucht und Haltung von genetisch veränderten Mäusen und zur Durchführung der Tierversuche und Organentnahmen lagen vor (Genehmigungsnummer G 83/04 und A31/97 des Regierungspräsidenten Münster).

Die gentechnischen Arbeiten erfolgten gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz-GenTG) vom 16. Dezember 1993 unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und -maßnahmen. Die

Genehmigung bzw. Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

4. Ergebnisse

4.1. Überprüfung der CSQ^{D307H}-Überexpression in den gentechnisch veränderten Mäusen

Um die physiologischen Effekte der CSQ-Mutation D307H im Herzen zu untersuchen, wurden transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression des mutierten Proteins (TG^{D307H}) generiert. Die DNA-Synthese und Mutagenese erfolgte im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster. Die Klonierung in den α -MHC-Vektor sowie die Generierung der CSQ^{D307H}-transgenen Maus übernahm das IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Core Unit Prof. Dr. Brosius). Mittels PCR wurden drei positive Stammtiere ermittelt (Mauslinien #11, #17 und #19). Zusätzlich wurde mittels α -MHC-Promotor die native Form von CSQ (TG^{NT}) in zwei transgene Mauslinien exprimiert (Mauslinien #3 und #8) und durch PCR bestätigt. Hierzu wurde aus Schwanzbiopsien der Tiere die genomische DNA isoliert und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Primer und das PCR-Programm sind dem Anhang (siehe 7.1.) zu entnehmen. CSQ^{D307H}-transgene und CSQ^{NT}-transgene Mäuse zeigten ein PCR-Produkt von 286 bp bzw. 410 bp (Abb. 4.1.).

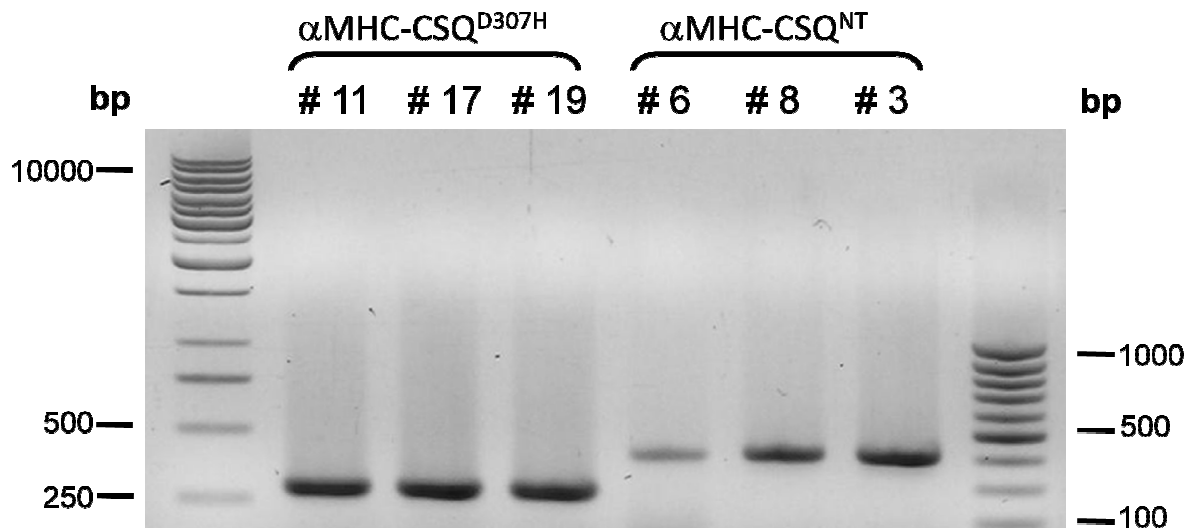


Abb. 4.1.: Agarosegel zur Identifizierung transgener CSQ-Mäuse

Dargestellt ist ein 1%iges Agarosegel zur Identifizierung der PCR-Produkte. Mäuse, denen das Transgen weitervererbt wurde, zeigten für TG^{D307H} und TG^{NT} ein PCR-Produkt von 286 bp bzw. 410 bp. # 6 dient zur Kontrolle. Zum Größenvergleich wurde eine 1kb-DNA-Leiter als Standard aufgetragen.

Durch Western Blot-Analyse wurden die Unterschiede in der Expression des transgenen CSQ (TG^{D307H} und TG^{NT}) im Vergleich zum WT-Protein untersucht. Hierzu wurden 3-4 Wochen alten Mäusen aller transgenen Linien und WT-Tieren die Herzen entnommen und Homogenate hergestellt und dann CSQ mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 4.2.). In den Herzhomogenaten der transgenen Mauslinien wurde eine erhöhte CSQ-Expression nachgewiesen. So war die CSQ-Expression der TG^{D307H} -Linien #11, #17 und #19 um das 6,4-, 8,6- und 6,6-fache im Gegensatz zum WT erhöht. In den transgenen Mauslinien mit Überexpression der nativen Form des CSQ (TG^{NT}) zeigte die Linie #3 eine 5-fache Überexpression im Vergleich zum WT. Da der Founder #8 keine Überexpression aufwies, wurde nur die Mauslinie #3 näher charakterisiert.

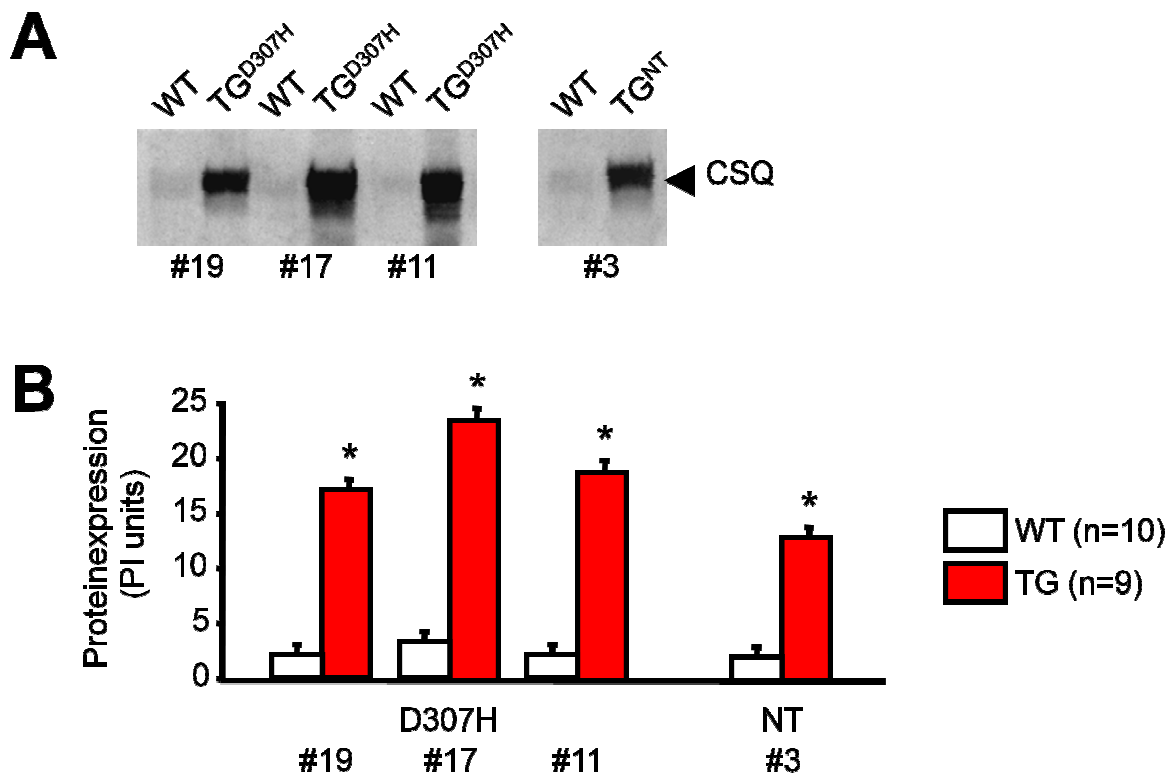


Abb. 4.2.: Überexpression von CSQ^{D307H} und CSQ^{NT} in den generierten Stamm-Mäusen

Dargestellt ist ein Western Blot zum Nachweis der Protein-Überexpression von CSQ^{D307H} und CSQ^{NT} in den Linien #19, #17, #11 bzw. 3 (**A**) sowie die Quantifizierung der immunologischen Signale (**B**) mit Hilfe eines Phosphorimagers. * $p < 0.05$ vs. WT

Es konnten somit zwei Mauslinien etabliert werden, bei denen jeweils die DNA stabil in das Genom der Mäuse integriert wurde und auf Proteinebene eine CSQ-Überexpression auftrat.

4.2. Vergleich der Herz-Morphologie von CSQ-transgenen und WT-Tieren

Die Überexpression von CSQ^{D307H} führte zu einer kardialen Hypertrophie (Abb. 4.3.). Allerdings kam es zu einem unterschiedlichen Grad an kardialer Hypertrophie in allen drei Mauslinien. Hierbei beobachteten wir eine starke Hypertrophie in Founder-Linie #19 (Herzgewicht/Tibiallänge: $17,7 \pm 1,7$ mg/mm und $7,6 \pm 0,3$ mg/mm in TG bzw. WT, $n=9-17$, $p < 0,05$), wohingegen die Linie #17 nur eine geringe Zunahme des Herzgewichtes aufwies (Herzgewicht/Tibiallänge: $9,9 \pm 0,5$ mg/mm und $7,8 \pm 0,7$ mg/mm in TG bzw. WT, $n=9$, $p < 0,05$). Founder #11 zeigte eine vergleichbare

Hypertrophie wie in den Mäusen der Linie #3, welche CSQ^{NT} überexprimierten. Somit wurden für die weiteren Versuche die Tiere der Linie #11 (CSQ^{D307H}) und der Linie #3 (CSQ^{NT}) verwendet. Es gab bezogen auf das Körpergewicht auch deutliche Abweichungen im Herzgewicht ($7,0 \pm 0,7$ mg/g, $7,2 \pm 0,4$ mg/g und $4,9 \pm 0,1$ mg/g in CSQ^{D307H}, CSQ^{NT} bzw. WT, n=4-10, p<0,05). Die folgenden Untersuchungen wurden jeweils an 3-4 Monate alten Tieren durchgeführt. Es wurden immer transgene Tiere mit Wildtyp-Geschwistertieren als Kontrolle verglichen.

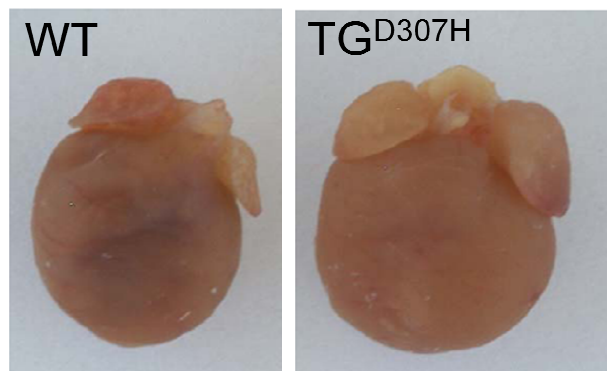


Abb. 4.3.: Morphologischer Vergleich der Herzen CSQ^{D307H}-transgener Tiere und WT-Tiere (Geschwister)

Gezeigt wird der morphologische Vergleich der Herzen nach Organentnahme (WT und TG^{D307H} im Alter von 12 Wochen) mit einer deutlichen Hypertrophie der transgenen Herzen der Founderlinie #11.

Die Hypertrophie in den Linien konnte ebenfalls in den Vorhöfen der transgenen Mäuse beobachtet werden. Die Mäuse der Linien #11 und #3 hatten Anzeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz, die sich in einem Lungenödem äußerte.

Ebenfalls erwähnenswert ist das Auftreten von Kavernen, die wir in der Ventrikelwand der transgenen Founder-Mauslinie #19 beobachteten (siehe Abb. 4.4.). Diese Linie wurde aber biochemisch und physiologisch nicht weiter charakterisiert.

4.3. Histologie an transgenen Mäusen

Die morphologische Untersuchung der Herzen CSQ-transgener Tiere zeigte makroskopisch in beiden Tierlinien (TG^{D307H} und TG^{NT}) vergrößerte Ventrikel im Vergleich zu den WT-Tieren. In den Kardiomyozyten zeigte sich ein Färbungsmuster, das der sarkomeren Struktur ähnelt (Abb. 4.4.).

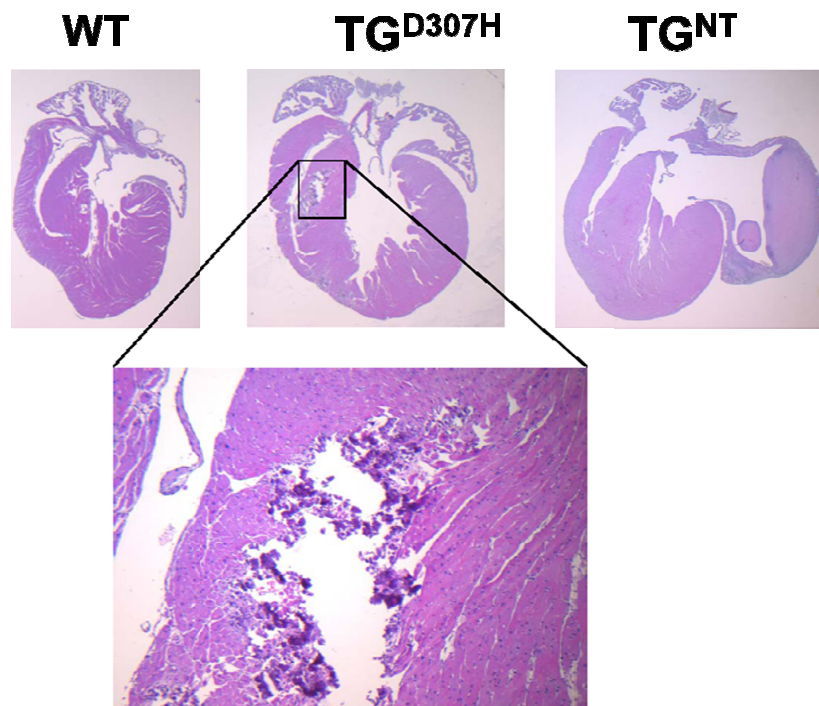


Abb. 4.4.: Histologischer Vergleich der Herzen CSQ-transgener Tiere und entsprechender WT-Geschwistertiere nach Organentnahme

Dargestellt ist die repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Herzen CSQ-transgener und vergleichbarer WT-Tiere.

Die Übersichtsvergrößerung zeigt im vergrößerten Ausschnitt das Auftreten von Kavernen in der Ventrikelwand der transgenen Mauslinie (#19).

4.4. Bestimmung der Überlebensrate

Die statistische Analyse der Überlebensrate erfolgte an Hand der Zuchtdokumentationen mittels einer Sigmaplot®-Software mit statistischer Analyse durch den „Log Rank-Test“. In beiden transgenen Mauslinien mit herzspezifischer Expression von CSQ^{D307H} und CSQ^{NT} war die mittlere Überlebensdauer, verglichen mit WT-Geschwistertieren, erniedrigt. Wie Abb. 4.5. zeigt, wiesen die transgenen Linien CSQ^{NT} und CSQ^{D307H} eine höhere Mortalität als WT auf.

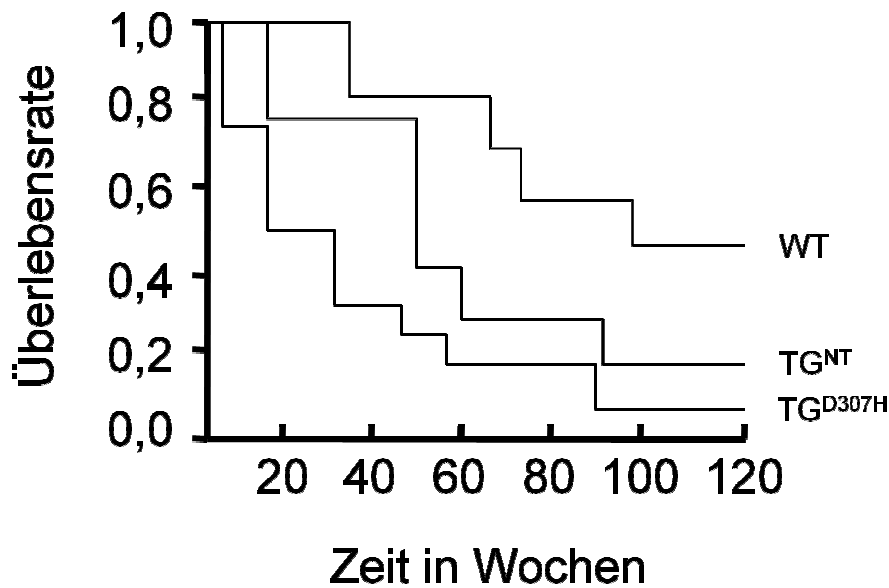


Abb. 4.5.: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit

Dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven der zwei transgenen Mauslinien TG^{D307H} und TG^{NT} (Linie #11 und #3) mit herzspezifischer Überexpression von mutiertem bzw. nativem CSQ im Vergleich zu WT-Tieren. Die Analyse startet mit 73 WT, 25 TG^{NT} und 75 TG^{D307H} von denen im Beobachtungszeitraum von 120 Wochen 33 WT, 24 TG^{NT} sowie 57 TG^{D307H} spontan verstarben. Die Mortalität der CSQ-transgenen Mäuse war gegenüber den WT-Tieren signifikant erhöht. Zwischen TG^{NT} und TG^{D307H} bestand keine signifikante Erhöhung der Mortalität ($p < 0,05$ vs. WT).

4.5. Untersuchung der Herzfunktion

4.5.1. Messung der Hämodynamik

Die Herzfunktion wurde mittels invasiver Hämodynamik durch linksventrikuläre Kathetertechnik bestimmt. Die Herzkatheter-Messungen wiesen einen vergleichbaren maximalen linksventrikulären Blutdruck (LVP) in TG^{D307H} (82 ± 3 mmHg) und WT (90 ± 4 mmHg) und einen verminderten LVP in TG^{NT} (63 ± 2 mmHg) im Vergleich zu TG^{D307H} und WT auf ($n=4-5$, $p < 0,05$, 14 Wochen alt).

Unter basalen Bedingungen zeigten sich bei der Bestimmung der Herzfrequenz zwischen Tieren beider transgener CSQ-Linien und WT-Tieren keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Eine Stimulation mit Isoprenalin führte allerdings bei den CSQ^{D307H}-Tieren (460 ± 22 bpm, $n=4$, $p < 0,05$) nicht zu einer Zunahme der Herzfrequenz wie bei den CSQ^{NT}- (547 ± 21 bpm) und WT-Tieren (543 ± 15 bpm). Der positiv chronotrope Effekt von Isoprenalin ist somit bei den CSQ^{D307H}-Tieren gestört.

4.5.2. Hämodynamische Untersuchungen

Während hämodynamischer Untersuchungen der Herzfunktion konnten wir einen Alternans in TG^{D307H} -Tieren beobachten. Ein elektrischer Alternans zeichnet sich durch eine Variation in der Amplitude der T-Welle im EKG aus. Der T-Wellen Alternans ist mit einer erhöhten Anfälligkeit für ventrikuläre Tachyarrhythmien assoziiert und stellt somit ein Risiko für den plötzlichen Herztod dar. Der Alternans wurde basal und unter Isoprenalin-Stimulation in den Herzen der TG^{D307H} -Tiere detektiert, zeigte sich jedoch nicht in TG^{NT} - und WT-Tieren (Abb. 4.6.).

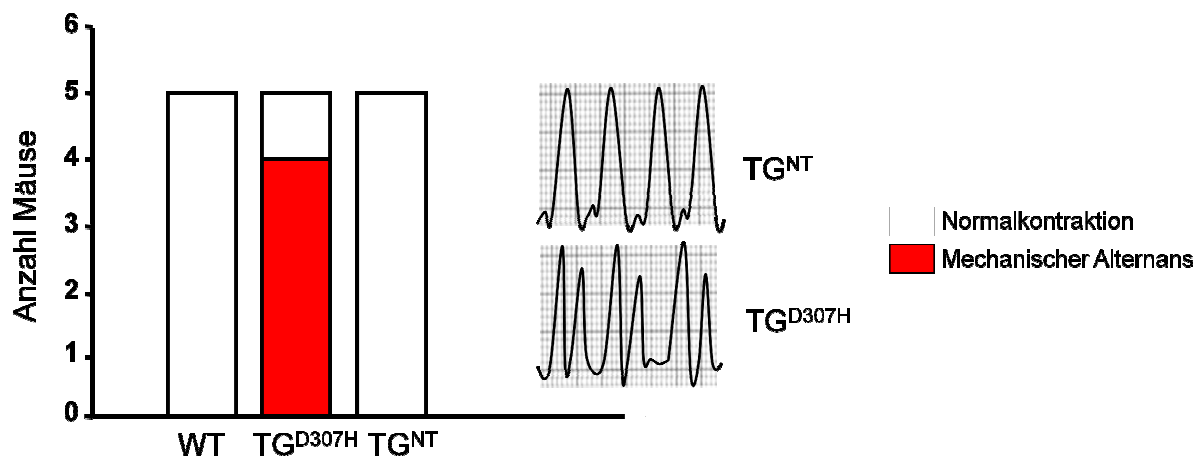


Abb. 4.6.: Hämodynamik an den transgenen Mäusen

Ein mechanischer Alternans zeigte sich unter basalen Bedingungen in vier von fünf CSQ^{D307H} -Tieren während hämodynamischer Untersuchungen, aber nicht in CSQ^{NT} - und WT-Tieren.

4.5.3. Echokardiographische Untersuchungen

Eine weitere physiologische Charakterisierung der CSQ^{D307H} -transgenen Mäuse erfolgte mittels Echokardiographie am lebenden Tier. Es wurde u.a. der linksventrikuläre Durchmesser während der Systole und Diastole bestimmt.

Somit wurde das Verhältnis von systolischem und diastolischem Durchmesser des linken Ventrikels als Maß der Kontraktilität bestimmt, die sogenannte Ventrikelverkürzung (fractional shortening, FS). Hierbei zeigte die Untersuchung an acht Wochen alten Tieren eine weniger starke Zunahme des FS bei den CSQ^{D307H} -Tieren verglichen mit den CSQ^{NT} - und WT-Tieren nach Applikation von Isoprenalin (Abb. 4.7.). Auch war die Geschwindigkeit der Umfangsverkürzung des linken

Ventrikels (Vcf, velocity of circumferential shortening) bei den CSQ^{D307H}-Tieren im Vergleich zu CSQ^{NT} und WT unter Isoprenalin verringert. Die echokardiographischen Untersuchungen zeigten, dass durch die Überexpression von CSQ^{D307H} im Herzen die basale Herzfunktion in diesen Tieren verschlechtert war. Des weiteren zeigte sich bei den CSQ^{D307H}-Tieren ein verminderter Transmitralklappenfluss (65 ± 2 cm/s) nach Isoprenalin-Injektion im Vergleich zu CSQ^{NT} (78 ± 2 cm/s) und WT (88 ± 2 cm/s, $n=4$, $p<0,05$). Um die Folgen der CSQ^{D307H}-Überexpression auf die Herzleistung zu bewerten, wurden auch morphologische Parameter mittels Echokardiographie am lebenden Tier bestimmt. Die Wanddicke des intraventrikulären Septums war zwischen TG^{D307H}- TG^{NT}- und WT-Herzen nicht verschieden. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) war bei den TG^{D307H}-Tieren unter basalen Bedingungen sowie unter Isoprenalin im Vergleich zu WT um 9% erhöht (Abb. 4.7.). Dieser Effekt konnte bei TG^{NT}-Tieren nicht beobachtet werden. Die Ventrikelverkürzung als Maß der Kontraktilität, war unter basalen Bedingungen in allen Gruppen vergleichbar (Abb. 4.7.). Des weiteren wurde der Durchschnittsdruck des Blutflusses durch die Aortenklappe (AoPGmean) erfasst. Dieser zeigte nur in den TG-Tieren mit der Überexpression des mutierten CSQ^{D307H} eine verminderte Zunahme auf Isoprenalin (Abb. 4.7.). Im Gegensatz dazu waren im Mitralklappenbereich Geschwindigkeit und Druck in allen Gruppen unter basalen Bedingungen sowie unter Isoprenalin vergleichbar (Abb. 4.7.).

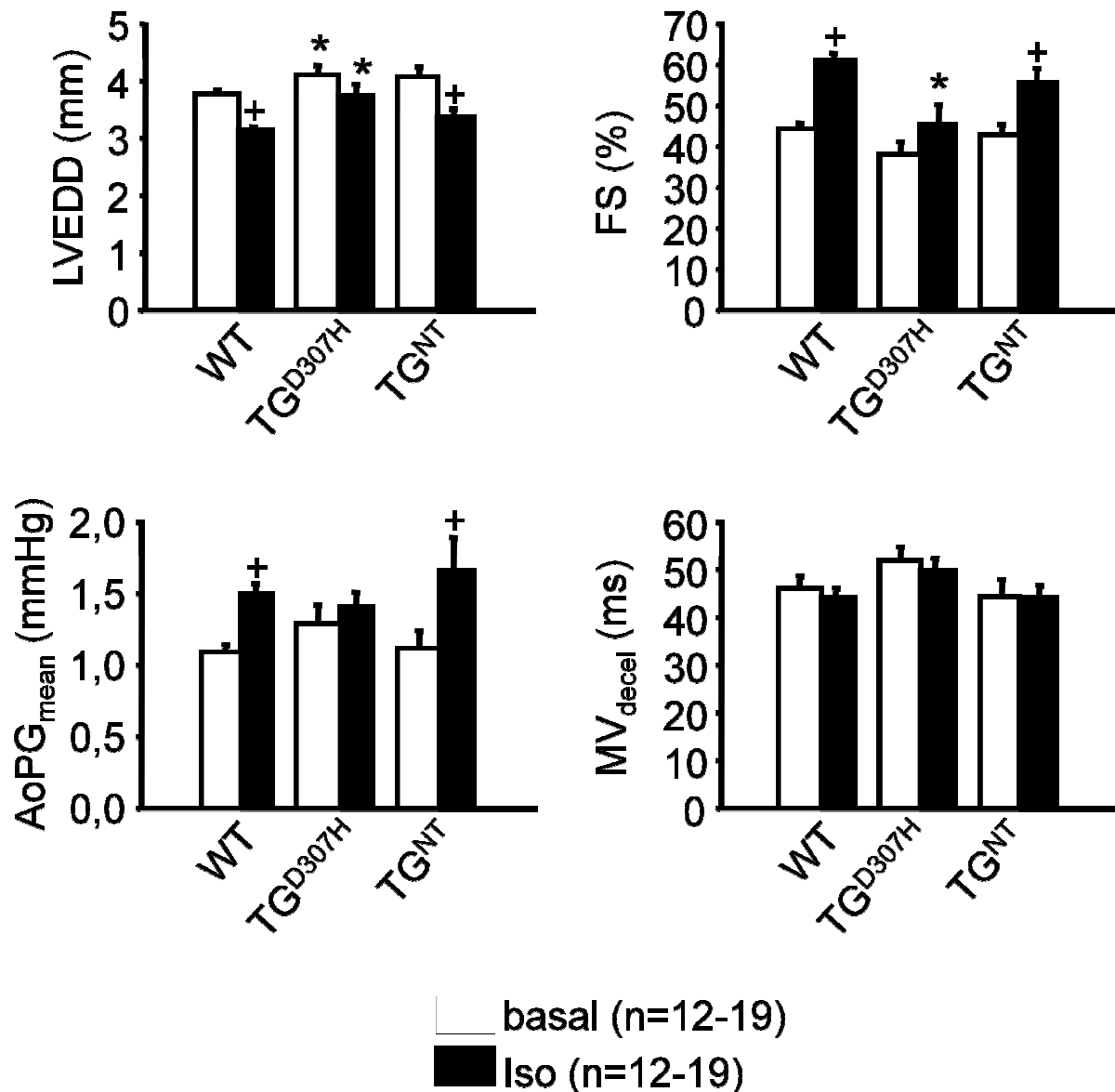


Abb. 4.7.: Echokardiographische Parameter

Dargestellt sind echokardiographische Messungen in acht Wochen alten WT-, TG^{D307H}- und TG^{NT}-Tieren. Funktionelle Parameter wurden unter basalen und unter Isoprenalin-stimulierten Bedingungen gemessen (1 μ M Iso). Gezeigt werden der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD), die Ventrikelverkürzung (FS), der mittlere Druck über der Aortenklappe (AoPG_{mean}) und der Transmitralklappenfluss (MV_{decel}) (+p<0,05 vs. basal, *p<0,05 vs. WT).

4.6. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Zellverkürzung

Um den Einfluss der Überexpression des mutierten CSQ auf die Ca^{2+} -Homöostase innerhalb der Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden Ca^{2+} -Transienten gemessen. Mit diesen Untersuchungen sollte getestet werden, ob die beobachteten Arrhythmien in den TG^{D307H} -Mäusen auch mit zellulären Effekten korrelieren.

Die Messungen der Zellverkürzung (FS) ergaben zwischen Kardiomyozyten aus $\text{CSQ}^{\text{D307H}}$ - und WT-Herzen unter basalen Bedingungen keine Unterschiede. Nach der Gabe von 10^{-6} M Isoprenalin kam es zum Anstieg der Zellverkürzung bei TG^{D307H} und WT. Jedoch gab es keine Unterschiede zwischen TG^{D307H} - und WT-Zellen. Die Zeiten bis zur Relaxation auf den halbmaximalen Wert ($t_{50\%}$) wiesen unter basalen Bedingungen keine Unterschiede zwischen $\text{CSQ}^{\text{D307H}}$ -transgenen und WT Mäusen auf. Isoprenalin führte zu einer Abnahme von $t_{50\%}$ sowohl bei TG^{D307H} als auch bei WT im Vergleich zu den basalen Daten. Bei der Bestimmung der Zeit bis zur 90%igen Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration war eine Abnahme unter basalen Bedingungen und unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin bei TG^{D307H} und WT zu erkennen.

Die Untersuchung der Ca^{2+} -Transienten ergab sowohl für die diastolische als auch für die systolische Ratio keine Unterschiede zwischen den $\text{CSQ}^{\text{D307H}}$ -transgenen und WT-Tieren. Auch nach einer β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin war kein Unterschied zu verzeichnen. Die Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio (ΔF_{ratio}) war zwischen $\text{CSQ}^{\text{D307H}}$ und WT unter basalen Bedingungen als auch nach Isoprenalin-Stimulation nicht verschieden (Tabelle 1).

	WT	TG ^{D307H}
n	8	8
Ca²⁺ Transienten		
Diastolisches Signal, 0,5 Hz (F_{ratio})	1,16±0,04	1,17±0,07
Diastolisches Signal, 2 Hz (F_{ratio})	1,20±0,04	1,22±0,05
Amplitudenhöhe, 0,5 Hz (ΔF_{ratio})	0,11±0,01	0,10±0,02
Amplitudenhöhe, 2 Hz (ΔF_{ratio})	0,13±0,01	0,13±0,02
$t_{50\%}$, Iso (ms)	86,8±10,4	103,8±21,8
Zellverkürzung		
FS, 0.5 Hz (%)	8,6±1,9	9,7±3,8
FS, 2 Hz (%)	9,3±1,3	11,3±3,5
$t_{90\%}$ Relaxation, basal (ms)	157,7±24,0	191,0±16,3
$t_{90\%}$ Relaxation, Iso (ms)	116,7±19,3	160,1±29,1

Tabelle 1: Ca²⁺-Transienten und kontraktile Parameter isolierter Kardiomyozyten

Minimum und Peak der Indo-1 Ratios (F_{ratio} und ΔF_{ratio}) wurden bei 0,5 und 2 Hz in isolierten Kardiomyozyten von TG^{D307H}- und WT-Tieren bestimmt. Die Kinetik des [Ca]_i-Abfalls wurde in An- und Abwesenheit von Isoprenalin (Iso) gemessen. Die kontraktile Messungen wurden durch Kantendetektion bestimmt. (n=Kardiomyozyten) *p<0,05 vs. WT

4.7. Expression Ca^{2+} -regulierender Proteine

Da verschiedene Untersuchungen in der Literatur auf eine pathophysiologische Bedeutung von CSQ-Mutationen für die Entwicklung einer CPVT hindeuten, sollte die Auswirkung von CSQ^{D307H} auf die Expression von verschiedenen Proteinen, die an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind, untersucht werden. Zu den untersuchten Proteinen des SR zählten SERCA2a, Phospholamban, Triadin, Junctin und der Ryanodin-Rezeptor. Zur Messung dieser Proteine wurden Ventrikelhomogenate von drei Monate alten Mäusen hergestellt, die Proteine mittels spezifischer Antikörper im Western Blot-Verfahren nachgewiesen und anschließend quantifiziert.

Der Expressionsgrad von SERCA2a und Phospholamban in TG^{D307H}-Herzen war nicht verändert. Jedoch kam es zu einer um 27% reduzierten Expression von Triadin gegenüber TG^{NT}. Die Expression aller anderen untersuchten SR-Proteine war in den TG^{NT}-Herzen unverändert.

Ebenso konnten wir durch einen [³H]Ryanodin-Bindungsassay in Homogenaten zeigen, dass es bei TG^{D307H} zu einer unveränderten Bindung von [³H]Ryanodin an den RyR2 im Vergleich zu WT kommt. Im Gegensatz dazu konnten wir eine um 68% erniedrigte [³H]Ryanodin-Bindung in TG^{NT} ermitteln (Abb. 4.8., A).

4.8. SR- Ca^{2+} -Wiederaufnahme

Die Aktivität der SERCA2a wird durch PLB reguliert. Eine Phosphorylierung von PLB hebt die Hemmung der SERCA2a auf, die Aktivität der SERCA2a steigt und dadurch nimmt die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zu (Lindemann et al. 1983; Koss und Kranias 1996). Untersuchungen der Ca^{2+} -Aufnahme über die SERCA2a in das SR zeigten in Homogenaten für TG^{D307H} im Vergleich zu TG^{NT} keine Veränderungen in der Aktivität. Hierbei wurden die Oxalat-präzipitierten Mengen an ⁴⁵Ca²⁺ bestimmt (Abb. 4.8., B).

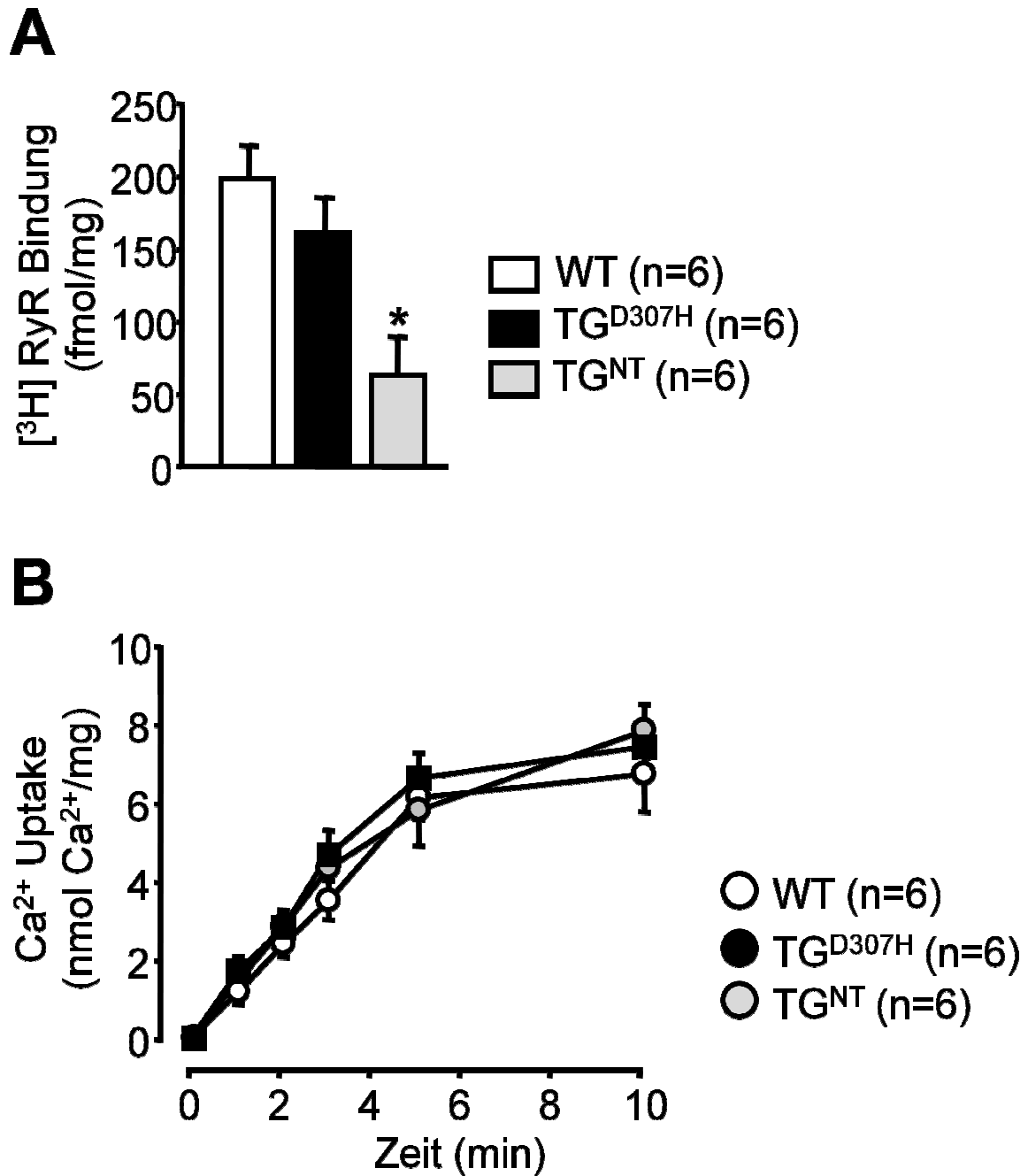


Abb. 4.8.: Nachweis der Ca²⁺-Aufnahme und Ryanodinrezeptorbindung

Abb. A zeigt die Bindung von Tritium-markiertem Ryanodin an den Ryanodin-Rezeptor in TG^{D307H}- und WT-Herzhomogenaten. **Abb. B** zeigt die Ca²⁺-Aufnahme in das SR in Homogenaten von TG^{D307H}- und WT-Herzen. *p<0,05 vs. WT

4.9. Ca²⁺-Bindungseigenschaften von CSQ^{D307H}

Die Mutation CSQ^{D307H} wurde durch gerichtete Mutagenese hergestellt. Die Expression des mutierten Proteins in Sf9-Insektenzellen wurde mittels Immunoblotting nachgewiesen. Um die funktionellen Eigenschaften von CSQ^{D307H} im Vergleich zu CSQ^{NT} zu testen, überprüften wir die Ca²⁺-Bindungsfähigkeit mittels eines Ca²⁺-Bindungstests. Die ⁴⁵Ca²⁺-Inkubation ist eine Methode zur Untersuchung der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von Proteinen. Zunächst werden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wird ⁴⁵Ca²⁺ auf diese Nitrozellulosemembran gegeben. Das radioaktive ⁴⁵Ca²⁺ bindet an Ca²⁺-bindende Proteine auf der Membran. Ungebundenes ⁴⁵Ca²⁺ wird ausgewaschen. Danach wird die Membran über mehrere Tage exponiert. Bereits andere Arbeitsgruppen konnten die Ca²⁺-Bindungsfähigkeit des CSQ mittels „⁴⁵Ca²⁺-Overlay-Assay“ nachweisen (Czubryt et al. 1996, Volpe et al. 1994). Auch in dieser Arbeit konnte die Ca²⁺-Bindungsfähigkeit der exprimierten CSQ-Proteine (CSQ^{NT} und CSQ^{D307H}) nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich eine geringere Ca²⁺-Bindung für CSQ^{D307H} im Vergleich zu CSQ^{NT} unter 1 mM CaCl₂. Diese geringere Ca²⁺-Bindung von CSQ^{D307H} zeigte sich ebenso in Gegenwart von 10 µM und 100 µM CaCl₂ im Inkubationspuffer. Der Zusatz von 1 mM EGTA resultierte in einer vergleichbaren Ca²⁺-Bindungsfähigkeit in beiden Gruppen (Abb. 4.9.).

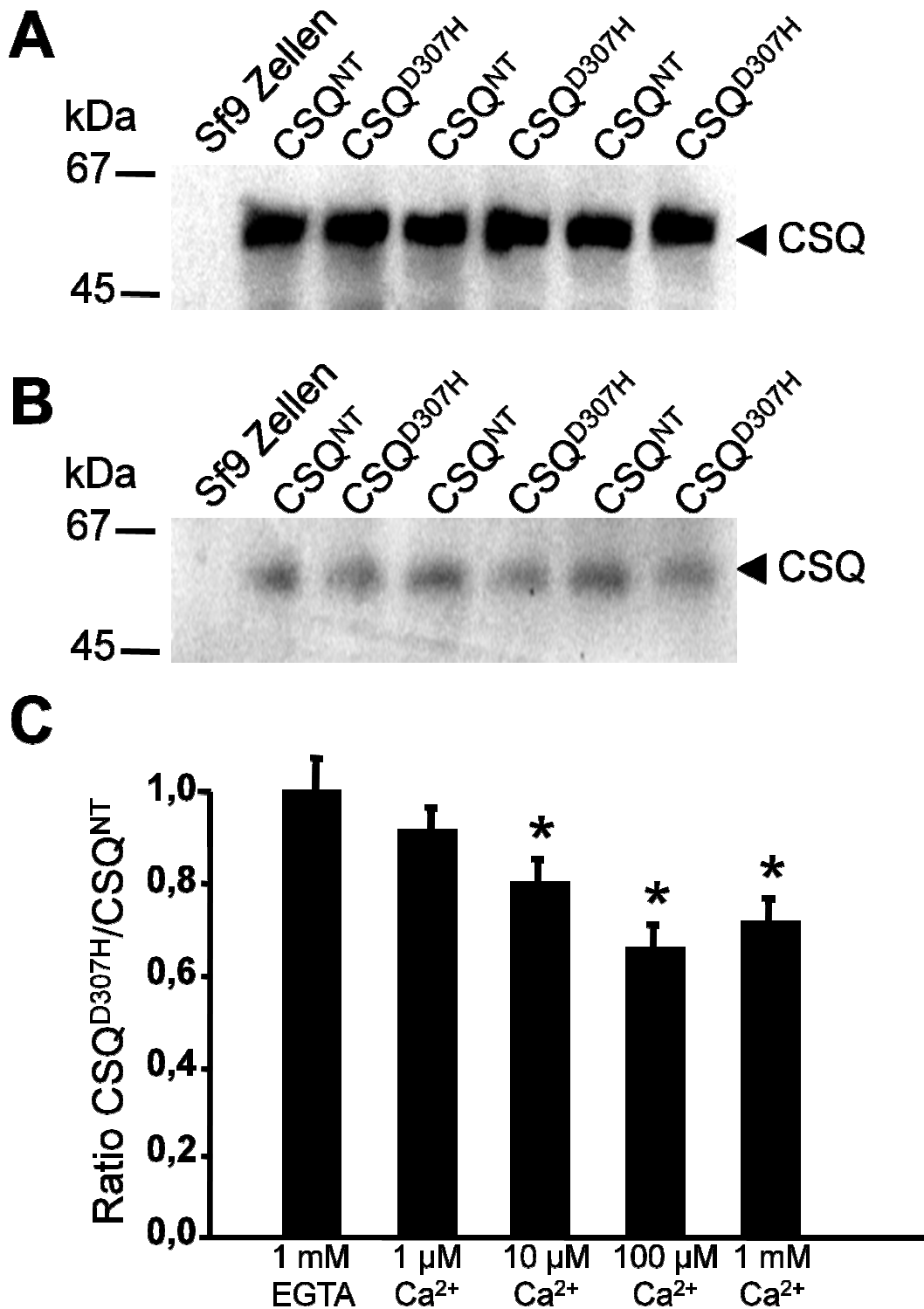


Abb. 4.9.: Ca²⁺-Bindung von rekombinantem CSQ

Dargestellt ist ein typischer Western Blot zum Nachweis der Protein-Expression von CSQ^{D307H} und CSQ^{NT} in Homogenaten von Sf9-Insektzellen (**A**) und das dazugehörige Autoradiogramm einer ⁴⁵Ca²⁺-Inkubation zum Nachweis der Ca²⁺-Bindung von CSQ (**B**). Die detektierten Banden im Ca²⁺-abhängigen Ca²⁺-

Bindungsassay wurden quantifiziert und als Ratio CSQ^{D307H}/CSQ^{NT} graphisch dargestellt (C). * $p < 0,05$ vs. CSQ^{NT} bzw. vs. 1 mM EGTA und $1 \mu M$ $CaCl_2$ (n=3).

4.10. Untersuchung von CSQ^{K206N}

Ziel der vorliegenden Arbeit war außerdem die Charakterisierung einer neuen $CASQ2$ -Mutation, K206N, die mit dem klinischen Bild einer CPVT und dem plötzlichen Herztod eines jungen Probanden assoziiert ist. Diese Mutation wurde dem Institut durch A. Postma (Kardiologie, Amsterdam, Niederlande) persönlich mitgeteilt. Mutationen im $CASQ2$ -Gen sind mit der rezessiven Form der CPVT verbunden. Der Junge entwickelte im Alter von 13 Jahren tödliche Extrasystolen während körperlicher Aktivität. Die Mutter ist heterozygot mit milden Symptomen (z.B. Synkopen), der Vater ist gesund. Der Bruder zeigt ebenso diesen heterozygoten Erbgang, jedoch ohne Symptome (Abb. 4.10.) oder EKG-Abnormalitäten. Bei dieser Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch im Exon 6. Dabei wird Lysin 206 durch Asparagin an einer hoch konservierten Position ersetzt. Die funktionellen Auswirkungen dieser Mutation sind bisher nicht untersucht worden.



Abb. 4.10.: Stammbaum der K206N-Familie

Dargestellt ist der Stammbaum der Familie, die die Mutation K206N im $CASQ2$ -Gen aufwies. Quadratische Symbole stellen männliche Mitglieder der Familie dar, das runde Symbol ein weibliches Familienmitglied. Ein symptomatischer Mutationsträger (I:2), abgebildet durch ein gefülltes Symbol, zeigt Symptome der CPVT. Ein asymptomatischer Mutationsträger (II:1) ist durch einen Rasterpunkt und der betroffene Patient mit Synkopen und Extrasystolen (II:2) durch ein gefülltes Symbol dargestellt. Der Querstrich deutet an, dass dieses Familienmitglied an einem plötzlichen Herztod im Alter von 13 Jahren gestorben ist.

Um die funktionellen Effekte dieser Mutation zu untersuchen, wurden gentechnisch veränderte Adenoviren hergestellt. Die Genexpression nach Infektion von HEK293-Zellen und neonatalen Mauskardiomyozyten wurde mittels Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenz nachgewiesen. Funktionelle Untersuchungen wurden mittels Ca^{2+} -Transientenmessungen an infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten durchgeführt und sind, wie alle experimentellen Ergebnisse, in diesem Kapitel beschrieben.

4.11. Generierung rekombinanter Adenoviren zur Expression von CSQ

Die rekombinanten Adenoviren wurden nach dem Verfahren von He et al. (1998) (Abb. 4.11.) generiert. Mutiertes und natives CSQ wurden in den Transfervektor pAdTrack-CMV einkloniert und in *E. coli* mit dem Virusgenom pAdEasy zur homologen Rekombination gebracht. Rekombinationspositive Klone konnten mittels PCR-Reaktion als auch durch *Pac* I-Restriktionsverdau analysiert werden. Die rekombinanten adenoviralen Genome enthielten zwei unabhängige Expressionskassetten, in denen die Transkription jeweils unter Kontrolle eines CMV-Promotors stand. Die erste Kassette enthielt die kodierende Sequenz von mutiertem oder nativem CSQ und die zweite Kassette die Sequenz für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Reportergen. Die Sequenz der Expressionskassetten wurde durch Sequenzierung (GATC) überprüft.

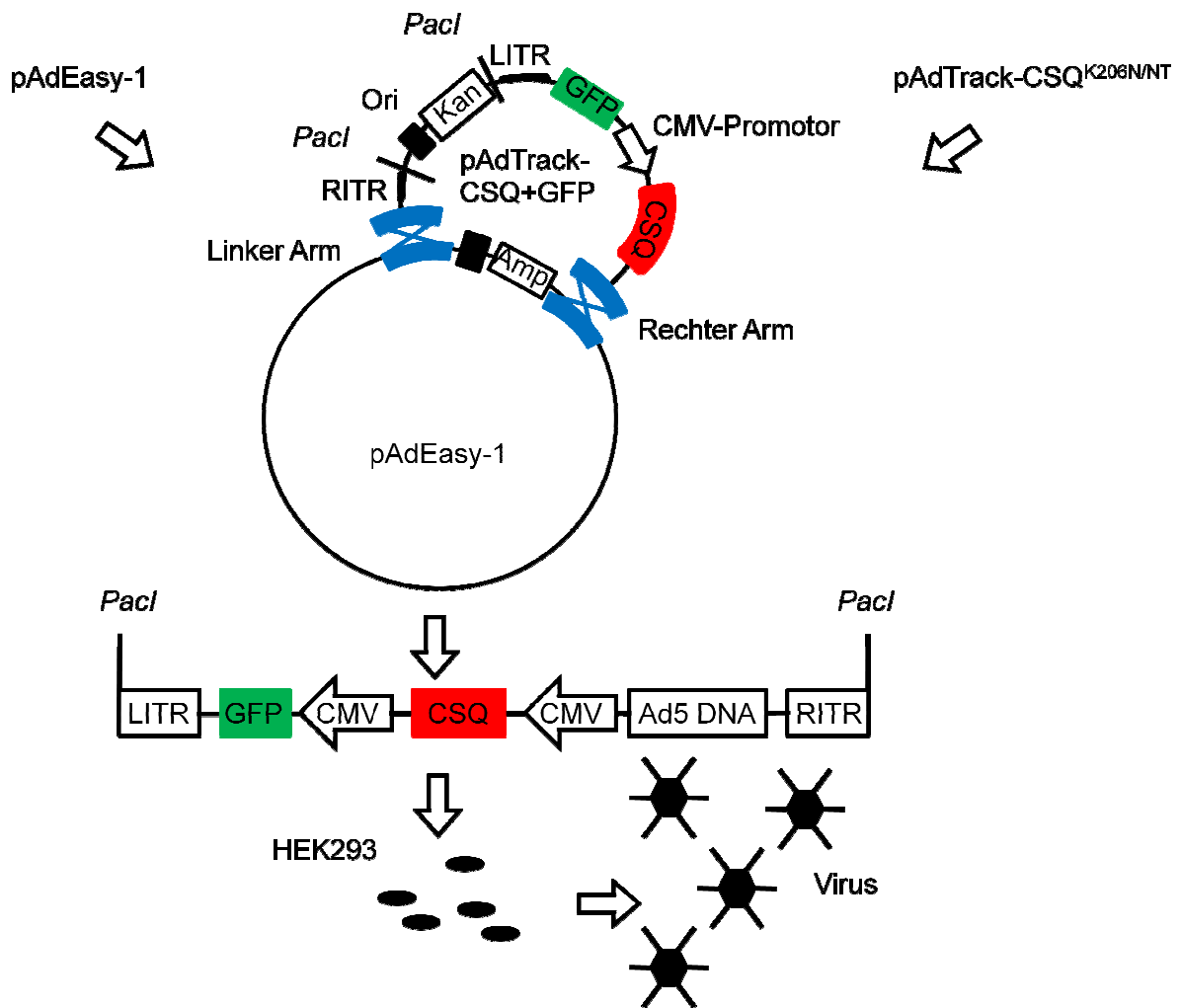


Abb. 4.11.: Schema der Generierung rekombinanter Adenoviren

Calsequestrin (CSQ^{K206N} und CSQ^{NT}) wurde in die multiple Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert. Das erhaltene Plasmid (pAdTrack-CSQ^{K206N/NT}) wurde linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Co-Transformation in *E.coli* zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycin-Resistenzgen (Kan) wurden rekombinante Plasmide selektiert. Das mit *Pac I* linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK293-Zellen transfiziert, die in der Lage sind, die Deletionen ($\Delta E1$, $\Delta E3$) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren bilden. Ad5 DNA, genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5; Amp, Ampicillinresistenzgen; CMV, Cytomegalievirus-Promotor; GFP, grün fluoreszierendes Protein; LITR/RITR; linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz.

4.11.1. Generierung der rekombinanten Adenoviren CSQ^{K206N} und CSQ^{NT}

Die Hunde-CSQ-cDNA lag im pVL1393-Plasmid (generiert von PD Dr. U. Kirchhefer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Münster) bereits vor. Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Not* I konnte die CSQ-cDNA (1427 bp) aus pVL1393 ausgeschnitten werden (Abb. 4.12., A). Mittels Gelelektrophorese wurden die Fragmente aufgetrennt und die CSQ-cDNA aus dem Gel extrahiert. Die isolierte CSQ-cDNA wurde in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des ebenfalls mit *Not* I geschnittenen Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV (9220 bp, Abb. 4.12., A) einkloniert. Dieser Shuttle-Vektor enthält eine Expressionskassette für GFP und eine für die klonierte CSQ-cDNA. Diese werden flankiert von adenoviralen Sequenzen, die eine homologe Rekombination ermöglichen. Der Nachweis der erfolgreichen Einklonierung erfolgte mittels Restriktionsverdau mit *Bgl* II und *Xba* I. Das erwartete Fragment von 1452 bp konnte durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 4.12., C). Durch homologe Rekombination von pAdTrack-CSQ mit dem Adenovirus pAdEasy-1 und anschließenden Transfer in die Säugerzellen HEK293 entstand das rekombinante CSQ-Adenovirus (pAd-CSQ^{K206N/NT}).

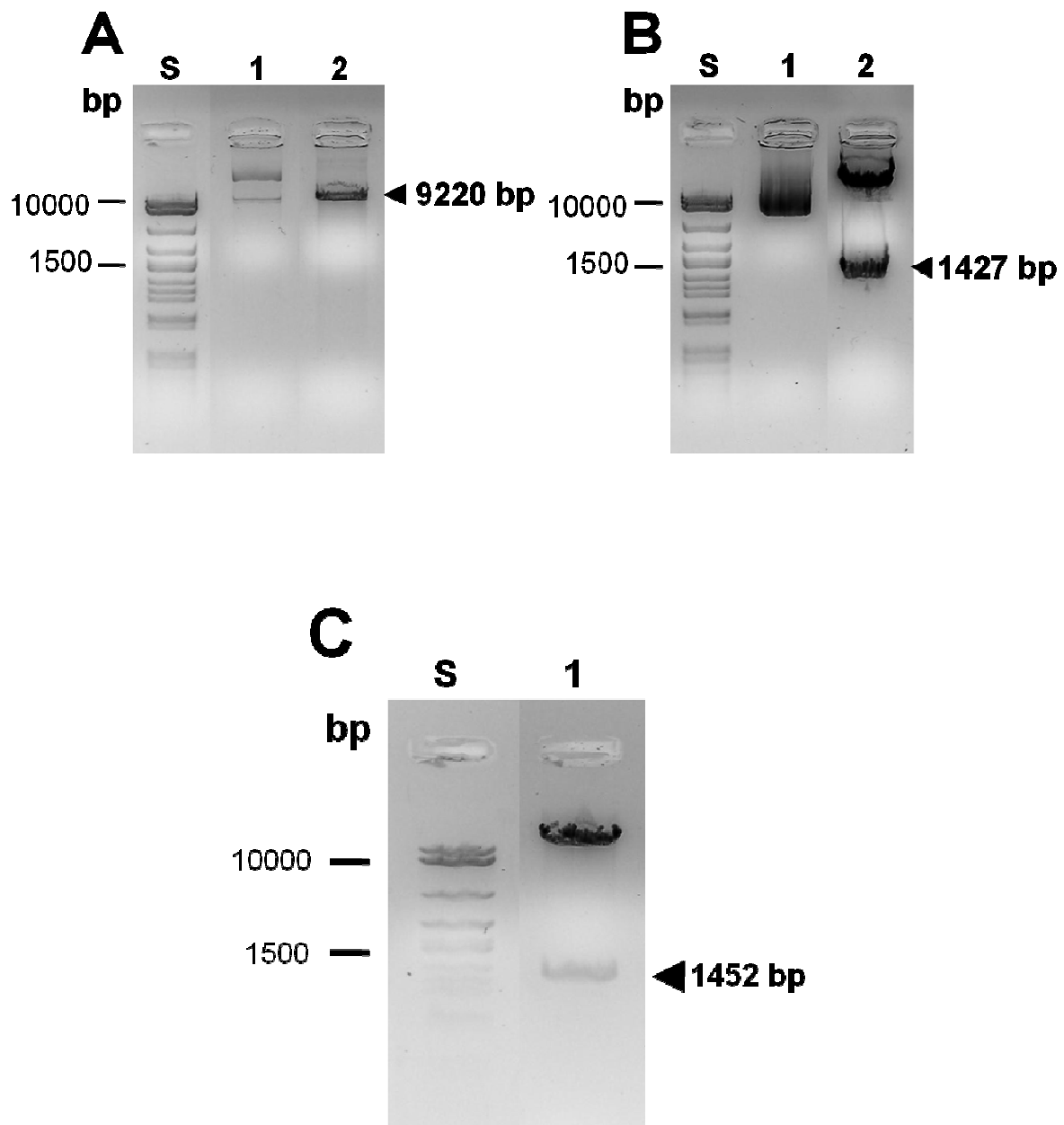


Abb. 4.12.: Charakterisierung des Shuttle-Vektors pAdTrack-CSQ durch Restriktionsanalyse

Auf den 1%igen Agarosegelen ist in **(A)** der Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV (Spur 1) nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Not* I dargestellt (Spur 2). **(B)** zeigt die kodierende Sequenz von CSQ (Spur 2), welche aus dem Transfervektor pVL1393 (Spur 1) mittels *Not* I herausgeschnitten wurde. Es folgte die Ligation der CSQ-cDNA in die *Not* I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV. **(C)** zeigt die Identifizierung eines positiven Klons von pAdTrack-CMV-CSQ-K206N nach Verdau mit *Bgl* II und *Xba* I. Zum Größenvergleich wurde ein Standard geladen.

Zwecks homologer Rekombination des Shuttle-Vektors pAdTrack-CSQ mit pAdEasy-1 wurde das pAdTrack-CSQ-Plasmid zunächst mit *Pme* I linearisiert. Es folgte eine Kotransformation in *E.coli* mit dem linearisierten Shuttle-Vektor und der zirkulären Virus-DNA mittels Elektroporation. Die erfolgreiche homologe Rekombination wurde mittels Restriktionsanalyse und PCR nachgewiesen. Dafür wurde ein Restriktionsverdau mit *Pac* I sowie eine PCR unter Verwendung entsprechender Primer (Sequenzen unter 7.3.) zum Nachweis von pAdEasy verwendet (Abb. 4.13.).

4.12. Charakterisierung von pAdEasy-CSQ-Klonen

Die nach homologer Rekombination isolierten Klone zeigten in der PCR zum Nachweis von CSQ- und pAdEasy-Sequenzen die erwarteten Signale (Abb. 4.13., A). Die *Pac* I- Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide zeigte nach erfolgreicher homologer Rekombination ein großes cDNA-Fragment von >33,4 kb und zusätzlich ein kleines Fragment von 3,0 oder 4,5 kb (Abb. 4.13., A). Normalerweise rekombinieren der rechte und der linke Arm beider Vektoren miteinander. Bei der alternativen homologen Rekombination interagieren alternativ der rechte Arm und der bakterielle Replikationsursprung (Ori) aus dem Shuttle-Vektor mit der adenoviralen DNA. Nach *Pac* I-Verdau erhielt man entsprechend ein Fragment von 4,5 kb anstelle der erwarteten 3,0 kb. Diese alternative Rekombination war für die weitere Verwendung der Virus-DNA unproblematisch, da nach Spaltung mit *Pac* I in beiden Fällen identische DNA-Fragmente von >33,4 kb entstehen, die allein für die Expression relevant sind.

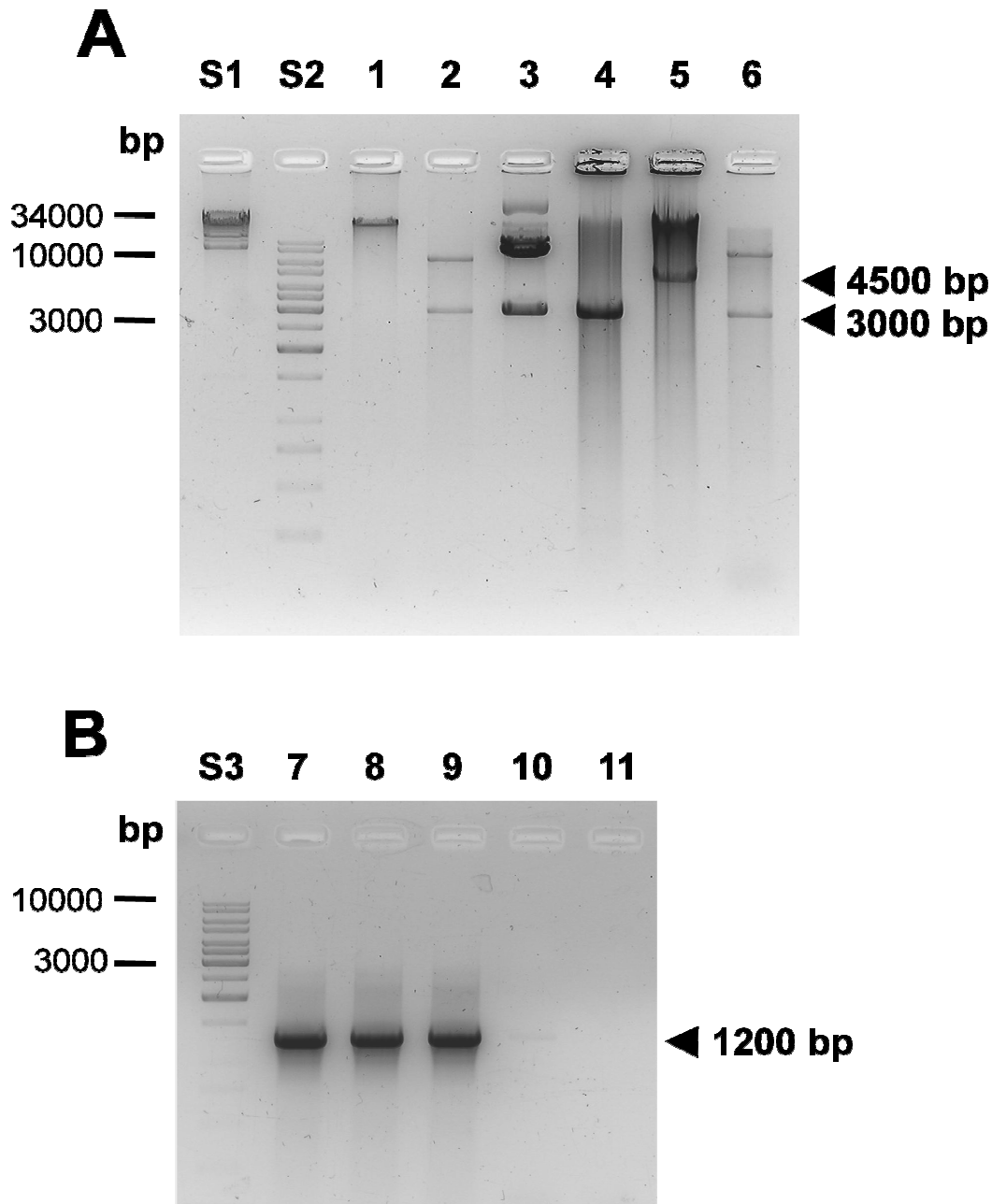


Abb. 4.13.: Identifizierung positiver pAdEasy-CSQ-K206N-Klone durch Restriktionsanalyse und PCR

pAdEasy-CSQ-K206N wurde durch homologe Rekombination von pAdEasy-1 und pAdTrack-CSQ-K206N in *E.coli* generiert. Zwei positive Klone konnten isoliert und charakterisiert werden. **(A)** zeigt die *Pac* I-Restriktionsanalyse von pAdEasy (Spur 1), pAdTrack-CMV (Spur 2), pAdTrack-CSQ-K206N (Spur 3) und die positiven pAdEasy-CSQ-K206N Klone (Spuren 4 und 5). **(B)** zeigt die PCR zum Nachweis der pAdEasy-Sequenz der positiven Klone (Spuren 8 und 9). Als Kontrollen wurden pAdEasy (Spur 7) sowie Negativkontrollen (Spuren 10 und 11) verwendet. Zum Größenvergleich wurden ein 34000 bp-Standard (S1) und ein 1000 bp-Standard (S2, S3) aufgetragen.

Eine weitere, neu identifizierte Mutation des *CASQ2*-Gens ist K180E. Diese Mutation wurde dem Institut von Prof. Dr. E. Schulze-Bahr (Medizinische Klinik und Poliklinik C, Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinikum Münster) persönlich mitgeteilt. Hierbei kam es zu einem Aminosäureaustausch im Exon 5. Dabei wurde Lysin 180 durch Glutamat ersetzt. Die funktionellen Auswirkungen dieser Mutation sind bisher nicht untersucht worden. Das Adenovirus pAdEasy-CSQ-K180E sollte zusätzlich generiert werden (Abb. 4.14.). Die Herstellung folgte dem bei den beiden Vorgängerviren pAdEasy-CSQ-K206N und pAdEasy-CSQ-NT verwendeten Verfahren nach He et al. (1998, Abb. 4.11.). Nach Herstellung des rekombinanten Vektors sollte auch für CSQ^{K180E} die Expression in HEK293-Zellen sowie der Nachweis des exprimierten Proteins mittels Western Blot-Analyse erfolgen.

Der Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit lag jedoch in der funktionellen Untersuchung der Mutation K206N.

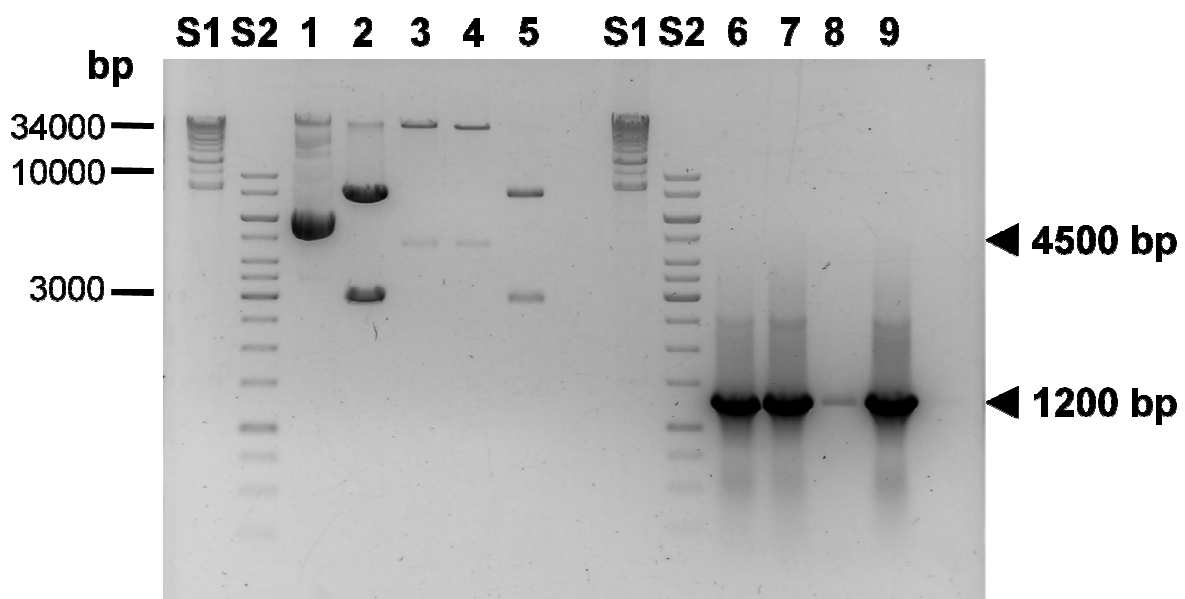


Abb. 4.14.: Identifizierung positiver pAdEasy-CSQ-K180E-Klone durch Restriktionsanalyse und Pi

pAdEasy-CSQ-K180E wurde durch homologe Rekombination von pAdEasy-1 und pAdTrack-CSQ-K180E in *E.coli* generiert. Zwei positive Klone konnten isoliert und charakterisiert werden. Die Abbildung zeigt die *Pac* I-Restriktionsanalyse von pAdTrack-CSQ-K180E (Spur 2), die positiven pAdEasy-CSQ-K180E Klone (Spuren 3 und 4) sowie eine Negativkontrolle (Spur 5). Mittels PCR konnte in der

rekombinanten Virus-DNA der positiven Klone pAdEasy-1 (Spuren 6 und 7) nachgewiesen werden. Spur 8 diente als Negativkontrolle, Spur 9 als Positivkontrolle von pAdEasy-1.

4.13. Untersuchung der Proteinexpression in verschiedenen Zellsystemen mittels Western Blot-Analyse

Um die biochemischen und physiologischen Eigenschaften von CSQ^{K206N} im Vergleich zur nativen Form von CSQ zu untersuchen, wurden verschiedene eukaryote Expressionssysteme benutzt. So erfolgte eine selektive Expression von mutiertem und nativem Hunde-CSQ mittels Baculoviren in Sf9-Insektenzellen und unter Benutzung des adenoviralen Expressionssystems in HEK293-Zellen sowie in isolierten neonatalen Mauskardiomyozyten. Exprimiertes CSQ wurde im Western Blot mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper detektiert. Dieser Antikörper erkennt das CSQ von Hund und Maus bei einem Molekulargewicht von 55 kDa. In nicht-infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten konnte auf Proteinebene nur eine schwache Expression des endogenen CSQ nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigte das mutierte CSQ, K206N, ein höheres Molekulargewicht im Vergleich zu CSQ^{NT}. Eine mögliche Erklärung liegt in einer zusätzlichen Glykosylierung des Proteins durch den Einbau einer zweiten N-Glykosylierungsstelle an der Aminosäure 206 (Abb. 4.15.).

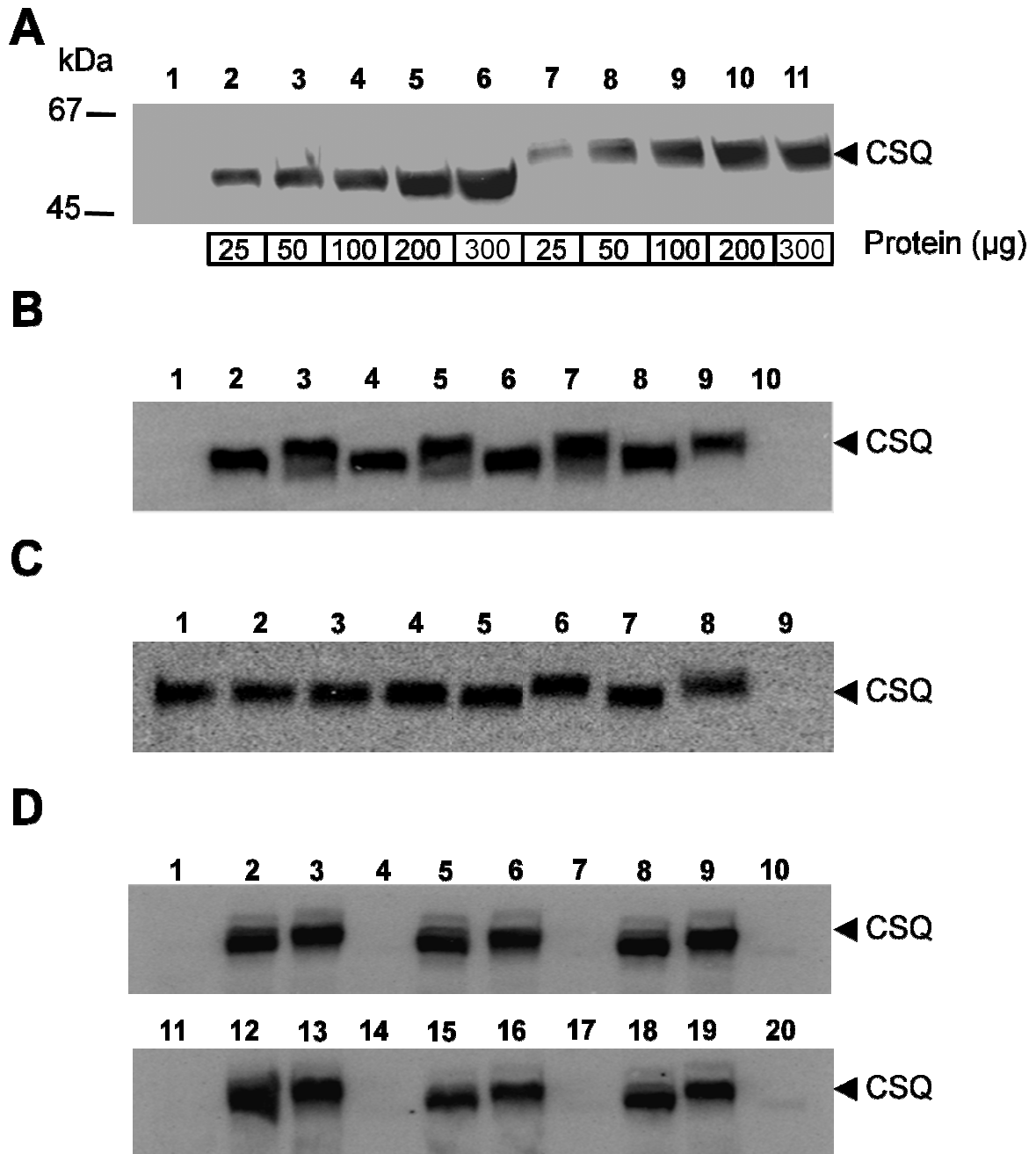


Abb. 4.15.: Proteinexpression von CSQ in adenoviral infizierten Sf9-Insektenzellen, HEK293-Zellen und neonatalen Mauscardiomyozyten

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von CSQ in drei verschiedenen Zellsystemen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Antikörper, der gegen CSQ gerichtet ist. Dieser erkennt das Gesamtprotein und auch die glykosylierte Form des CSQ. **Abb. A** zeigt die Expression von CSQ in Sf9-Insektenzellen in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Die Infektion erfolgte mit Baculoviren, die für CSQ^{NT} (Spuren 2-6) und CSQ^{K206N} (Spuren 7-11) kodieren. Die Infektion mit den WT-Baculoviren (Spur 1) diente als Kontrolle. **Abb. B** zeigt die

Expression von CSQ in HEK293-Zellen. Pro Spur wurden 40 µg Protein aufgetragen. Die Infektion erfolgte mit pAd-CSQ^{NT} (Spuren 2, 4, 6, 8), pAd-CSQ^{K206N} (Spuren 3, 5, 7, 9) und Ad-Ktr. (Spur 10). Nicht-infizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle (Spur 1). **Abb. C** zeigt die Expression von CSQ in HEK293-Zellen. Pro Spur wurden 40 µg Protein aufgetragen. Die Infektion erfolgte mit pAd-CSQ^{K180E} in der 5., 6., 7. und 8. Amplifikation (Spuren 1, 2, 3, 4). Die Infektion mit pAd-CSQ^{NT} (Spuren 5 und 7) und pAd-CSQ^{K206N} (Spuren 6 und 8) diente als Kontrolle. Nicht-infizierte HEK293-Zellen dienten ebenso als Kontrolle (Spur 9). **Abb. D** zeigt die CSQ-Expression in neonatalen Mauscardiomyozyten. Pro Spur wurden 25 µg Protein aufgetragen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit Ad-Ktr. (Spuren 1, 4, 7, 11, 14 und 17), pAd-CSQ^{NT} (Spuren 2, 5, 8, 12, 15 und 18) und pAd-CSQ^{K206N} (Spuren 3, 6, 9, 13, 16 und 19). Nicht-infizierte neonatale Mauscardiomyozyten dienten als Kontrolle (Spuren 10 und 20).

4.13.1. Adenovirale Infektion von HEK293-Zellen und Nachweis des Adenovirus-Hüllproteins

Es erfolgte die Infektion der rekombinanten Adenoviren zur Expression der CSQ-Mutationen CSQ^{K206N} und CSQ^{K180E} in HEK293-Zellen. Diese sind in der Lage, die Genprodukte der deletierten Bereiche ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) von pAdEasy-1 zu komplementieren und infektiöse, replikationsdefiziente Viren zu bilden. Infizierte Zellen zeigten nach 4-5 Tagen eine grüne Fluoreszenz. Im ersten Infektionszyklus wiesen nur einige Zellen eine grüne Fluoreszenz auf. Mit steigender Anzahl von Infektionszyklen (Amplifikationen) nahmen die Geschwindigkeit des Infektionsverlaufs und die Zahl der infizierten Zellen stetig zu. Das Infektionsverhalten der beiden rekombinanten Virusgenome, CSQ^{K206N} und CSQ^{K180E}, war im Verlauf der Viren-Generierung vergleichbar. Eine Untersuchung der Proteinexpression von CSQ und des Virushüllproteins mittels Western Blot-Analyse in adenoviral infizierten HEK293-Zellen diente als Nachweis für eine Virusproduktion (Abb. 4.16.).

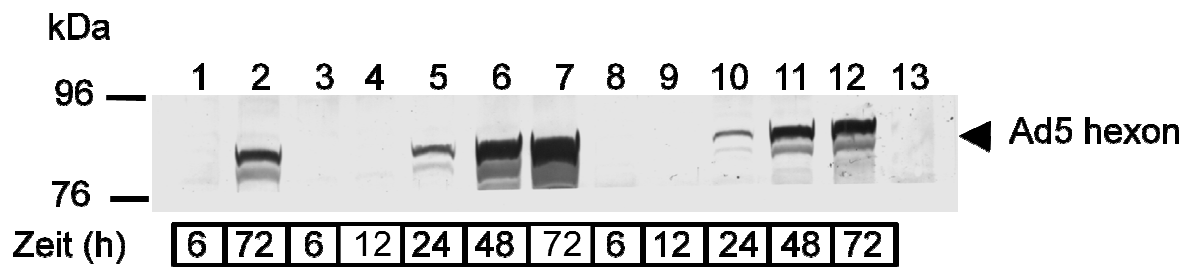


Abb. 4.16.: Immunologischer Nachweis des Adenovirus-Hüllproteins

Dargestellt ist die Proteinexpression des Adenovirus-Hüllproteins in adenoviral infizierten HEK293-Zellen in Abhängigkeit von der Infektionszeit. Die infizierten Zellen wurden 6, 12, 24, 48 und 72 h nach der Infektion geerntet. Abgebildet sind Infektionen mit Ad-Ktr. (Spuren 1 und 2), CSQ^{NT} (Spuren 3-7), CSQ^{K206N} (Spuren 8-12) und nicht- infizierte HEK293-Zellen als Kontrolle (Spur 13). Das Virushüllprotein E2a wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (siehe Anhang 7.1.).

Die generierten Viren pAd-CSQ^{NT}, pAd-CSQ^{K206N} und pAd-CSQ^{K180E} bewirkten nach Infektion von HEK293-Zellen bei einem hohen Virustiter eine Zelltoxizität (zytotoxischer Effekt). Durch das Ablösen der Zellen erfolgte die Bestimmung des Virustiters. HEK293-Zellen wurden dabei mit einer genau definierten, absteigenden Viruskonzentration infiziert und für 72 h inkubiert. Die niedrigste Viruskonzentration, die nach diesem Zeitpunkt ein vollständiges Ablösen der Zellen vom Boden auslöst, entspricht einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 10. Die MOI gibt das Verhältnis von Viruszahl zu Zellzahl wieder. Dadurch ist eine vergleichbare Infektion mit den verschiedenen Adenoviren möglich.

4.13.2. Untersuchung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden neonatale Mauskardiomyozyten mit aufsteigenden Virus Mengen an pAd-CSQ^{NT}, pAd-CSQ^{K206N} und Ad-Ktr.-Virus für 72 h infiziert. In allen Gruppen nahm die unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtete grüne Fluoreszenz mit steigender Viruskonzentration zu. Nicht-infizierte Zellen als Kontrolle zeigten keine Fluoreszenz. Es zeigte sich eine Zunahme der Expression mit aufsteigender Viruskonzentration. Eine signifikant erhöhte Expression konnte sowohl

für CSQ^{NT} als auch für CSQ^{K206N} im Vergleich zu den mit Ad-Ktr.-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.17.).

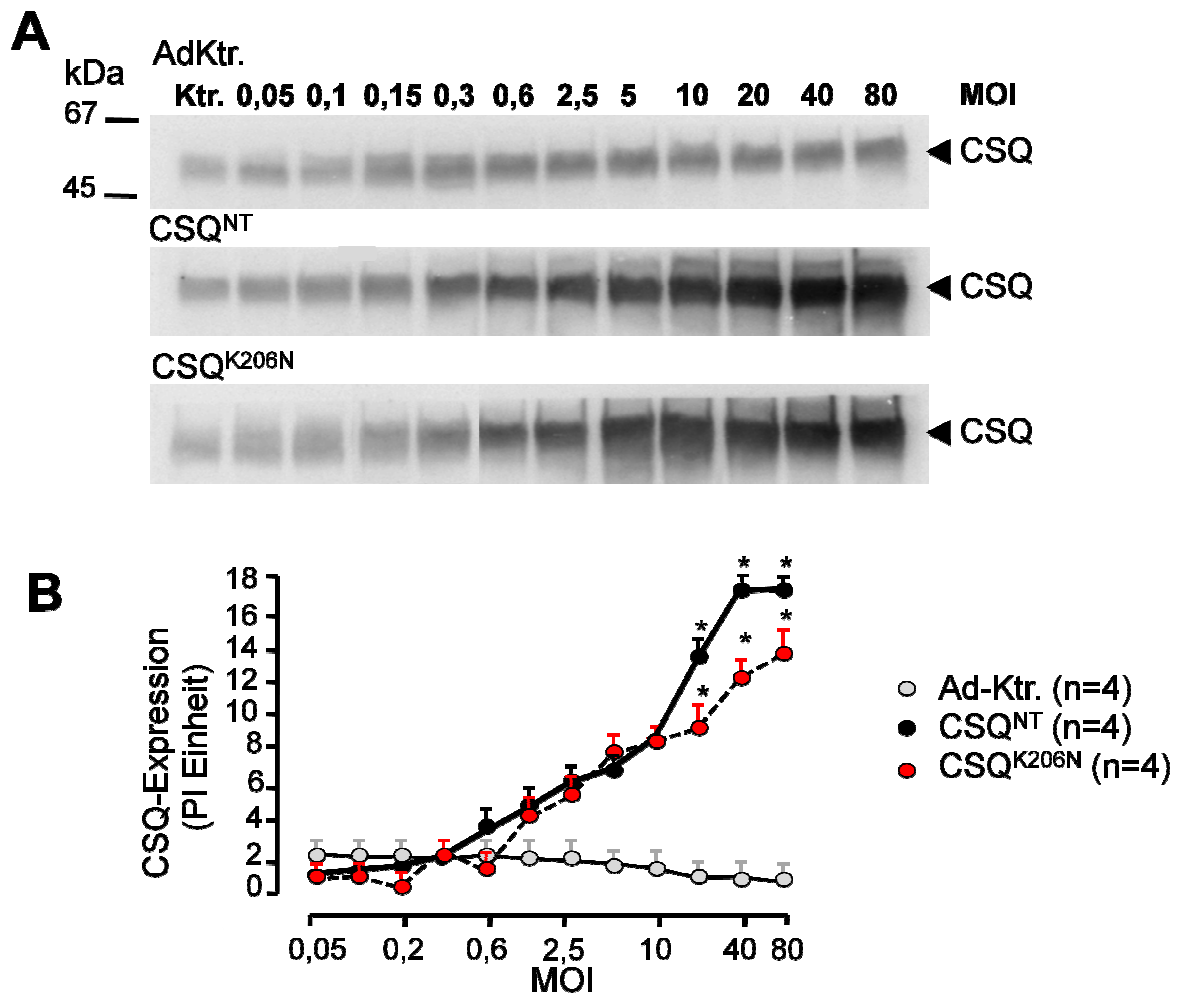


Abb. 4.17.: Proteinexpression von CSQ in adenoviral infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von CSQ (**A**) sowie die Quantifizierung von CSQ (**B**) in Homogenaten von neonatalen Mauscardiomyozyten nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} über 72 h in Abhängigkeit von der Viruskonzentration (MOI). Ein Homogenat nicht-infizierter Zellen diente als Kontrolle (Ktr.). *p<0,05 vs. Ad-Ktr.

4.13.3. Nachweis der adenoviralen Infektion und CSQ-Lokalisation durch Fluoreszenz in neonatalen Mauscardiomyozyten

Die Expression von GFP in infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten diente als Nachweis einer erfolgreichen Infektion. Abb. 4.18. (A und B) zeigt die GFP-Fluoreszenz in isolierten neonatalen Mauscardiomyozyten, die mit pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} mit einer MOI von 10 für 72 h infiziert wurden.

Die CSQ-Lokalisation wurde in mit pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die isolierten Cardiomyozyten wurden zunächst mit einem gegen CSQ gerichteten Antikörper und anschließend mit einem sekundären Antikörper (anti-Rabbit-IgG) inkubiert. Dieser war mit Biotin gekoppelt, welches durch Streptavidin-Cy3 nachgewiesen werden kann. CSQ konnte als rote Fluoreszenz in den Cardiomyozyten visualisiert werden (Abb. 4.18. C und D). Das mutierte Protein wurde im Zytosol der Zelle detektiert und lag als Sarkomerstruktur organisiert vor, was auf die funktionelle Aktivität des mutierten Proteins hinweist. Dieselbe Anordnung wurde in Mauscardiomyozyten beobachtet, die mit pAd-CSQ^{NT}-infiziert wurden (Abb. 4.18. C und D).

Die Detektion von α -Aktinin, einem kontraktilen Protein der Cardiomyozyten, erfolgte mittels Antikörper und diente als Kontrolle der Infektion von Cardiomyozyten im Gegensatz zu Fibroblasten, welche dieses Protein nicht aufweisen. α -Aktinin, welches üblicherweise an den Z-Scheiben der Sarkomere lokalisiert ist, konnte als grüne Fluoreszenz in den Cardiomyozyten erkannt werden (Abb. 4.18., C und D).

Unreife neonatale Mauscardiomyozyten, die zwei Tage nach der Isolation untersucht wurden, sind polymorph. Häufig weisen sie eine sternförmige Gestalt auf (Abb. 4.18. B und D). Hierbei ist das CSQ, während der Prozessierung im ER, direkt um den Zellkern angereichert. Reifere Cardiomyozyten, welche fünf Tagen nach der Isolation getestet wurden, zeigen die typische gestreckte Form adulter Cardiomyozyten (Abb. 4.18. A und C).

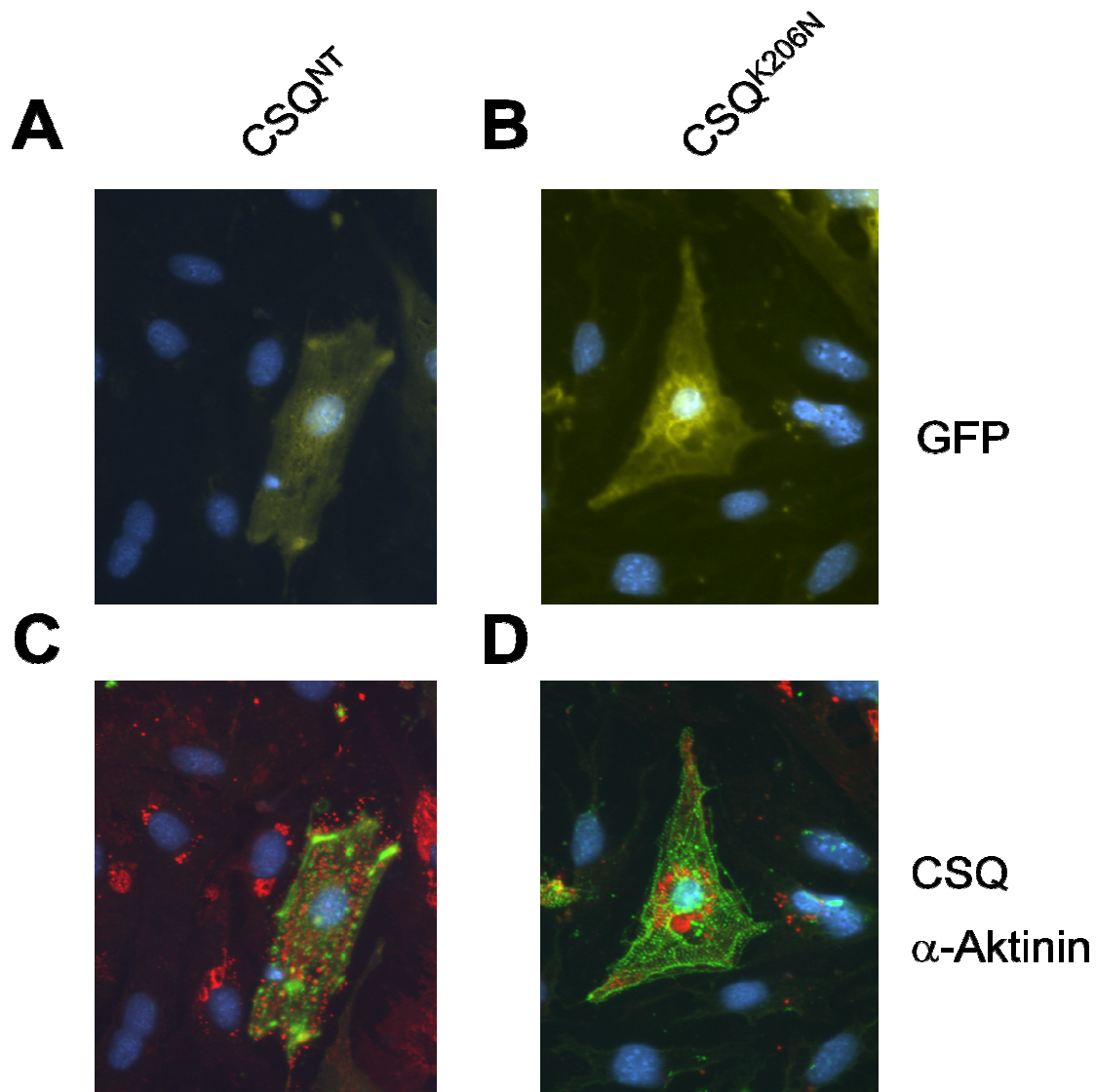


Abb. 4.18.: Immunhistologischer Nachweis der CSQ-Expression in neonatalen Mauscardiomyozyten

Abgebildet sind die Fluoreszenz-Aufnahmen neonataler Mauscardiomyozyten, die mit pAd-CSQ^{NT} (A, C) und pAd-CSQ^{K206N} (B, D) infiziert und für 72 h inkubiert wurden. Die infizierten Cardiomyozyten exprimieren das grün fluoreszierende Protein (GFP) (A, B). C und D zeigen Aufnahmen, in denen CSQ mit einer roten und α -Aktinin mit einer grünen Fluoreszenz nachgewiesen wurde. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch die Inkubation mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) und zeichnet sich durch eine blaue Fluoreszenz aus.

4.14. Deglykosylierung von CSQ^{NT} und CSQ^{K206N}

Das scheinbare Molekulargewicht von CSQ^{NT} in SDS-Gelen beträgt 55 kDa. Kardiales CSQ besitzt eine Glykosylierungsstelle am Asn³¹⁶ (Scott et al. 1988, O'Brian et al. 2002). Das mutierte CASQ2 weist eine neu entstandene Konsensusstelle für eine Asparagin-gekoppelte-Glykosylierung auf (Asn-X-Ser/Thr). Die N-Glykosylierungsstelle befindet sich am Asn²⁰⁶. Um zu testen, ob es bei der Mutation K206N durch den Einbau einer zweiten Glykosylierungsstelle zum beobachteten höheren Molekulargewicht in SDS-Gelen kam, wurden Ad-Ktr.-, pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierte neonatale Mauskardiomyozyten mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) inkubiert. Endo H spaltet als Protease N-glykosidisch gebundene mannosereiche Oligosaccharide direkt vom Asparagin der Aminosäurekette ab (Abb. 4.19 B).

Durch die Inkubation mit Endo H konnte die mutierte zweifach-glykosylierte Form CSQ^{K206N} (ψ_2) vollständig auf die nicht-glykosylierte Form des CSQ zurückgeführt werden. Ebenso wurde die native bzw. einfach-glykosylierte Form von CSQ^{NT} (ψ_1) auf die nicht-glykosylierte Form des CSQ zurückgeführt. Vergleichbare Ergebnisse konnten in HEK293-Zellen (Abb. 4.19 A) und Sf9-Insektenzellen erzielt werden. Die Proben wurden parallel mit unbehandelten Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Das erniedrigte Molekulargewicht der mutierten Form deutet darauf hin, dass eine Deglykosylierung durch Endo H erfolgt ist.

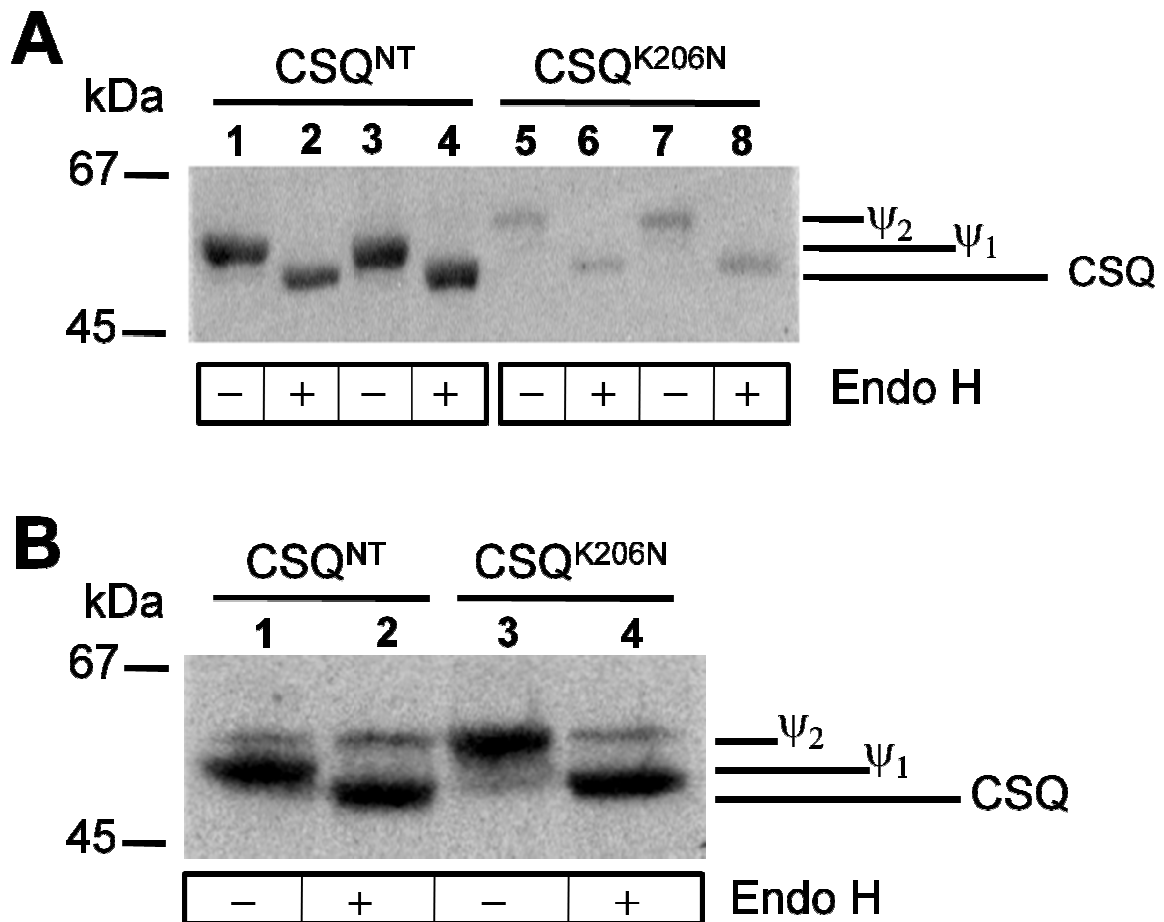


Abb. 4.19.: Deglykosylierung von CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} mit Endo H

Abb. A: Der Immunologische Nachweis von CSQ in adenoviral infizierten HEK293-Zellen zeigt CSQ^{NT} (Spur 1), CSQ^{NT} Endo H behandelt (15 min) (Spur 2), CSQ^{NT} (Spur 3), CSQ^{NT} Endo H behandelt (7.5 min) (Spur 4), CSQ^{K206N} (Spur 5), CSQ^{K206N} Endo H behandelt (15 min) (Spur 6), CSQ^{K206N} (Spur 7), CSQ^{K206N} Endo H behandelt (7.5 min) (Spur 8).

Abb. B: Immunologischer Nachweis von CSQ in adenoviral infizierte neonatalen Mauskaridiomyozyten zeigt CSQ^{NT} (Spur 1), CSQ^{NT} Endo H behandelt (7.5 min) (Spur 2), CSQ^{K206N} (Spur 3), CSQ^{K206N} Endo H behandelt (15 min) (Spur 4).

4.15. Immunhistologische Untersuchung der Koloalisticn von CSQ^{K206N} mit Mannosidase

Normalerweise unterliegt kardiales CSQ einem Abbau durch Mannosidasen, die innerhalb intrazellulärer Kompartimente lokalisiert sind. Der Abbau führt überwiegend zu N-Glykanstrukturen mit 1-4 Mannoseresten (Man1-4) sowie zu Glykanen mit 5-7 Mannoseresten (Man5-7).

Ziel war es zu überprüfen, ob CSQ^{K206N}, bedingt durch die zusätzliche Glykosylierung, einem stärkeren Abbau durch Mannosidasen im Gegensatz zum einfach glykosylierten CSQ^{NT} unterliegt.

Tatsächlich fanden wir in immunhistologischen Untersuchungen der adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten eine stärkere Koloalisticn von CSQ^{K206N} mit Mannosidase II (Abb. 4.20.).

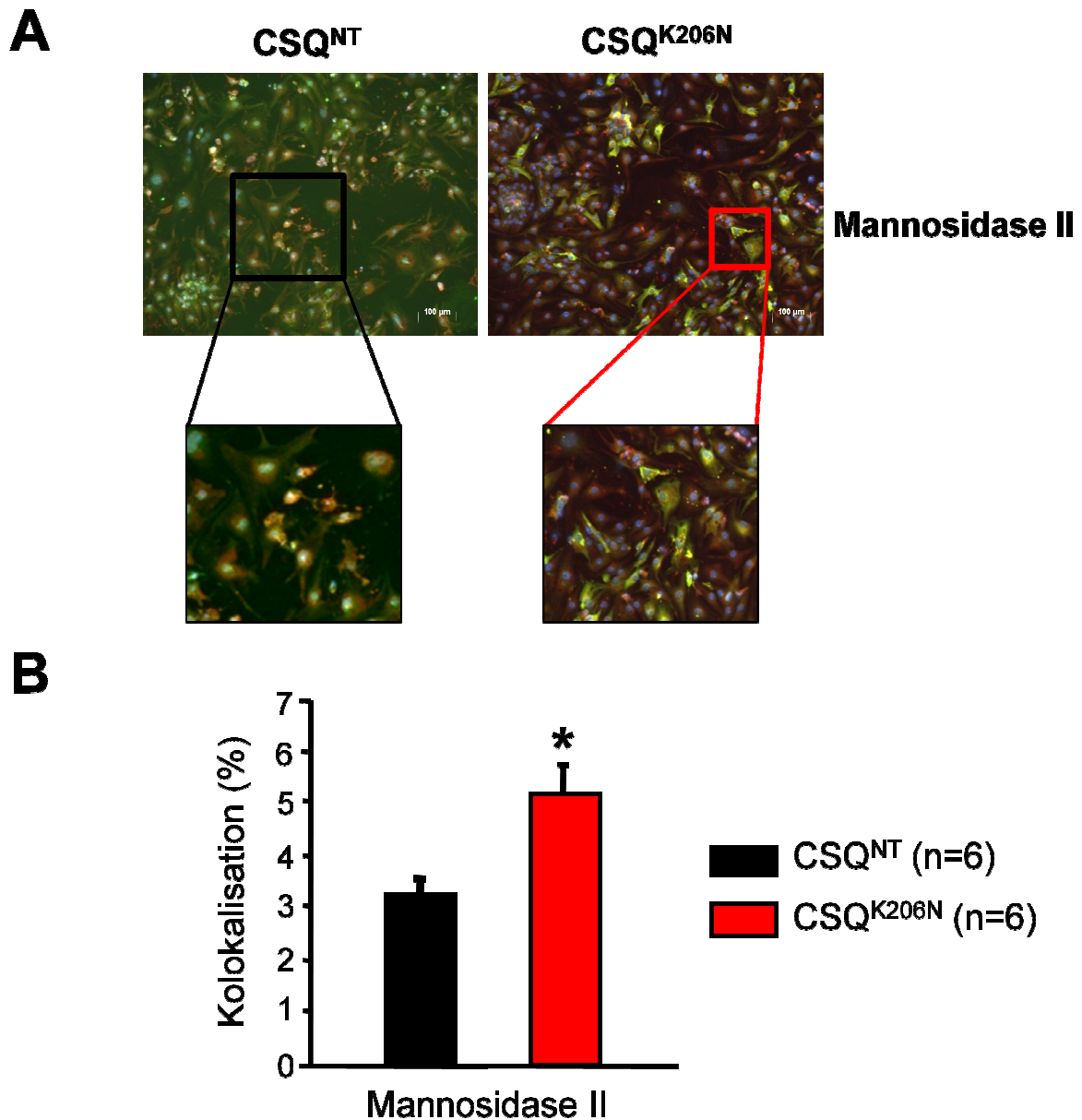


Abb. 4.20.: Immunhistologischer Nachweis der Kolokalisation von CSQ und Mannosidase II

Dargestellt sind mit pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} infizierte neonatale Mauscardiomyozyten (**Abb. A**) bei Betrachtung unter UV-Licht. Durch das Immunofluoreszenz-Verfahren unter Benutzung eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers konnte CSQ nach Anregung der Zellen mit UV-Licht als rot-fluoreszierend und Mannosidase II unter Benutzung von Alexa 488 als grün-fluoreszierend nachgewiesen werden. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch die Inkubation mit DAPI und zeichnet sich durch eine blaue Fluoreszenz aus. **Abb. B** zeigt die Statistik der Kolokalisation von CSQ mit Mannosidase II. * $p < 0,05$ vs. CSQ^{NT}

4.16. Deglykosylierung von CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} unter nicht-reduzierten und nicht-denaturierten Bedingungen

Es besteht eine starke Korrelation zwischen der Ca²⁺-Bindung und der Polymerisierung von CSQ (Park et al. 2004). Je höher die gebundene Ca²⁺-Konzentration an CSQ, umso ausgeprägter ist der Grad der Oligomerisierung. Um zu untersuchen, ob die Mutation von CSQ^{K206N} zu einer Veränderung der stark Ca²⁺-abhängigen Oligomerisierung führt, wurden Untersuchungen mit SDS-Polyacrylamidgelen unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Interessanterweise kam es bei CSQ^{K206N} zu einer ausgeprägten Bildung von Monomeren, während CSQ^{NT} in einer Dimer- und Tetramerform organisiert vorlag. Die vorliegende Monomerform bei der Mutation K206N weist auf eine geringere Ca²⁺-Bindungskapazität hin sowie auf eine Ca²⁺-Abhängigkeit im Polymerisierungsprozess von CSQ.

Das erniedrigte Molekulargewicht von CSQ^{K206N} und CSQ^{NT} zeigte, dass eine Deglykosylierung durch Endo H auch im SDS-freien Gelsystem erfolgt war. Ebenso wird durch die Inkubation mit Endo H deutlich, dass die Organisation der Polymerisierung von CSQ unabhängig vom Grad der Glykosylierung ist (Abb. 4.21.).

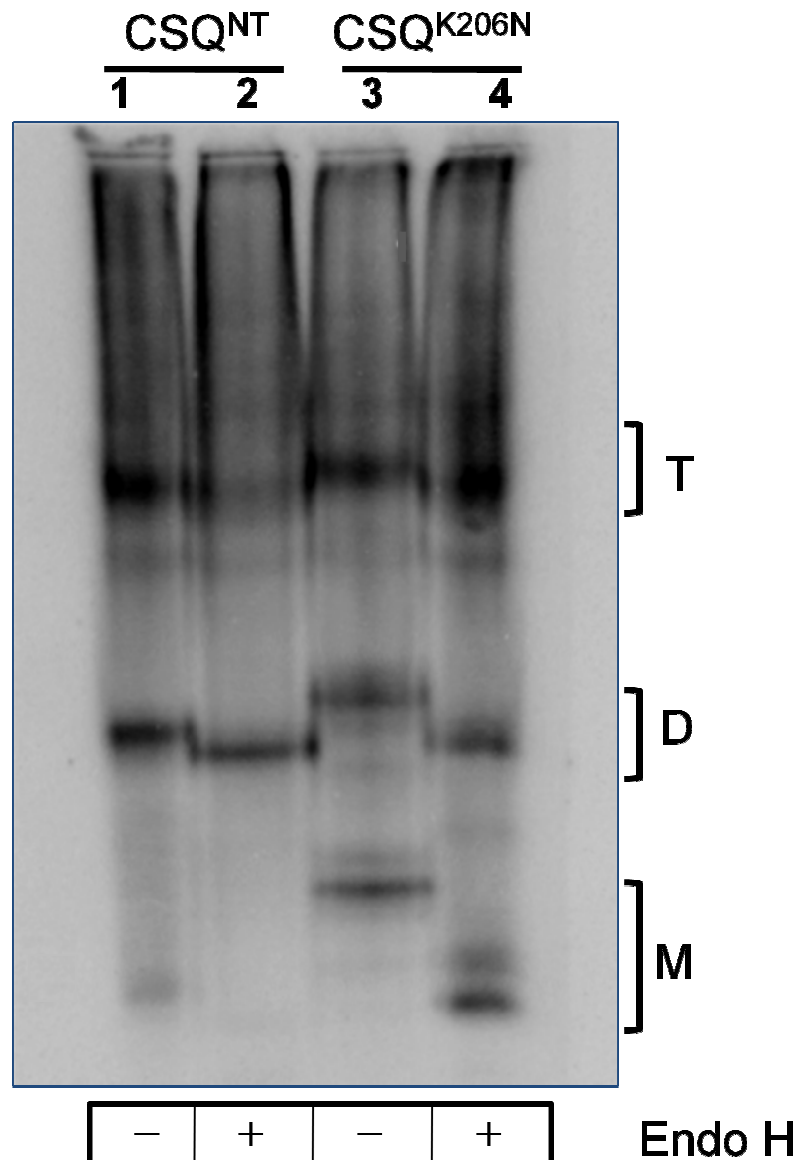


Abb. 4.21.: Gel unter nicht-reduzierten und nicht-denaturierten Bedingungen

Der immunologische Nachweis von CSQ in adenoviral infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten zeigte CSQ^{NT} (Spur 1), CSQ^{NT} mit Endo H behandelt (Spur 2), CSQ^{K206N} (Spur 3) und CSQ^{K206N} mit Endo H behandelt (Spur 4). Es tritt eine überwiegende Bildung von Monomeren (M) bei der Mutante (Spuren 3 und 4) im Gegensatz zur nativen Form (Spuren 1 und 2) auf. Die Elektrophorese erfolgt in einem SDS-freien Gelsystem. Der unterschiedliche Oligomerisierungsgrad von CSQ ist mit T (Tetramer), D (Dimer) und M (Monomer) angegeben.

4.17. Ca²⁺-Bindung von CSQ^{K206N}

Des weiteren haben wir die Ca²⁺-Bindungseigenschaften des nativen und des mutierten CSQ mittels Overlay-Technik (siehe Ca²⁺-Bindungstest) mit ⁴⁵Ca²⁺ getestet. Dabei wurden Sf9-Insektenzellen mit Baculoviren, die für CSQ^{NT} bzw. CSQ^{K206N} kodieren, infiziert. Es wurden ansteigende Mengen von nativen und mutierten CSQ geladen, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit ⁴⁵Ca²⁺ inkubiert.

Wir konnten in Anwesenheit von 1 mM Ca²⁺ eine um 54% reduzierte Ca²⁺-Bindung von CSQ^{K206N}-infizierten Zellen im Vergleich zur nativen Form des CSQ messen. Die geringere Ca²⁺-Bindung von CSQ^{K206N} war auch in Anwesenheit geringerer Ca²⁺-Konzentrationen detektierbar. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Ca²⁺-Bindung in Homogenaten adenoviral infizierter Mauscardiomyozyten. Auch hierbei wurde eine geringere Ca²⁺-Bindung gemessen (Abb. 4.22.).

Des weiteren wurden die Zellhomogenate mit Endo H inkubiert. Hierdurch konnten die Effekte der Ca²⁺-Bindung durch die Hyperglykosylierung eliminiert werden. Die basale Ca²⁺-Bindung von CSQ^{K206N} war hierbei um 49% im Vergleich zur nativen Form reduziert. Die Deglykosylierung der Proteine durch Inkubation mit Endo H führte zu einer vergleichbaren Ca²⁺-Bindung in beiden Gruppen. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation zur Reduktion der Ca²⁺-Bindung führt.

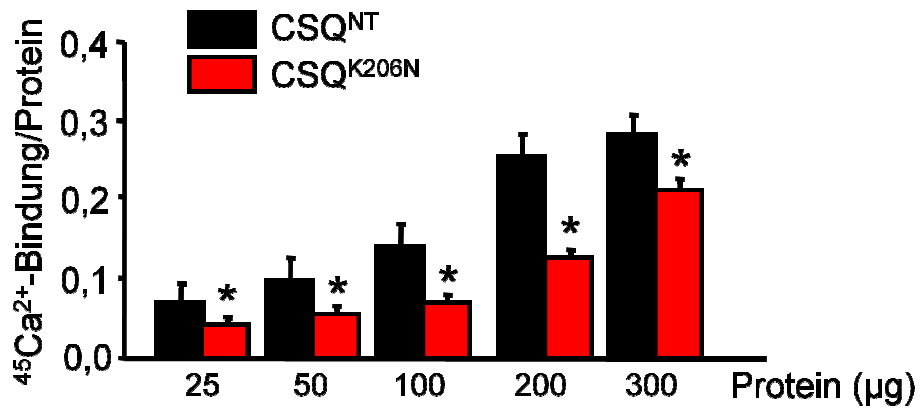
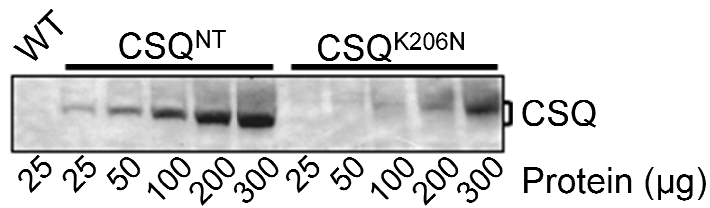
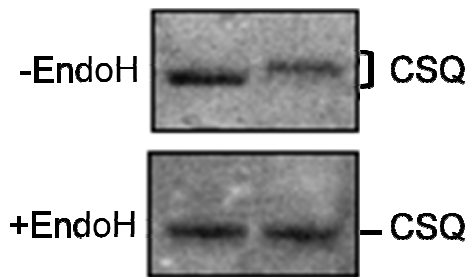
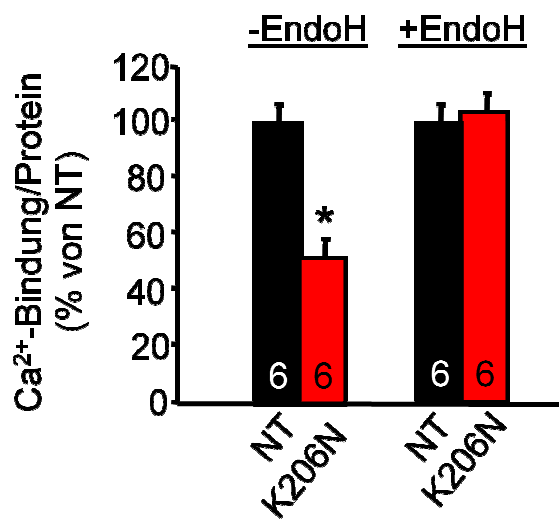
A**B****C**

Abb. 4.22.: Ca²⁺-Bindungseigenschaften von CSQ^{K206N/NT}

Insektenzellen wurden mit Baculoviren, die für CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} kodieren, infiziert, homogenisiert, in ansteigenden Mengen geladen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Zellen wurden auch mit WT-Baculoviren (WT) infiziert. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit ⁴⁵Ca²⁺ in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ inkubiert und für fünf Tage in der Expositionskassette gelagert. **Abb. A** zeigt das Autoradiogramm sowie die quantifizierten Signale im Verhältnis zur Proteinexpression. **Abb. B** zeigt Homogenate von infizierten Kardiomyozyten mit und ohne Endo H-Behandlung sowie Homogenate einer ⁴⁵Ca²⁺-Inkubation auf einer Nitrozellulosemembran. In **Abb. C** sind die zusammengefassten Daten der ⁴⁵Ca²⁺-Overlay-Messungen von Homogenaten infizierter Kardiomyozyten dargestellt. *p<0,05 vs. NT

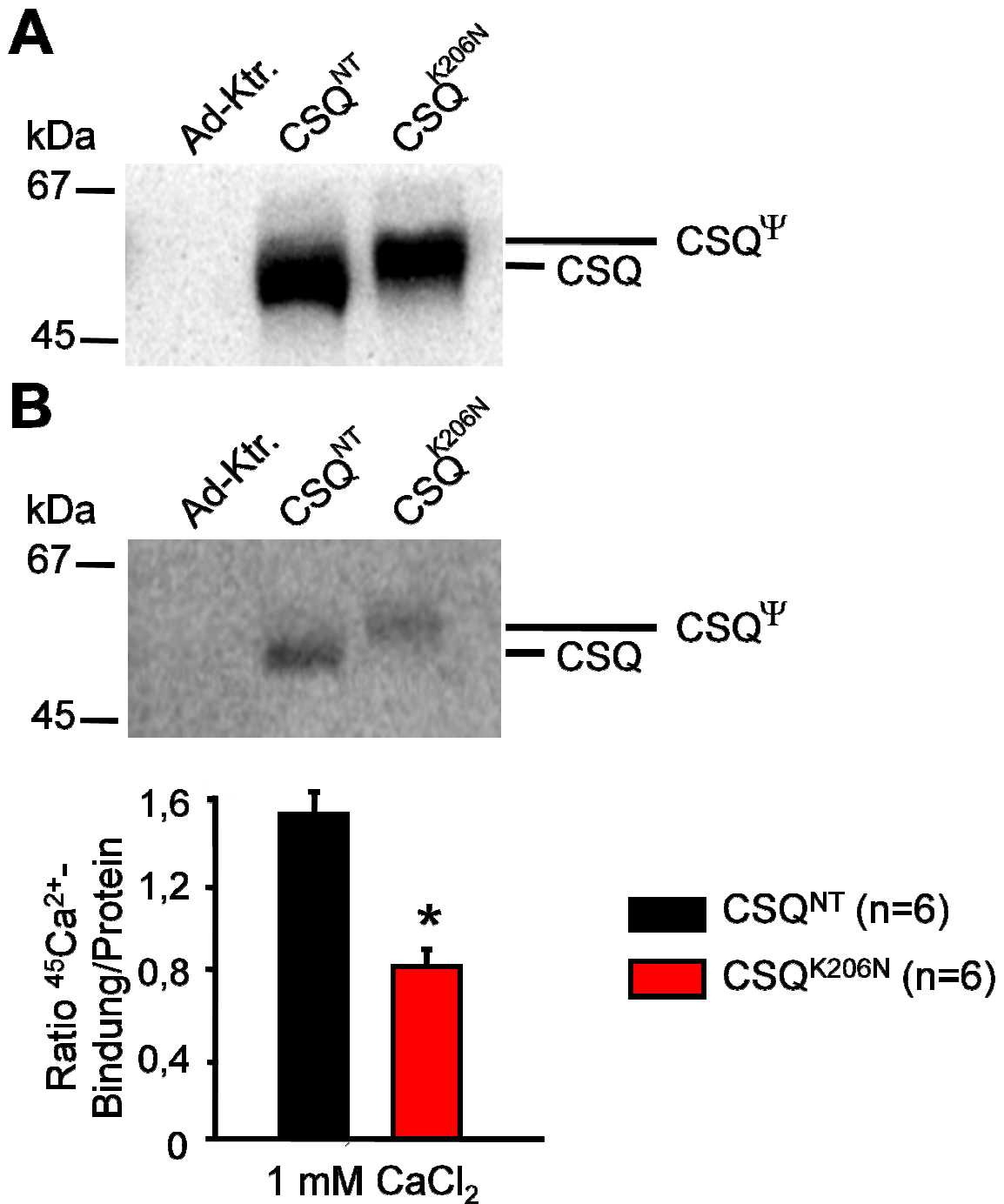


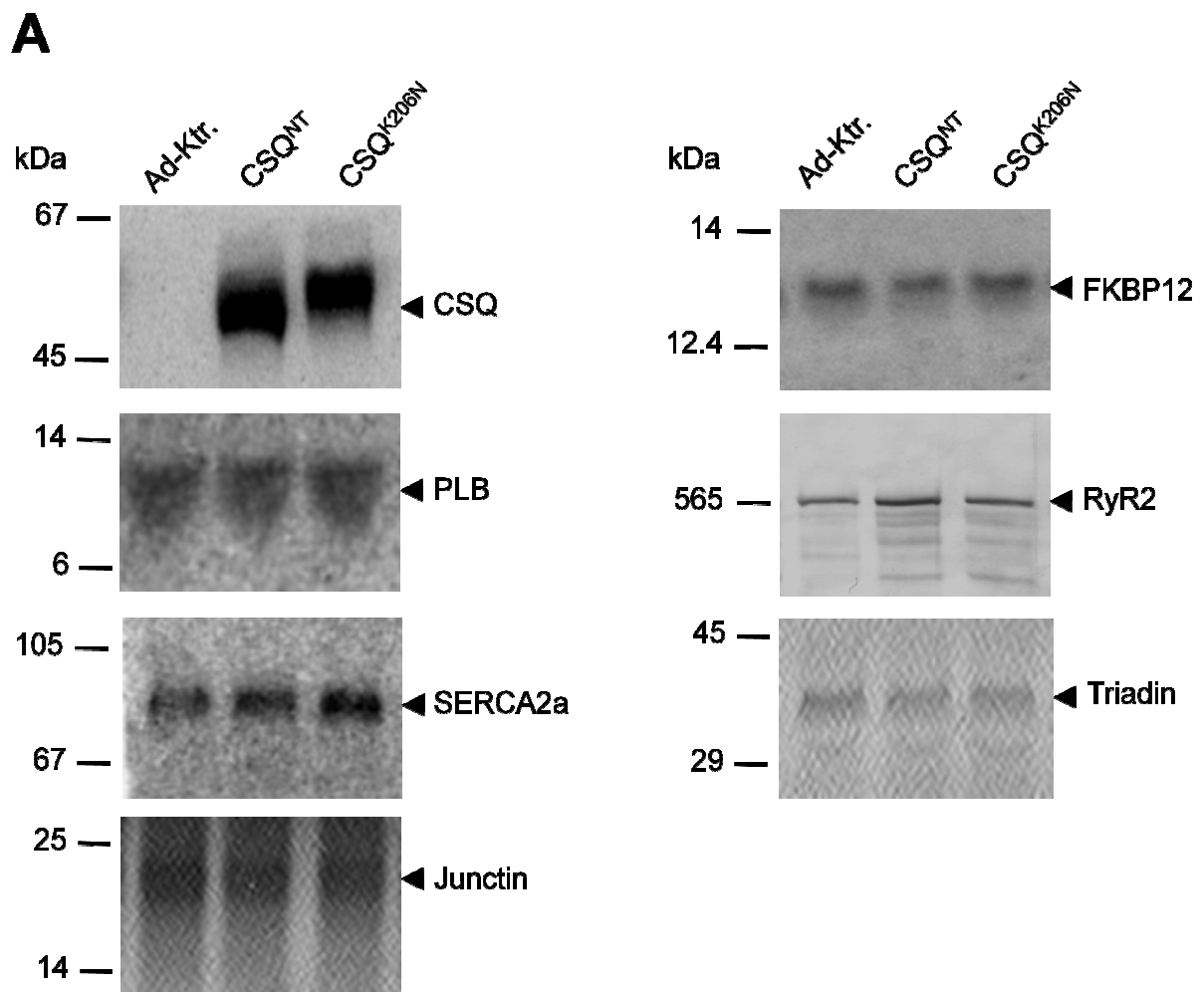
Abb. 4.22.: Ca^{2+} -Bindung von rekombinantem CSQ

Dargestellt ist ein Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression von CSQ (**A**) und das Autoradiogramm einer Inkubation mit $^{45}\text{CaCl}_2$ zum Nachweis der Ca^{2+} -Bindung (**B**) in Homogenaten von neonatalen Mauscardiomyozyten nach Infektion mit dem CSQ^{NT}-, CSQ^{K206N}- und Ad-Ktr.-Adenovirus. Das Verhältnis $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/CSQ-Protein im Ca^{2+} -Overlay wurde quantifiziert (**C**). * $p < 0,05$ vs. CSQ^{NT}

4.18. Expression Ca²⁺-regulierender Proteine

Des weiteren sollten die Auswirkungen der CSQ-Mutation K206N auf die Expression an der Ca²⁺-Homöostase beteiligter Proteine bestimmt werden. Zu den untersuchten SR-Proteinen zählten SERCA2a, PLB, JCN und TRD sowie der Ryanodin-Rezeptor und FKBP12.6. Zum Nachweis dieser Proteine wurden Zellhomogenate von infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten, wie unter 3.3.2.1. beschrieben, angefertigt und die Proteine mittels spezifischer Antikörper (Tab. 7.1.) im Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.23., A) und anschließend quantifiziert.

Der Vergleich von CSQ^{K206N} und CSQ^{NT} zeigte keine Unterschiede in der Expression der untersuchten SR-Proteine. Eine graphische Darstellung der Daten ist in Abb. 4.23., B zu sehen.



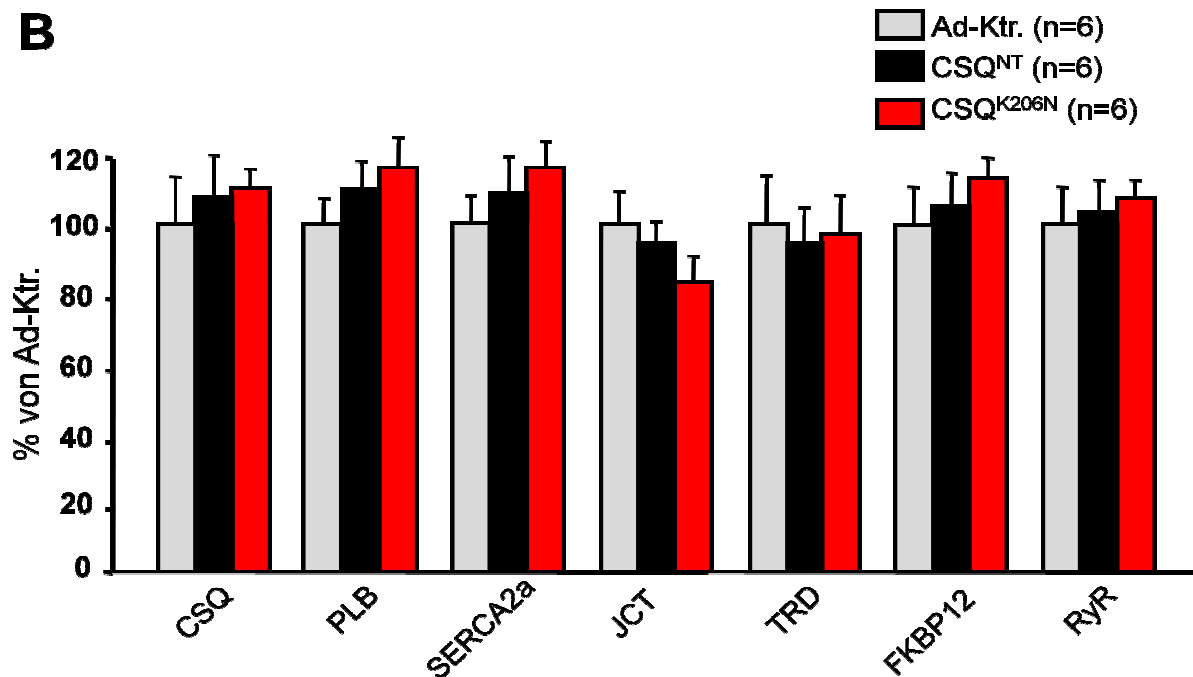


Abb. 4.23.: Immunologischer Nachweis von Proteinen des SR in Homogenaten von neonatalen Mauskardiomyozyten nach adenoviraler Infektion

Abb. A: Die Expression folgender SR-Proteine wurde in adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten nachgewiesen: Calsequestrin (CSQ), Phospholamban (PLB), SERCA2a, Junctin (JCN), Triadin (TRD), FKBP12.6 und der Ryanodinrezeptor vom Typ 2 (RyR). Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper.

Abb. B: In SDS-haltigen Homogenaten adenoviral infizierter neonataler Mauskardiomyozyten wurde die Expression verschiedener SR-Proteine mittels spezifischer Antikörper immunologisch bestimmt. Die im Immunoblot erhaltenen Signale wurden als Phosphorlimer-Einheiten gemessen. Die Proteinexpression für Ad-Ktr. wurde gleich 100% gesetzt.

4.19. Messung von Ca²⁺-Uptake und [³H]Ryanodin-Bindung

In Übereinstimmung mit dem Expressionsniveau der Proteine des freien SR konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es in Homogenaten aus mit pAd-CSQ^{K206N}- und pAd-CSQ^{NT}-infizierten Kardiomyozyten im Vergleich zu Ad-Ktr. zu keiner veränderten Ca²⁺-Aufnahme ins SR über die SERCA2a kommt. Die Messung der Ca²⁺-Aufnahme ist ein indirekter Hinweis auf die SERCA2a Aktivität. Hierbei wurde bestimmt, wieviel nmol an Ca²⁺ pro mg Protein in einer bestimmten Zeit aufgenommen wurden (Abb. 4.24., A).

Um zu testen, ob die Expression von CSQ^{K206N} einen Effekt auf den Öffnungszustand des SR-Ca²⁺-Freisetzungskanals (RyR) hat, wurde die [³H]Ryanodin-Bindung in Homogenaten infizierter Myozyten gemessen. [³H]Ryanodin bindet nur an geöffnete RyR (Meissner et al. 1994). Der [³H]Ryanodin-Bindungsassay wurde somit als indirekte Bewertung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Ca²⁺-Freisetzungskanals benutzt.

Interessanterweise kam es dabei zu einer auf 232% erhöhten [³H]Ryanodin-Bindung in CSQ^{K206N} im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied zwischen CSQ^{NT} und der Kontrolle (Abb. 4.24., B).

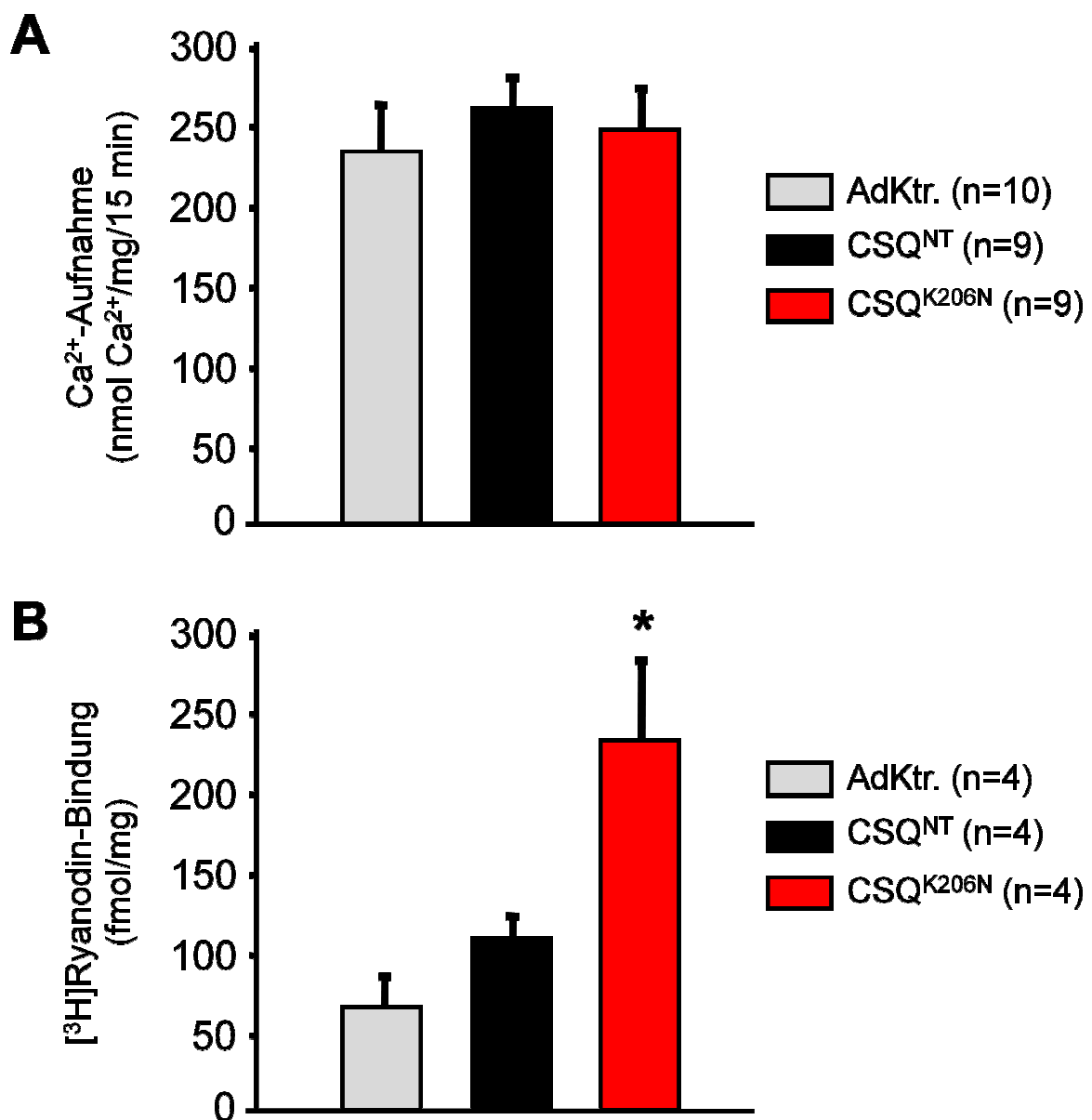


Abb. 4.24.: Nachweis der SR Ca²⁺-Aufnahme und [³H]Ryanodinbindung

Abb. A zeigt die Ca²⁺-Aufnahme in das SR in Homogenaten von adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten mit Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N}. **Abb. B** zeigt die Bindung von [³H]-markiertem Ryanodin an den RyR in mit Ad-Ktr., CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten. *p<0,05 vs. CSQ^{NT}

4.20. Expression der Hitzeschockproteine

Unter Hitzeschockproteinen versteht man Proteine, deren Synthese in einer Vielzahl von Zelltypen und Organismen unter definierten Bedingungen induziert wird (Lindquist et al. 1988 und Parsell et al. 1993). Diese sogenannten molekularen Chaperone spielen eine wichtige Rolle bei Hitzestress und ihre Aufgabe besteht darin, Schäden von z.B. entfalteten Proteinen durch Reparaturmechanismen zu beseitigen (Laskey 1978). Hitzeschockproteine werden u.a. nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Familien unterteilt (z.B. HSP70 und GRP94).

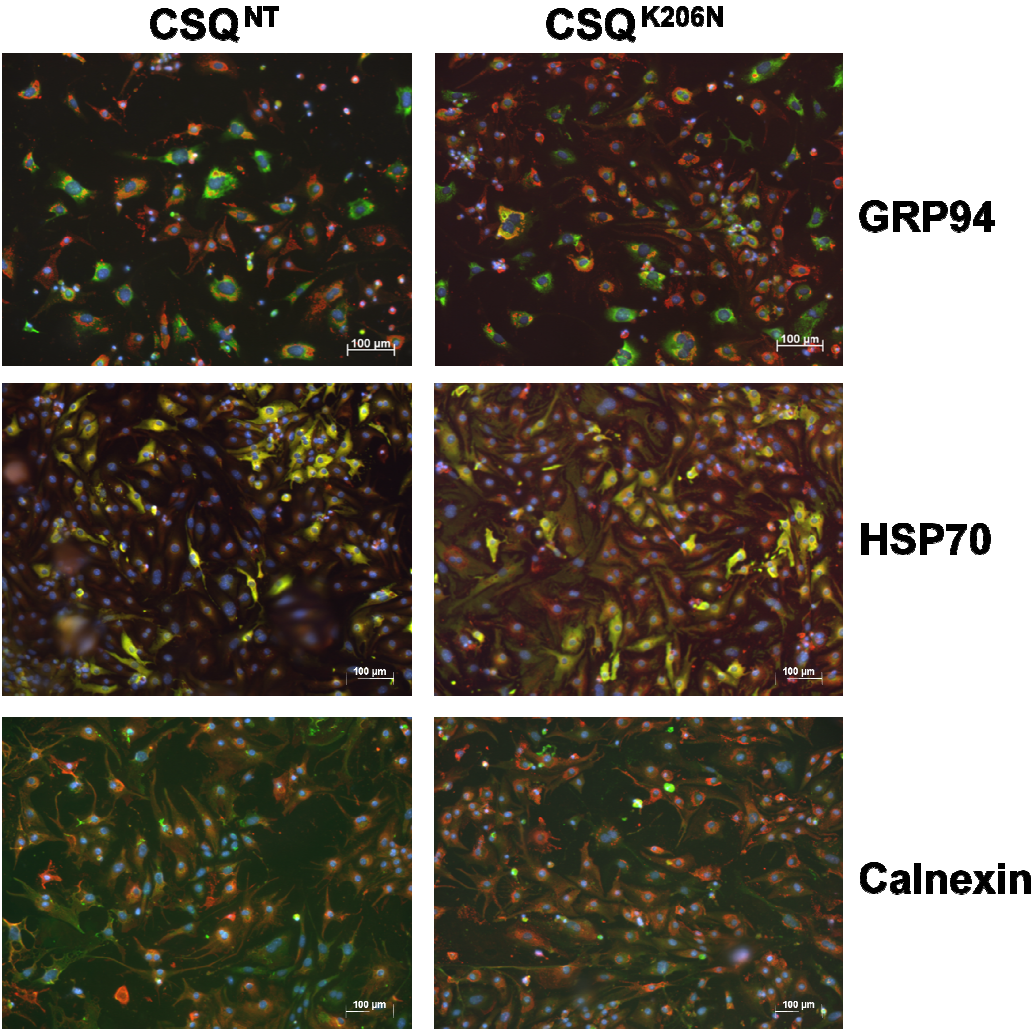
Es stellte sich die Frage, ob durch die CSQ-Mutation K206N eine vermehrte Expression des Chaperons HSP70 induziert wird. Es gehört zur Familie der 70-kDa Chaperone des luminalen ER und stabilisiert zelluläre Proteine. In immunzytologischen Untersuchungen kam es zu keiner erhöhten Kolo-kalisation von HSP70 und CSQ^{K206N}. In mit pAd-CSQ^{K206N} infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten war die mittels Western Blot-Analyse ermittelte Proteinmenge von HSP70 im Vergleich zur CSQ^{NT}- und Ad-Ktr.-Gruppe nicht erhöht (Abb. 4.25.).

Ebenso wurde Calnexin untersucht. Es gehört zur Familie der 90-kDa Chaperone und liegt membrangebunden vor. Die Aktivität des Proteins ist Ca²⁺-abhängig. Calnexin erkennt bestimmte Zuckerreste von unvollständig gefalteten Proteinen und unterstützt sie in ihrem Faltungsprozess. Es konnte keine erhöhte Kolo-kalisation von Calnexin und CSQ^{K206N} in immunzytologischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Abb. 4.25.).

Das 94-kDa große Glukose-regulierende Protein Endoplasmin (GRP94) wurde auch geprüft. Es gehört zur Familie der 90-kDa Chaperone des luminalen ER und wird bei der Akkumulation ungefalteter Proteine, die in Assoziation mit Defekten oder Mutationen stehen, induziert. Auch dieses Chaperon war unverändert exprimiert und

die Koloalisation mit dem mutierten CSQ^{K206N} im Vergleich zu CSQ^{NT} und der Ad-Ktr.-Kontrollgruppe war unverändert (Abb. 4.25).

A



B

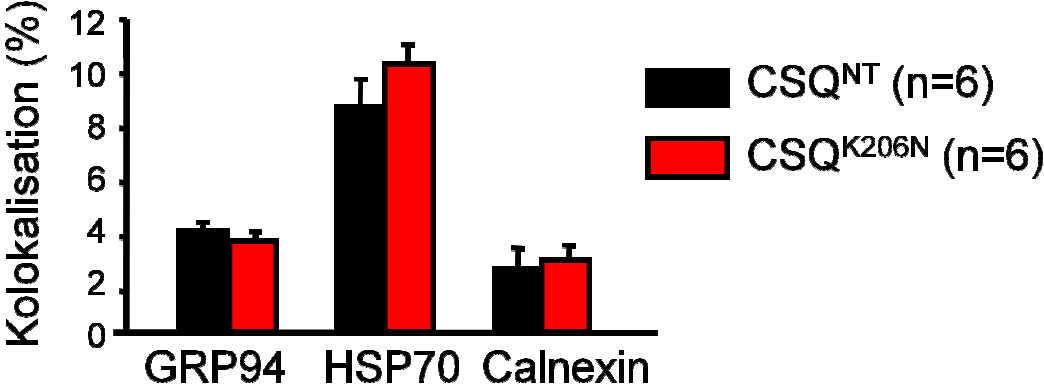


Abb. 4.25.: Immunzytologischer Nachweis der Kollokalisierung von CSQ und GRP94, HSP70 und Calnexin

Dargestellt sind mit pAd-CSQ^{K206N} und pAd-CSQ^{NT} infizierte neonatale Mauscardiomyozyten (**Abb. A**). Unter Benutzung eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers konnte CSQ nach Anregung der Zellen mit UV-Licht als rote Fluoreszenz sowie GRP94, HSP70 und Calnexin unter Benutzung von Alexa 488 als grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch die Inkubation mit DAPI und zeichnet sich durch eine blaue Fluoreszenz aus. **Abb. B** zeigt die statistische Auswertung der Immunfluoreszenz-Messungen für GRP94, HSP70 und Calnexin.

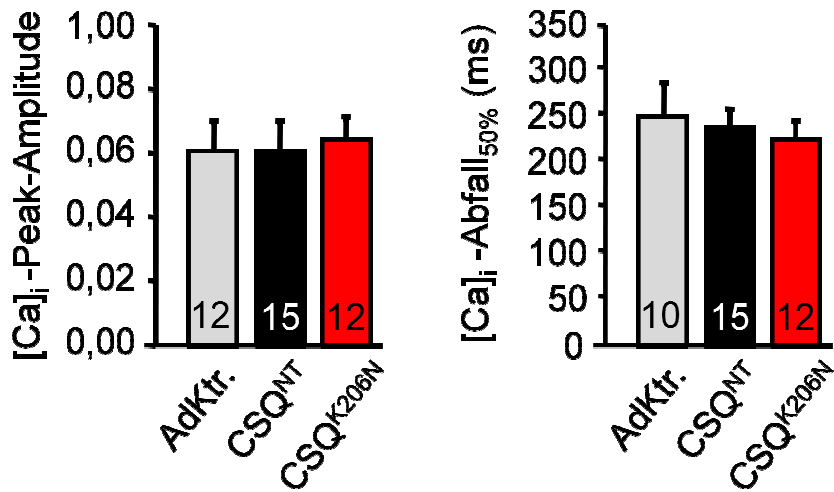
4.21. Ca²⁺-Transientenmessungen in adenoviral infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten

Um zu testen, ob die erniedrigte Ca²⁺-Bindung von CSQ^{K206N} mit einer veränderten Ca²⁺-Homöostase in Verbindung steht, wurden Ca²⁺-Transienten in isolierten, elektrisch stimulierten neonatalen Mauscardiomyozyten gemessen. Hierbei fand man keine Veränderungen der basalen Parameter von Ca²⁺-Transienten. Die Ca²⁺-Transienten Peak-Amplitude und die Abfallkinetik waren bei 0,5 Hz zwischen Ad-Ktr., CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} nicht verschieden (Abb. 4.26., A).

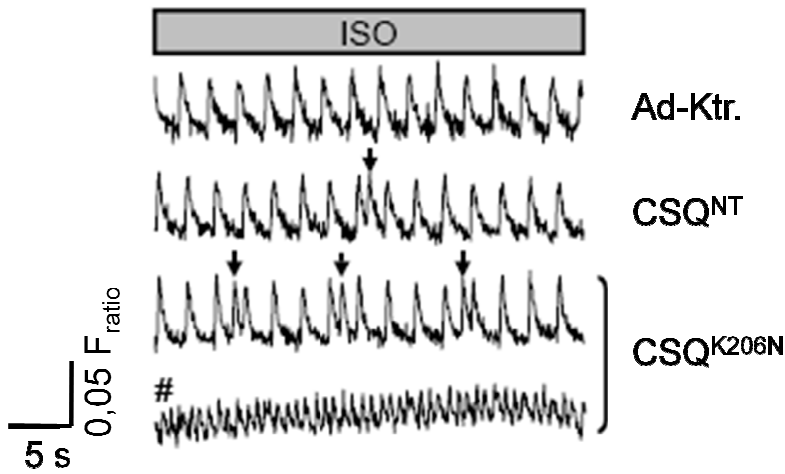
Interessanterweise beobachtete man aber spontane Ca²⁺-Transienten unter Isoprenalin in Myozyten, die CSQ^{K206N} und CSQ^{NT} exprimierten (Abb. 4.26., B). Unter basalen Bedingungen waren diese spontanen Ca²⁺-Freisetzungen nur in mit pAd-CSQ^{K206N} infizierten Myozyten beobachtbar. Die spontanen Ca²⁺-Peaks traten in der Ad-Ktr.-Gruppe nicht auf (Abb. 4.26., C).

Diese Daten weisen auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen den beobachteten spontanen [Ca]_i-Transienten und der Entstehung von einer CPVT in Patienten mit dieser CSQ-Mutation hin.

A



B



C

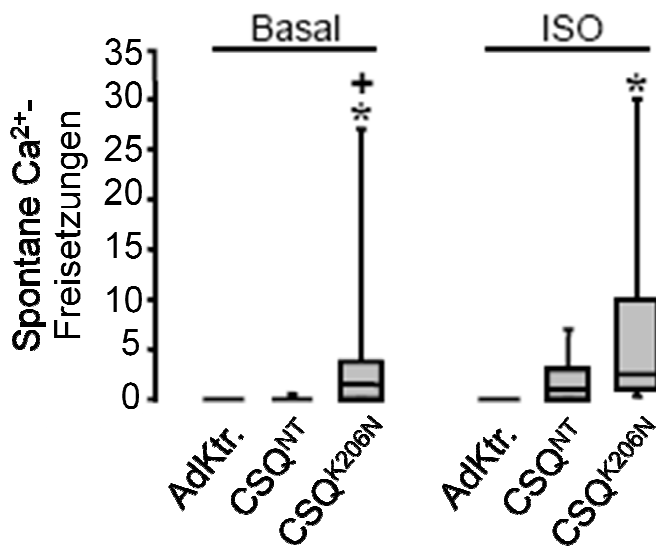


Abb. 4.26.: Ca²⁺-Transienten und spontane SR-Ca²⁺-Freisetzungen

Abb. A zeigt die basale Peak-Amplitude und den 50%igen Abfall der Ca²⁺-Transienten bei 0,5 Hz in adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten. **Abb. B** stellt Aufnahmen von elektrisch stimulierten Mauskardiomyozyten unter Gabe von 1 µM Isoprenalin (Iso) dar. Die Pfeile zeigen das Auftreten von diastolischen Ca²⁺-Peaks, welche auf spontane SR Ca²⁺-Freisetzungen hindeuten. Ca²⁺-Oszillationen wurden nur in CSQ^{K206N}-exprimierenden Mauskardiomyozyten beobachtet (#). In **Abb. C** sind spontane SR-Ca²⁺-Freisetzungen in mit Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten (n=8-14) unter basalen Bedingungen sowie unter Isoprenalin dargestellt. *p<0,05 vs. Ad-Ktr.; †p<0.05 vs. NT

Systolischer und diastolischer Quotient

Die Untersuchung der Ca²⁺-Transienten ergab sowohl für den diastolischen als auch für den systolischen Quotienten keine Unterschiede zwischen Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten. Eine Erhöhung der elektrischen Stimulation von 0,5 auf 1,0 und dann auf 2,0 Hz sowie die β-adrenerge Stimulation durch 1µM Isoprenalin erbrachte keine Änderung der Parameter zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 4.27.).

Differenz zwischen systolischem und diastolischem Quotienten (Δ Ratio)

Die Differenz zwischen systolischem und diastolischem Quotienten (ΔRatio) war zwischen Ad-Ktr., CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} unter basalen Bedingungen als auch nach Isoprenalin- Stimulation nicht verschieden. Bei einer Erhöhung der Frequenz auf 1,0 und 2,0 Hz waren pAd-CSQ^{K206N}-infizierte Zellen sowohl gegenüber pAd-CSQ^{NT}-infizierten als auch Ad-Ktr.-infizierten Zellen in der Peak-Amplitude der Ca²⁺-Transienten nicht verschieden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ΔRatio innerhalb der Gruppen Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} bei Erhöhung der elektrischen Stimulation von 0,5 auf 2,0 Hz abnahm (Abb. 4.28.).

Zeit bis zum Abfall auf den halbmaximalen Wert der Ca²⁺-Transienten

Die Zeiten bis zum Abfall der Ca²⁺-Transienten auf den halbmaximalen Wert (t_{50%}) wiesen für Ad-Ktr., CSQ^{NT} und CSQ^{K206N} unter basalen Bedingungen keine

Unterschiede auf. Isoprenalin führte zu keiner signifikanten Abnahme von $t_{50\%}$ in CSQ^{K206N}, CSQ^{NT} und Ad-Ktr.

Es bestanden zwischen Ad-Ktr.-, pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten nach elektrischer Stimulation der Zellen mit 0,5 bzw. 1,0 und 2,0 Hz keine signifikanten Unterschiede für $t_{50\%}$ (Abb. 4.29.).

Zeit bis zum Abfall auf 10% des maximalen Quotienten des intrazellulären Ca²⁺

Bei der Bestimmung der Zeit bis zur 90%igen-Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($t_{90\%}$) bestanden zwischen Ad-Ktr.-, pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierten Mauscardiomyozyten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.30.).

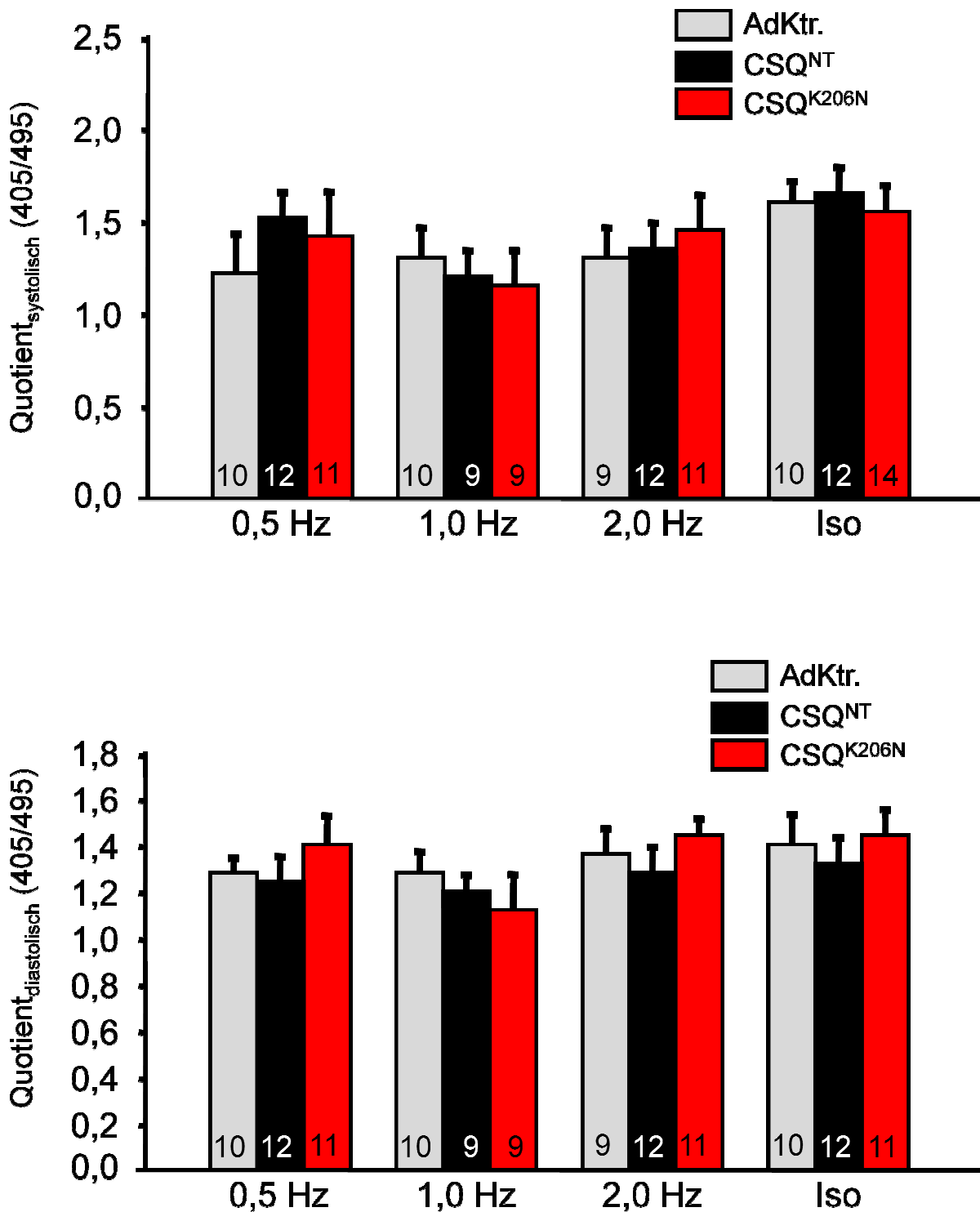


Abb. 4.27.: Systolischer und diastolischer Quotient

Es sind die systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen (405/495 nm) in mit Ad-Ktr.-, pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten bei einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz sowie unter β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin (Iso) dargestellt. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben.

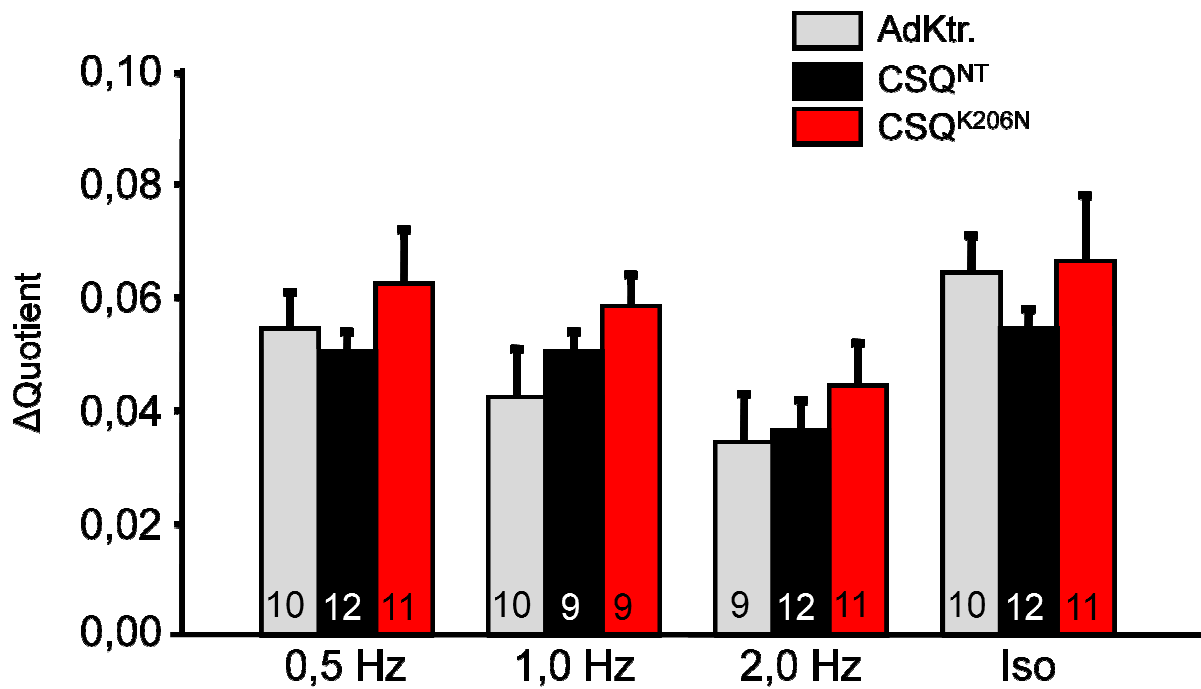


Abb. 4.28.: Δ Quotient

Dargestellt sind die maximalen Peak-Amplitudenhöhen der Ca^{2+} -Transienten in Ad-Ktr.-, pAd-CSQ^{NT}- und pAd-CSQ^{K206N}-infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten bei einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz sowie nach β -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin (Iso). Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben.

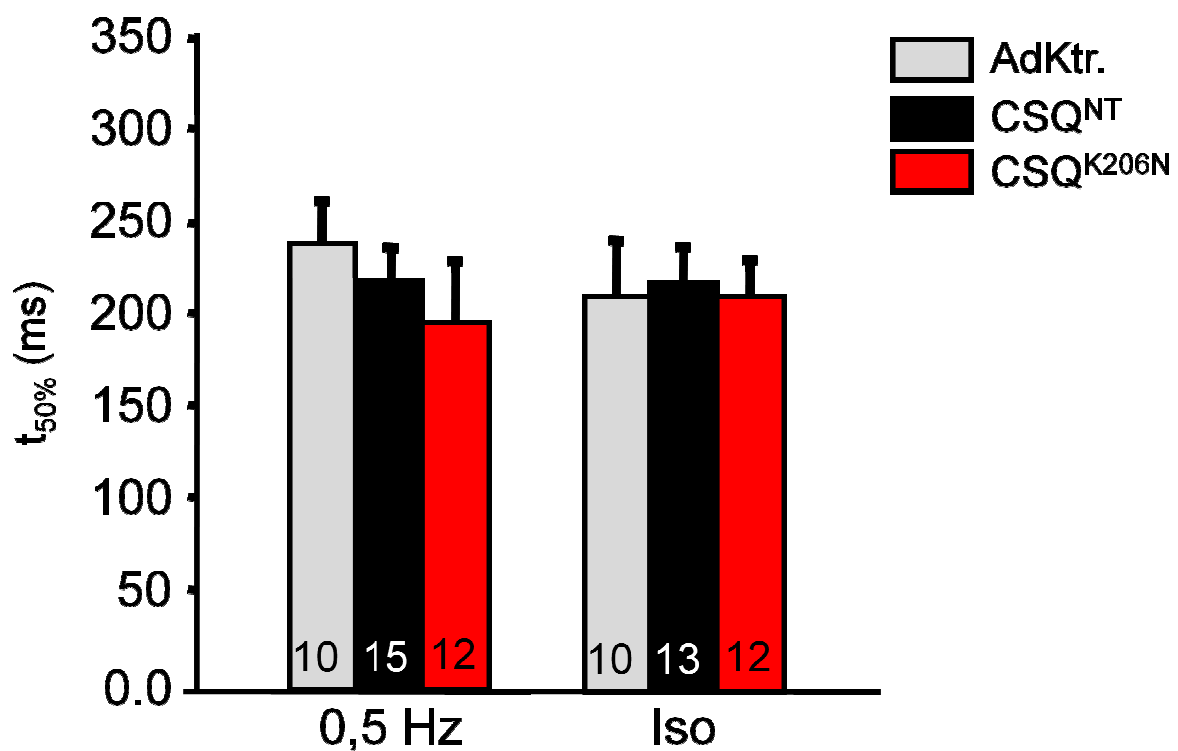
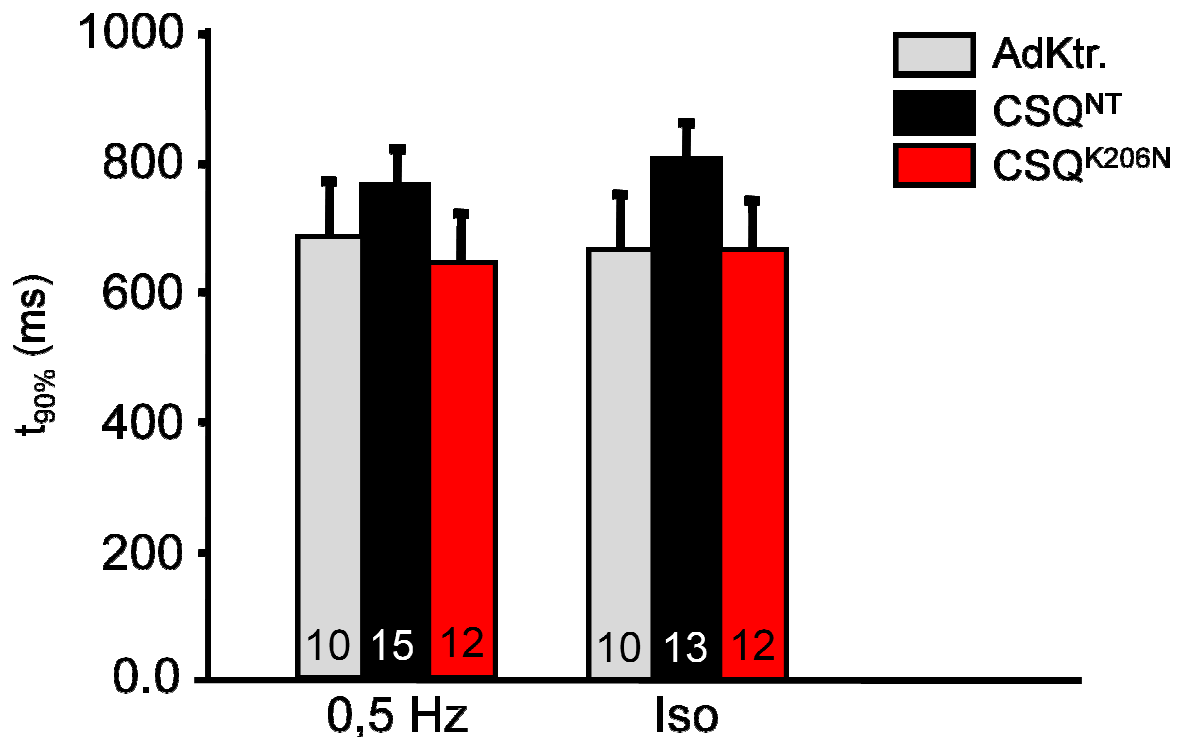


Abb. 4.29.: $t_{50\%}$

Es ist der 50%ige Abfall der gemessenen Ca^{2+} -Transienten in neonatalen Mauskardiomyozyten abgebildet. Die Zellen wurden mit Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} infiziert und bei einer Frequenz von 0,5 Hz in An- und Abwesenheit von Isoprenalin stimuliert. Die Anzahl der eingesetzten Zellen für die Ca^{2+} -Transientenmessungen ist in den Säulen angezeigt.

**Abb. 4.30.: $t_{90\%}$**

Dargestellt ist die Zeit bis zum Abfall der Ca^{2+} -Transienten um 90% ($t_{90\%}$) in mit Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten bei einer Stimulation von 0,5 Hz sowie unter Isoprenalin. Die Anzahl der eingesetzten Zellen für die Messung der Ca^{2+} -Transienten ist in den Säulen angegeben.

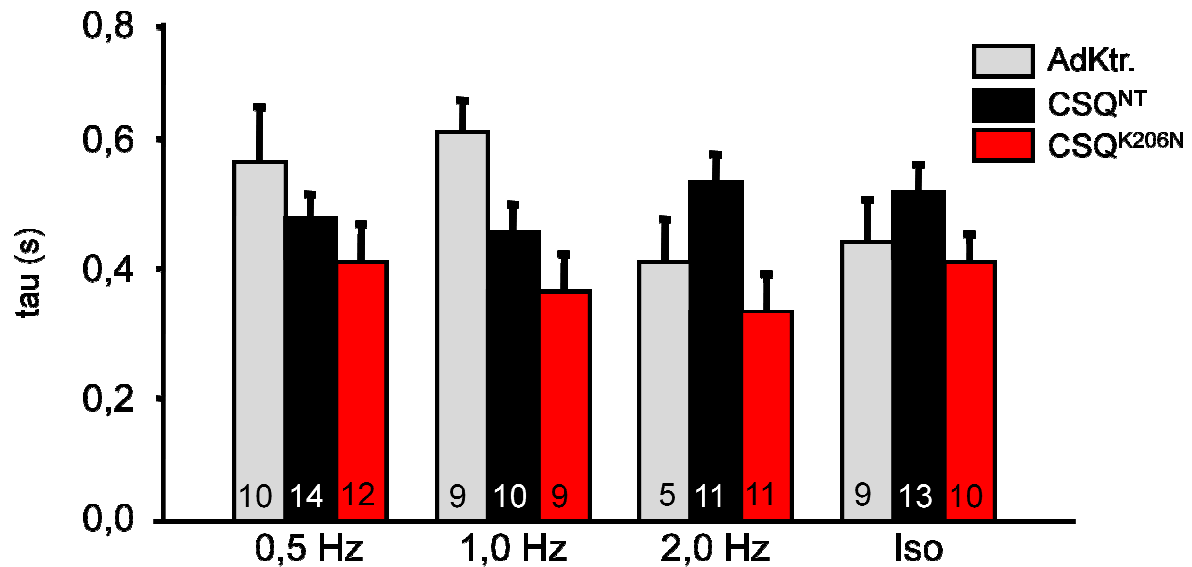


Abb. 4.31.: Transienten-Abfallzeit

Es sind die Abfallzeiten der gemessenen Ca²⁺-Transienten in infizierten neonatalen Mauskaridiomyozyten mit Ad-Ktr., pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} nach elektrischer Stimulation unterschiedlicher Frequenzen sowie unter Isoprenalin dargestellt. Die in den Säulen angegebenen Zahlen kennzeichnen die Anzahl der untersuchten Zellen.

4.22. Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen

Die Triadin-CSQ-Bindung stellt einen wichtigen Regulator für die RyR-vermittelte SR-Ca²⁺-Freisetzung im junctionalen SR dar. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Interaktion zwischen CSQ^{K206N} und TRD mittels Bindungsassay zu untersuchen. Dabei wurde kardiales TRD vom Hund als GST-Fusionsprotein in Insektenzellen exprimiert. Dieses Fusionsprotein lief in Höhe von etwa 67 kDa im SDS-Gel. Rekombinantes mutiertes und natives CSQ wurden vom GST-Fusionsprotein gebunden. Dabei war die Bindungsinteraktion zwischen CSQ^{K206N} und TRD in An- und Abwesenheit von 1 mM Ca²⁺ im Vergleich zu CSQ^{NT} nicht verschieden (Abb. 4.32.).

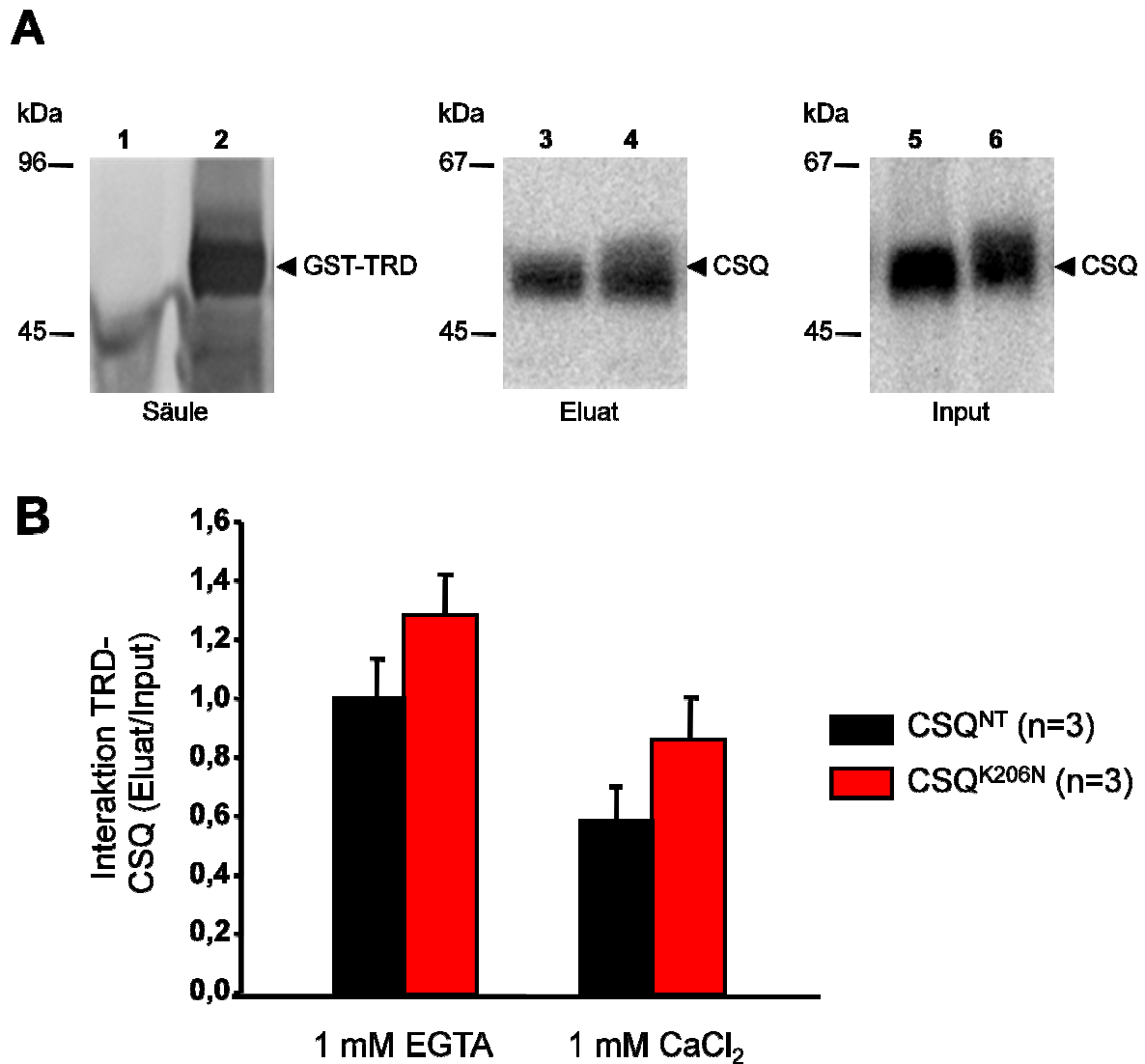


Abb. 4.32.: Nachweis der Protein-Protein Interaktion mittels „Pull-down-Assay“

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von GST-TRD und CSQ unter 1 mM CaCl₂ (**Abb. A**) sowie die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden (**Abb. B**) in Homogenaten von neonatalen Mauscardiomyozyten nach Infektion mit den Adenoviren pAd-CSQ^{NT} und pAd-CSQ^{K206N} (MOI = 10). **Abb. A** zeigt die Beladung der Säule mit GST-TRD (Spur 2). Als Kontrolle diente eine nicht beladene Säule (Spur 1). Der CSQ-Nachweis zeigt die Bindung von CSQ^{NT} (Spur 3) sowie CSQ^{K206N} (Spur 4) an GST-TRD. Die Quantifizierung der Inputs an CSQ^{NT} (Spur 5) und CSQ^{K206N} (Spur 6) lassen eine Aussage über die Bindung von CSQ an TRD zu.

5. Diskussion

5.1. Mutationen im CASQ2-Gen und CPVT

Den ersten Hinweis dafür, dass *CASQ2* neben *RyR2* ein Kandidatengenen für die CPVT darstellt, erbrachten Lahat et al. (2001). Sie identifizierten die *CASQ2*-Mutation D307H in sieben Beduinen-Familien aus Nord-Israel mit den typischen Merkmalen der CPVT. Aktuell sind sieben *CASQ2*-Mutationen identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mutation D307H mit einer neu identifizierten *CASQ2*-Mutation, K206N, welche in einer Familie mit den klinischen Zeichen der CPVT und plötzlichen Herztod identifiziert wurde, charakterisiert.

Hier wird gezeigt, dass diese Mutationen die Funktion des Proteins verändern, was sich in einer beeinträchtigten Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase bemerkbar macht.

Bei den Mutationen D307H und K206N handelt es sich um Basenaustausche, die nur ein Allel betreffen, also in heterozygoter Form vorliegen. Dieser Basenaustausch führt jeweils zu einer Aminosäuresubstitution. Die von uns identifizierten Missense-Mutationen befinden sich in dem Bereich des Proteins, der für die Ca^{2+} -Bindung und die Interaktion mit dem RyR verantwortlich zu sein scheint.

Durch die Kombination eines transgenen Mausmodells, eines adenoviralen Expressionssystems sowie molekular- und zellbiologischer Methoden versucht diese Arbeit den Pathomechanismus der mutierten Proteine aufzuklären und damit neue Strategien zur Therapie der CPVT zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, welches unter Kontrolle des α -MHC-Promotors kardiospezifisch $\text{CSQ}^{\text{D307H}}$ überexprimierte.

Dem gegenüber stand die adenovirale transiente Expression von $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ in neonatalen Mauskardiomyozyten.

Mit Hilfe dieser beiden Modellsysteme sollte die Bedeutung des Proteins CSQ für die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase genauer untersucht werden.

5.2. Untersuchung von CSQ^{D307H} im transgenen Tiermodell

Durch die Generierung einer transgenen Maus und die Verwendung des α -MHC-Promotors konnte eine organspezifische sechsfache Überexpression von CSQ^{D307H} im Herzen erreicht werden. Die transkriptionelle Aktivität des α -MHC-Promotors ist bereits in der Embryonalphase vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt ist diese jedoch sehr gering und auf die Vorhöfe beschränkt. Unmittelbar nach der Geburt nimmt die T₄-abhängige Promotoraktivität zu. Erst vier Wochen postnatal erreicht der α -MHC-Promotor die maximale Aktivität und ist nun im stärkeren Maße im Ventrikel zu finden (Gulick et al. 1991, Ng et al. 1991, Subramaniam et al. 1991). Der Ca²⁺-Transport in das freie SR blieb bei einer Überexpression von CSQ^{D307H} unverändert. Die Expression von SERCA2a und PLB wies bei sechsfacher Überexpression keine Unterschiede zu den Kontrollgruppen auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer zehnfachen bis zwanzigfachen Überexpression des nativen CSQ eine reduzierte Expression der freien SR-Proteine (Jones et al. 1998, Sato et al. 1998). Die in unseren Experimenten durchgeführten Ca²⁺-Bindungsuntersuchungen zeigten im Vergleich zwischen CSQ^{NT}- und WT- Herzen eine verminderte Ca²⁺-Bindungsfähigkeit des mutierten CSQ^{D307H}-Proteins. Die CASQ2-Mutation D307H befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins in einer hoch konservierten Region. Dieser C-terminale Bereich von CSQ ist angereichert mit Asparagin- und Glutaminsäureresten, welche die Ca²⁺-Bindung ermöglichen (Wang et al. 1998). Die Mutation am Aspartat 307 führt zu einem Austausch eines Guanins in ein Cytosin. Es kommt zu einem Aminosäureaustausch, bei dem negativ geladenes Aspartat durch positiv geladenes Histidin ersetzt wird. Dieser Austausch führt zu einer Störung der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit des CSQ. Die Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von CSQ^{D307H} war um 37% reduziert. Eine verringerte Ca²⁺-Bindung im SR könnte so zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen. Dadurch können Ionenströme aktiviert werden, die zum Auftreten von späten Nachdepolarisationen („delayed afterdepolarizations“, DAD) führen (Bers 2001). Die DADs stellen eine wichtige Ursache für das Entstehen von ventrikulären Tachykardien und Arrhythmien dar (Priori und Corr 1990). Zu diesen Ionenströmen gehören transiente, depolarisierende Ca²⁺-Ströme. Der Na⁺-Ca²⁺-Austauscher, der sowohl einen Ein- als auch Auswärtsstrom erzeugen kann, leistet einen bedeutenden Anteil an der Erhöhung der transienten Ca²⁺-Ströme. Die Stromrichtung wird durch das Membranpotential, die zytosolische Ca²⁺-Konzentration und das intra- bzw. extrazelluläre Na⁺ bestimmt. Ein

einwärtsgerichteter Na^+ - Ca^{2+} -Strom erfolgt zu Beginn eines Aktionspotentials nach der Depolarisation der Zellmembran durch den schnellen Na^+ -Einstrom. Der Anstieg des zytosolischen Natriums unterstützt die Transportrichtung, indem es zu einem Na^+ -Auswärtstransport und einem Ca^{2+} -Einwärtstransport kommt (Vinogradova et al. 2004). Der Ca^{2+} -Einstrom über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher reicht aus, um die Freisetzung von Calcium aus dem SR zu triggern (Leblanc und Hume 1990). Somit führt eine zytoplasmatische Ca^{2+} -Überladung zum früheren Einsetzen des einwärtsgerichteten Na^+ - Ca^{2+} -Stromes im Aktionspotential mit der Folge von späten Nachdepolarisationen. Die Neigung zu diastolischen Depolarisationen wird durch den Ca^{2+} -abhängigen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher reguliert (Ju und Allen 1998).

Die Ca^{2+} -Bindungseigenschaften von nativem CSQ sind abhängig vom Kondensationsstadium. Bindet Ca^{2+} an CSQ kommt es zu einer Konformationsänderung des Moleküls. Dies resultiert in einer Dimerisierung und Polymerisation (Mitchell et al. 1988, Park et al. 2003). Die Oligomerisierung von CSQ ist Ca^{2+} -abhängig und die Ausbildung von CSQ-Polymeren wichtig für eine hohe Ca^{2+} -Bindungskapazität (Park et al. 2003). Ganz deutlich ist der Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Aggregation der CSQ-Monomere noch nicht verstanden, jedoch wird angenommen, dass CSQ-Polymere eine elektrostatisch geladene Oberfläche ausbilden, welche Ca^{2+} binden kann. Somit können strukturelle Defekte der CSQ-Monomere und somit die Störung der Ca^{2+} -abhängigen CSQ-Polymerisation zu einer Reduzierung der hohen Ca^{2+} -Bindungskapazität des Moleküls beitragen. Das negativ geladene Asp³⁰⁷ scheint somit bedeutend für den Oligomerisierungsprozess von CSQ zu sein, da eine Mutation an dieser Stelle eine deutliche Verminderung der Ca^{2+} -Bindung bewirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass CSQ als Inhibitor der funktionellen Aktivität des Ca^{2+} -Freisetzungskanals bei niedrigem SR-luminalen Ca^{2+} fungiert (Györke et al. 2004). Bei steigendem luminalen Ca^{2+} lässt diese Hemmung nach, indem die Ca^{2+} -Bindungsstellen von CSQ mit Ca^{2+} -Ionen besetzt werden. Die Interaktion zwischen CSQ und dem RyR wird physisch über TRD vermittelt (Zhang et al. 1997). Die CSQ-bindende Domäne des TRD ist ein Bereich von alternierend positiv (Lysin) und negativ geladenen (Glutaminsäure) Aminosäuren, die als KEKE-Struktur bezeichnet wird (Guo und Campbell 1995). Diese elektrostatische Interaktion zwischen CSQ und TRD wird Ca^{2+} -abhängig reguliert (Zhang et al. 1997). Es war von Interesse zu untersuchen, ob CSQ^{D307H} die Bindungseigenschaften zum TRD beeinflusst. Hierbei

wurde bei der CSQ-Mutation D307H eine geringere Bindung zu TRD beobachtet. Dieser Befund wurde auch von anderen Arbeitskreisen mit einer Veränderung der Tertiärstruktur von CSQ^{D307H} erklärt (Houle et al. 2004).

Der einfache Austausch von Aspartat durch Histidin scheint eine veränderte Konformation von CSQ zu bewirken, die einen Effekt auf die TRD-Bindung ausübt. Wir vermuten, dass durch die Überexpression von CSQ^{D307H} im Herzen die beobachtete verminderte TRD-Expression als Adaptationsmechanismus anzusehen ist, um eine Beeinflussung der Kanalaktivität zu minimieren. Diese verminderte Expression von TRD scheint ein spezifischer Effekt zu sein, da wir keine veränderte TRD-Expression bei einer Überexpression von CSQ^{NT} fanden. Jedoch ergab die beeinträchtigte Interaktion des mutierten Proteins zum TRD keinen Effekt auf die Aktivität des RyR, gezeigt durch einen [³H]Ryanodin-Bindungsassay. Wurde die Interaktion von TRD mit dem RyR gehemmt, indem TRD entfernt wurde, nahm die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR zu (Kuniyasu et al. 1999). Diese Interaktion konnte mit isoliertem RyR aus dem Skelettmuskel stärker als bei dem RyR aus dem Herzen beobachtet werden.

Pathogenetisch liegt wahrscheinlich eine mutations-induzierte Störung der Protein-Protein-Interaktion vor und damit eine gestörte Ca²⁺-Freisetzung, die zu einer Störung der Ca²⁺-Homöostase führt (Dulhunty et al. 2006, Viatchenko-Karpinski et al. 2004, Terentyev et al. 2006).

Die Folge der CSQ^{D307H}-Überexpression war eine leichte Herzhypertrophie, sowie daraus resultierende kontraktile Dysfunktionen wie die verminderte Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation durch die Gabe von Isoprenalin. Eine kardiale Herzhypertrophie konnte allerdings in allen transgenen Modellen mit einer Überexpression von junktionalen SR-Proteinen beobachtet werden, so z.B. bei CSQ^{NT} (Sato et al. 1998, Jones et al. 1998), TRD (Kirchhefer et al. 2001) oder JCN (Kirchhefer et al. 2003).

Diese Veränderungen sind möglicherweise auf die gestörte zelluläre Ca²⁺-Homöostase zurückzuführen. So waren die Ca²⁺-Transientenamplituden erniedrigt, was ebenfalls darauf hinweist, dass CSQ^{D307H} die Ca²⁺-Homöostase beeinflusst. Dem CSQ kommt eine wichtige Rolle innerhalb der elektromechanischen Kopplung zu. Der verminderte chronotrope Effekt auf Isoprenalin ist wahrscheinlich die Folge eines reduzierten Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierungsgrades von SR-Proteinen, die an der Regulation der Ca²⁺-Homöostase beteiligt sind.

Die Hypertrophie der Herzen der CSQ^{D307H}-Mäuse könnte ebenso einen Adaptationsmechanismus darstellen. Das Herz versucht möglicherweise so die nachlassende Leistungsfähigkeit auszugleichen. Die Expression verschiedener Proteine ändert sich, um dadurch einen Ausgleich der Leistungsfähigkeit zu schaffen (Chien et al. 1993). Somit können Expressionsänderungen verschiedener kardialer Proteine ein Grund für die Entwicklung einer Herzhypertrophie oder eine Reaktion darauf sein, um damit eine hämodynamische Überlastung zu kompensieren. Neben Genen, die heraufreguliert wurden (z. B. ANP (Kuhn et al. 2004), G_i (Baker et al. 2001)), wurden in Mausmodellen mit kardialer Hypertrophie auch Gene gefunden, die eine Herabregulation der mRNA zeigten. Eines dieser herabregulierten Gene ist die sarkoendoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA2a; Nagai et al. 1989; Mercadier et al. 1990; Schwinger et al. 1999). Außerdem wird diskutiert, ob eine erhöhte diastolische Ca²⁺-Konzentration ein wichtiger Stimulus für die Ausbildung einer Herzhypertrophie ist (Molkentin und Dorn 2001).

Betroffene CPVT-Patienten, bei denen eine CSQ^{D307H}-Mutation festgestellt wurde, zeigen eine Ruhebradykardie mit einer durchschnittlichen Herzrate von 65 min⁻¹ (Lahat et al. 2001). Darüber hinaus zeigen Patienten mit CASQ2-Mutationen vereinzelt eine Sinusbradykardie mit 60 min⁻¹ (Postma et al. 2002). Übereinstimmend mit diesen Befunden zeigte sich hier in den transgenen CSQ^{D307H}-Mausherzen eine leichte Ruhebradykardie. Spontane Herzschläge werden dabei durch eine diastolische Depolarisation von Schrittmacherzellen des sinoatrialen Knotens erzeugt (Irisawa et al. 1993). Die Neigung zu diastolischen Depolarisationen wird durch vielfache Ionenkanalströme reguliert, so auch der Na⁺-Ca²⁺-Austauscher, wie bereits erwähnt (Ju und Allen 1998). Diese Befunde konnten bestätigt werden, da durch die Blockade des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers die spontanen Schläge der Sinusknoten-Schrittmacherzellen gestoppt wurden (Bogdanov et al. 2001).

Die Veränderungen, die sich im transgenen CSQ^{D307H}-Mausmodell zeigten, sind möglicherweise auf eine gestörte Ca²⁺-Homöostase zurückzuführen. Die Störung der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit des CSQ führt zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Diese Ca²⁺-Überladung bedingt späte Nachdepolarisierungen und könnte getriggerte Arrhythmien auslösen. Somit entwickeln sich ventrikuläre Arrhythmien im transgenen Mausmodell und die CPVT in Patienten, bei denen eine CSQ^{D307H}-Mutation festgestellt wurde.

Wie sieht es aber in einem Modell aus, indem es nicht zu einer kompensatorischen Gegenregulation von Proteinen kommt? Wird sich dort auch eine veränderte Funktion des CSQ zeigen, die Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase bewirkt? Die neu identifizierte CASQ2-Mutation, K206N, wurde durch den adenoviralen Gentransfer in neonatale Mauskardiomyozyten untersucht und als Zellkulturmodell dem transgenen Mausmodell gegenübergestellt.

5.3. Untersuchung von CSQ^{K206N} im adenoviralen Expressionsmodell

Adenoviren eignen sich aufgrund der hohen Transfektionsrate adenoviraler Vektoren gut für den Gentransfer (Jaffe et al. 1992, Li et al. 1993, Levrero et al. 1991). Daher wurden zur Untersuchung von CSQ^{K206N} rekombinante Adenoviren generiert. Rekombinante Adenoviren können nahezu alle Arten von Säugetierzellen infizieren. Sie sind ein flexibles und schnell zugängliches Modellsystem. Die Fähigkeit zur Expression von CSQ^{K206N} konnte bereits mit Hilfe des Baculovirussystem und damit in Invertebratenzellen nachgewiesen werden. Das rekombinante Genom Ad-CSQ^{K206N} bildete in HEK293-Zellen replikationsfähige Adenoviren. Das generierte Virus infizierte neonatale Mauskardiomyozyten und exprimierte das Zielgen CSQ^{K206N} erfolgreich. Sowohl die Expression des CSQ^{K206N} als auch des Reportergens GFP war von der eingesetzten Viruskonzentration abhängig. GFP ermöglicht eine direkte Kontrolle der Infektion unter dem Fluoreszenzmikroskop. Neben dem Ad-CSQ^{K206N} wurde ein Ad-CSQ^{NT} und ein Kontrolladenovirus ohne CSQ, Ad-Ktr., hergestellt. Durch molekularbiologische Untersuchungen sollten die Effekte der CSQ^{K206N}-Expression auf die Ca^{2+} -Homöostase in adenoviral infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten überprüft werden.

Die ansteigende CSQ-Proteinexpression durch mehrfache Amplifikationen des CSQ-Adenovirus konnte in HEK293-Zellen mittels Western Blotting nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.15.), ebenso die Expression des Virushüllproteins E2a (siehe Abb. 4.16.). Die adenovirale Überexpression von CSQ in neonatalen Mauskardiomyozyten konnte sowohl mittels Western Blotting als auch durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.15 und 4.18.). Auf Proteinebene konnte konzentrationsabhängig eine ansteigende CSQ-Expression nach Infektion mit den CSQ-Adenoviren detektiert werden (Abb. 4.17.). Ebenso konnte die GFP-Expression in infizierten neonatalen Mauskardiomyozyten gezeigt werden (Abb. 4.18.).

In infizierten neonatalen Mausekardiomyozyten blieb dabei im Vergleich zum Mausmodell eine kompensatorische Gegenregulation von SR-Proteinen aus. Dies könnte ein Hinweis auf einen fehlenden adaptiven Langzeiteffekt im Zellmodell darstellen.

Ishii et al. (1994) untersuchten neonatale (sowohl frisch isolierte als auch kultivierte) und adulte Kardiomyozyten in Hinblick auf die Struktur des SR während der Entwicklung. In adulten Zellen befindet sich das junctionale SR, mit dem CSQ, in der Nähe der Z-Linie (Campbell et al. 1983). Das SR in neonatalen Zellen ist noch wenig organisiert, es bildet kleine Vesikel unterhalb der Sarkolemma. Wurden die neonatalen Kardiomyozyten über mehrere Tage kultiviert, konnte eine Wanderung dieser Vesikel zur Peripherie des Zytoplasma beobachtet werden. So verändert sich die Verteilung und Struktur des SR während der kardialen Entwicklung. Die CSQ-Expression war in Kardiomyozyten von Tieren verschiedenen Alters annähernd gleich. Es konnte aber eine strukturelle Veränderung beobachtet werden. Zu Beginn der Entwicklung der Herzen zeigt sich das CSQ zunächst wenig organisiert.

Eine Untersuchung der Struktur des SR bzw. der Ca^{2+} -Homöostase während der elektromechanischen Kopplung, führten Snopko et al. (2006) durch. Diese Gruppe untersuchte sowohl frisch isolierte, als auch kultivierte neonatale Kardiomyozyten. Durch die primäre Zellkultur veränderte sich die Kinetik der Ca^{2+} -Homöostase in den kardialen Myozyten von Neugeborenen. In kultivierten Kardiomyozyten befindet sich der RyR2 vermehrt in der Peripherie des Zytoplasma. Ebenso gibt es u.a. Unterschiede in der Zellform, der RyR2-Dichte, den Ca^{2+} -Transienten und den Ca^{2+} -Sparks. Die Gruppe kam daher zum Ergebnis, dass durch eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase, in kultivierten Kardiomyozyten, keine präzise Reproduktion der Entwicklung in situ wiedergeben kann. Trotz alledem ist die Zellkultur ein wichtiges experimentelles Modell, welches sehr nützlich für die Untersuchung der elektromechanischen Kopplung in Neugeborenen ist.

5.4. Veränderte Ca^{2+} -Bindungs- und Polymerisations-Eigenschaften von CSQ^{K206N}

Die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften zeigte eine Hyperglykosylierung von CSQ^{K206N} durch den erwarteten Einbau einer zweiten N-Glykosylierungsstelle.

Eine Glykosylierung ist die Verknüpfung von Zuckerketten mit Proteinen. Es gibt unterschiedliche Bindungen von Zuckerketten an Proteine. Bei der N-Glykosylierung

werden Zuckerketten (N-Glykane) über N-Acetylglukosamin (GlcNAc) mit der Amidgruppe von Asparagin, in spezifischer Abfolge mit anderen Aminosäuren, synthetisiert. Die für eine N-Glykosylierungsstelle notwendige Konsensussequenz lautet Asn-X-Ser/Thr, wobei X eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin oder Asparaginsäure sein kann (Marshall 1972). Die initialen Schritte des Aufbaus der N-Glykane erfolgen im endoplasmatischen Retikulum. Danach erst wird das Glykan auf das Protein übertragen. Die Vollendung der N-Glykane wird im Golgi-Apparat vollzogen. CSQ^{K206N} ist demnach ein Glykoprotein mit zwei Glykosylierungsstellen an den Positionen 335 und zusätzlich 206, an die im ER-Lumen co-translational Kohlenhydratketten angehängt werden.

Eine Hyperglykosylierung ist mit einer Veränderung der Mannoseanzahl verbunden. Ein Mannoseabbau von Man₉ auf Man₈ wird durch die ER-Mannosidase I katalysiert (Helenius et al. 2001). Das ist einer der frühen Kontrollschritte während des Protein-Transportes durch das ER-Kompartiment. Darüberhinaus findet im Kardiomyozyten die weitere Prozessierung des Proteins durch post-ER-Mannosidasen (z.B. Mannosidase II) im Golgi-Apparat statt. Dabei werden Glykoproteine im ER zurückgehalten, bis sie korrekt gefaltet sind und erst dann erfolgt die Sekretion. Eine unvollständige Modifikation im Golgi-Kompartiment könnte zu einer erhöhten ER-assoziierten Degradation von CSQ^{K206N} führen. Während des Faltungsprozesses sind monoglykosylierte Glykoproteine an Lektine, wie z.B. das ER-Membranprotein Calnexin gebunden. Lektine sind regulatorische Proteine, die die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen. Die meisten Proteine interagieren vorübergehend mit dem zytosolischen Hitzeschockprotein HSP70 (Beckmann et al. 1990). HSP70 bindet an exponierte hydrophobe Domänen des translatierten Polypeptids. Dadurch wird die störende Assoziation dieser hydrophoben Domänen verhindert und die korrekte Faltung der Proteine ermöglicht (Hartl und Martin 1995, Fink 1999). Die Aktivierung von Hitzeschockproteinen vermittelt eine korrekte Proteinfaltung unter zellulären Stressbedingungen. Ein kardioprotektiver Mechanismus wird dabei induziert (Latchmann 2001). Marber et al. (1994) konnten eine direkte Beziehung zwischen der induzierten HSP70-Expression und dem Grad der Myokardprotektion zeigen.

Die Chaperone werden bei Mutationen von Proteinen in großer Menge produziert (Ellis und Hemmingsen 1989, Ailor und Betenbaugh 1998, Yokoyama et al. 2000). Überprüft wurde diese Vermutung in der vorliegenden Arbeit durch Kollokalisierung von CSQ mit Calnexin und den Hitzeschockproteinen HSP70 und GRP94. Jedoch fanden

wir eine unveränderte Kolo­kalisierung von CSQ^{K206N} mit dem Lektin Calnexin und den Chaperonen HSP70 und GRP94 in den Kardiomyozyten, was darauf hinweist, dass CSQ^{K206N} nicht im ER zurückgehalten wird. Es kommt zu keinem ER-assoziierten Abbau von CSQ^{K206N} durch einen Proteasom-abhängigen Signalweg und damit zu keiner Veränderung im Transport durch das ER/Golgi-Kompartiment. Die höhere Kolo­kalisierung von CSQ^{K206N} mit Mannosidase II deutet auf eine andere ER/Golgi-Modifikation oder auf ein anderes Mannose-Trimming des translatierten Proteins hin. Interessanterweise wurde ein höherer Gehalt von CSQ mit Man_{8,9}-Resten in einem Hundemodell mit Herzinsuffizienz detektiert (Kiarash et al. 2004). Die Daten weisen auf ein verändertes CSQ-Protein oder auf einen gestörten SR-Membrantransport hin. Wir beobachteten eine Anordnung von CSQ entlang der Sarkomerstruktur in Kardiomyozyten, welche auf einen korrekten Transport des hyperglykosylierten Proteins hinwies. Wie wirkt sich aber die Hyperglykosylierung von CSQ^{K206N} auf die Ca²⁺-Bindungseigenschaften des Proteins aus? Die in unseren Untersuchungen durchgeführten Ca²⁺-Bindungsuntersuchungen konnten erstmals eine veränderte Ca²⁺-Bindungsfähigkeit des mutierten CSQ^{K206N}-Proteins zeigen. Die CASQ2-Mutation K206N resultiert im Vergleich zu CSQ^{NT} in einer beträchtlichen Reduktion der Ca²⁺-Bindungskapazität. Dieser Effekt konnte nicht für das Endo H-behandelte Protein, das vollständig deglykosyliert wurde, beobachtet werden. Somit könnte die N-Glykanstruktur des mutierten Proteins die Ca²⁺-Bindungsstellen maskieren. Bei der Mutation K206N führt der einfache Austausch der Base Lysin gegen ein ungeladenes Asparagin zu einer beeinträchtigten Polymerisation. Dies konnten wir durch die Monomer-Detektion im nativen Gel zeigen. Das Ergebnis war unabhängig vom Glykosylierungsstatus von CSQ^{K206N}. Diese CASQ2-Mutation ist in Domäne 2 an einer hoch konservierten Stelle, die große Bereiche innerhalb der Kopplungsstellen formt, lokalisiert. K206N könnte somit die gesamte Ladung, die für die Polymerisation von CSQ notwendig ist, innerhalb dieser Bereiche verändern. Eine Veränderung im Ladungsgleichgewicht könnte einen Einfluss auf die Struktur des Moleküls haben.

5.5. Effekte der CASQ2-Mutation K206N auf die SR-Ca²⁺-Freisetzung

Es war von Interesse zu untersuchen, ob CSQ^{K206N} die Bindungseigenschaften an TRD beeinflusst. Eine geringere Bindung an TRD wurde bei der CASQ2-Mutation D307H beobachtet (Houle et al. 2004 und eigene Beobachtungen). Dies wurde mit einer Veränderung der Tertiärstruktur von D307H erklärt. Im Gegensatz dazu wurde

in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ zu TRD nachgewiesen. Ohne $[\text{Ca}^{2+}]$ war die Bindung stärker als unter 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$. Trotz einer unveränderten Interaktion von $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ zu TRD hat das mutierte CSQ-Protein einen Effekt auf die Aktivität des RyR-Komplexes. Somit haben wir eine erhöhte Bindung von $[\text{H}^3]$ Ryanodin, in Homogenaten von mit $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ -infizierten Kardiomyozyten gemessen. Dies weist auf eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR hin, da $[\text{H}^3]$ Ryanodin nur an geöffnete Ca^{2+} -Freisetzungskanäle bindet. Die veränderten molekularen Eigenschaften von $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ führen zu einer beeinträchtigten intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase. Hierauf ist die erhöhte Rate von spontanen diastolischen Ca^{2+} -Transienten in mit 0,5 Hz stimulierten Kardiomyozyten zurückzuführen. Diese spontanen Entladungen können zu DADs und getriggerten Aktionspotentialen führen.

Eine Erklärung für die erhöhte spontane Ca^{2+} -Freisetzung in $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ überexprimierenden neonatalen Mauskardiomyozyten während der Diastole ist die veränderte Bindungsfähigkeit von $\text{CSQ}^{\text{K206N}}$ gegenüber Ca^{2+} -Ionen. Ca^{2+} -Ionen konkurrieren mit JCN und TRD um die Bindung am CSQ (Zhang et al. 1997, Kobayashi et al. 2000). Durch eine Überexpression von JCN oder TRD könnten Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Asparaginsäure-reichen Region (Aminosäuren 354-367) des CSQ (Shin et al. 2000) vermehrt durch TRD bzw. JCN besetzt werden und somit weniger Ca^{2+} -Ionen durch CSQ gebunden werden. Dies würde zu einer erhöhten Beladung des SR mit freien Ca^{2+} -Ionen führen, was wiederum spontane Ca^{2+} -Freisetzungen während der Diastole bewirken könnte. Im Zellmodell konnte allerdings keine Überexpression von JCN und TRD beobachtet werden. Des Weiteren sind neben CSQ auch JCN und TRD an der Modulation der Kanalaktivität des RyR involviert. Einen inhibitorischen Einfluss auf die Kanalaktivität hat hierbei TRD (Kuniyasu et al. 1999, Kirchhefer et al. 2002). Die SR-Freisetzung von Ca^{2+} war nach der Behandlung mit einem Antikörper gegen TRD vermindert (Groh et al. 1999). Transgene Mausmodelle, die entweder eine Überexpression von JCN oder TRD aufwiesen, zeigten sowohl eine Beeinträchtigung der Relaxation als auch eine kardiale Hypertrophie (Kirchhefer et al. 2001, Kirchhefer et al., 2003). In den JCN-überexprimierenden Mäusen war eine Herabregulation der RyR-Expression und eine verminderte Expression von TRD zu beobachten (Kirchhefer et al. 2003). Möglicherweise wird ein gegenregulatorischer Mechanismus geschaffen, um die Ca^{2+} -Freisetzung konstant zu halten. Aus diesen Daten lässt sich erkennen, dass

durch eine veränderte JCN- und TRD-Expression die Expression und Aktivität des RyR und damit die SR-Ca²⁺-Freisetzung maßgeblich beeinflusst wird. Veränderungen der kontraktilen Funktion oder die Ausbildung einer Herzhypertrophie können durch Expressionsveränderungen dieser Proteine hervorgerufen werden.

In den untersuchten CSQ^{K206N}-transgenen und WT-Kontrolltieren gab es jedoch keine Veränderungen in der Expression von JCN und TRD, die die Beeinflussung der Kanalaktivität bei CSQ^{K206N} oder die abgeschwächte kontraktile Antwort auf Isoprenalin erklären könnten. Somit kommt es zu keiner kompensatorischen Gegenregulation infolge der abnehmenden Ca²⁺-Speicherfähigkeit durch das mutierte CSQ-Protein. Zhang et al. (2001) begründen diese fehlende kompensatorische Antwort auf die Überexpression eines exogenen Gens in einem Zellkulturmodell, wie dem adenoviralen Gentransfer in vitro, mit der geringen Kontaktzeit des Adenovirus mit der Zielzelle (meist drei Tage Infektion) während des adenoviralen Gentransfers. Beim transgenen Tiermodell, wo das Transgen stabil in das Genom integriert vorliegt, erhöht sich die Möglichkeit einer induzierten Gegenregulation.

5.6. Beziehung zwischen Genotyp und dem klinischen Phänotyp

Die Mutter der hier vorgestellten Familie mit der CASQ2-Mutation K206N trägt die Mutation und ist leicht betroffen, auftretende Synkopen verschwanden nach dem 14. Lebensjahr. Einer ihrer Söhne ist als Mutationsträger asymptomatisch und momentan 29 Jahre alt. Der zweite Sohn zeigte die typische Charakteristik der CPVT und verstarb an einem plötzlichen Herztod im Alter von 13 Jahren. Eine reduzierte Penetranz der Mutation könnte erklären, warum die Mutter und der andere Sohn als Mutationsträger relativ symptomfrei sind. Alternativ könnten diese Beobachtungen auch durch das Auftreten mehrerer heterozygoter Mutationen erklärbar sein, wie es von stark symptomatischen CPVT-Patienten mit zwei verschiedenen CASQ2-Mutationen (G112+5X und L167H) bekannt ist (di Barletta et al. 2006). Allerdings wurden bei den überlebenden Familienmitgliedern keine weiteren CASQ2-Mutationen gefunden. Zudem zeigte keiner der heterozygoten Mutationsträger Anzeichen von ventrikulären Arrhythmien oder Synkopen (Lahat et al. 2001, Postma et al. 2002). Daher ist anzunehmen, dass in der hier untersuchten Familie die Vererbung autosomal dominant mit reduzierter Penetranz stattfindet, vergleichbar mit

den Trägern der CASQ2-Mutation R33X (Postma et al. 2002). Das hat Folgen für zukünftige Strategien in der gentherapeutischen Behandlung von Patienten, da die CASQ2-verbundene CPVT generell als eine Erkrankung mit autosomal rezessivem Erbgang angesehen wird. So kann die Gentherapie bei der Behandlung genetischer Erkrankungen genutzt werden, wie z.B. das Ersetzen eines defizienten Gens oder die Korrektur eines genetischen Defekts (Mohr und Geissler 2002). Der Einsatz von CSQ-Adenoviren mittels Gentherapie wäre denkbar. Auftretende Mutationen oder die Bildung funktionsunfähiger Proteine könnten verhindert werden, durch den Transfer und die Expression „therapeutischer Gene“ in spezifische Zielzellen.

5.7. Vergleich mit anderen bekannten Mutationen

Weitere CASQ2-Mutationen sind beim Menschen beschrieben worden. Diese stehen im Zusammenhang mit dem Auftreten der CPVT und dem plötzlichen Herztod. Daten zu den funktionellen Auswirkungen und biochemischen Funktionen dieser Mutationen deuten auf eine mögliche Störung der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit des CSQ hin.

So wurde eine geringere Ca^{2+} -Bindung, vergleichbar mit D307H und K206N, auch bei der CASQ2-Mutation G112+5X beobachtet (di Barletta et al. 2006, Houle et al. 2004). Allerdings scheinen die zugrundeliegenden Mechanismen unterschiedlich zu sein. Die Punktmutation D307H ist in der Nähe der „Kopf-zu-Kopf“-Verbindung lokalisiert (Park et al. 2004), wohingegen bei der Mutation G112+5X die C-terminale saure Region und der basische Aminosäurerest fehlen, welche an der „Kopf-zu-Kopf“- und „Rücken-zu-Rücken“-Interaktion beteiligt sind. Daher ist in beiden CASQ2-Mutationen die Dimerisierung, als ein Teil der Ca^{2+} -abhängigen Polymerisation, beeinträchtigt. Weil N- und C-terminale Mutationen keine Ca^{2+} -abhängige Aggregation von CSQ zeigen (Gatti et al. 2001, Park et al. 2003), ist es umso überraschender, dass bei der Mutation K206N der einfache Austausch der Base Lysin gegen ein ungeladenes Asparagin zu einer beeinträchtigten Polymerisation führt. Eine gestörte Dimerisierung wurde auch für die CASQ2-Mutationen R33Q und L167H nachgewiesen (Valle et al. 2008). R33Q und L167H zeigten ebenfalls eine Interaktion zum TRD (Terentyev et al. 2008, Qin et al. 2008), hierbei kam es, wie bei K206N, zu keiner Veränderung der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion zu TRD. Im Gegensatz dazu zeigte D307H eine geringere Bindung zum

TRD und die CASQ2-Mutation G112+5X keine detektierbare Bindung zum TRD. Dies war durch den Verlust des C-terminalen Restes, welcher die Verbindung zum TRD ermöglicht, bedingt (Kobayashi et al. 2000).

Eine Untersuchung der CASQ2-Mutation R33Q zeigte, dass R33Q nicht fähig ist, die RyR-Aktivität bei geringer SR-luminaler Ca^{2+} -Konzentration zu inhibieren. Hierbei blieb die Öffnungswahrscheinlichkeit vom RyR im Vergleich zum nativen CSQ erhöht. Die Interaktion von CSQ mit dem RyR ist gestört, dadurch geht die Regulation des RyR durch das SR-luminale Ca^{2+} verloren (Terentyev et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden für R33Q in einzelnen Messungen mit aufgereinigtem RyR erzielt (Qin et al. 2008).

Eine höhere Rate an spontanen, diastolischen Ca^{2+} -Transienten wurde, vergleichbar mit D307H, auch in isolierten Myozyten, die die CASQ2-Mutationen R33Q und G112+5X exprimierten, beobachtet (di Barletta et al. 2006, Terentyev et al. 2006 und Viatchenko-Karpinski et al. 2004). Diese Ergebnisse wurden von Untersuchungen unterstützt, bei denen die Expression von homozygotem R33Q in einem Knock-in-Mausmodell zur Entwicklung von bidirektionalen ventrikulären Tachykardien führte (Rizzi et al. 2008).

Von Interesse ist die biochemische Untersuchung der CASQ2-Mutation K180E. In betroffenen Patienten führt K180E zum Auftreten von CPVT. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konstrukt, welches die Mutation enthält, hergestellt. K180E konnte bereits in Sf9-Insektenzellen mittels Baculoviren und in neonatalen Mauscardiomyozyten mit Hilfe des adenoviralen Systems exprimiert werden. Eine Untersuchung der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit könnte Aufschluss über mögliche Veränderungen der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit des Proteins geben. Vermutlich kommt es durch die Umwandlung von Lysin in Glutamat an der Aminosäure 180 zu einer veränderten Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit. Messungen von Ca^{2+} -Transienten in infizierten neonatalen Mauscardiomyozyten sollten Aufschluss über eine veränderte Funktion des mutierten Proteins $\text{CSQ}^{\text{K180E}}$ geben.

Eine veränderte oder eingeschränkte Funktion des CSQ aufgrund von Mutationen führt zu Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von ventrikulären Tachykardien (Bers 2001). Oft liegen diese Störungen einer getriggerten Aktivität zugrunde, die die Auswirkung einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung und der Entstehung von späten

Nachdepolarisationen ist. So können verschiedene Mechanismen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung führen. In betroffenen Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen im *CASQ2*-Gen, gestörter Ca^{2+} -Homöostase und ventrikulärer Tachykardie hergestellt werden.

Die aufgeführten *CASQ2*-Mutationen weisen verschiedene molekulare Veränderungen auf, dennoch bewirken sie eine gleiche pathologische Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase und verursachen möglicherweise ein gemeinsames klinisches Bild, die CPVT.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Mutationen CSQ^{D307H} und CSQ^{K206N} bei Patienten mit CPVT untersucht. Um Aufschlüsse über die Rolle dieser CSQ-Mutationen in der Regulation der myokardialen Ca²⁺-Homöostase unter physiologischen Bedingungen sowie unter β -adrenerger Belastung zu gewinnen, wurden zum einen transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von CSQ^{D307H} generiert, demgegenüber stand die Untersuchung von CSQ^{K206N} mittels adenoviralem Expressionssystem.

Nachdem die Integration der Hunde-CSQ-DNA in die genomische DNA der Mäuse, sowie die Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, zeigten Untersuchungen von CSQ^{D307H}, dass die Ca²⁺-Bindung sowie die Bindung zu TRD in den transgenen Herzen im Gegensatz zum WT erniedrigt war. In den transgenen Mäusen kam es zu einer Herzhypertrophie und echokardiographische Untersuchungen unter Isoprenalin zeigten eine verminderte Kontraktilität in den CSQ^{D307H}-Herzen. Hämodynamische Untersuchungen mittels Linksherzkatheter ergaben basal keine Unterschiede zwischen CSQ^{D307H}- und WT-Mäusen, aber die Wirkung einer β -adrenergen Stimulation war in den CSQ^{D307H}-Tieren abgeschwächt. Unsere Daten zeigen, dass die neu identifizierte CASQ2-Mutation K206N in einer Familie mit CPVT-Symptomen analog dem transgenen Mausmodell zu einer Beeinträchtigung der Ca²⁺-Bindungsfunktion führt, ohne die Interaktion zum TRD zu beeinflussen. Die Mutation K206N führt zu einem höheren Öffnungsstatus des RyR, dies bedingt eine verstärkte Rate an spontaner SR-Ca²⁺-Freisetzung in CSQ^{K206N}-exprimierenden Kardiomyozyten. Die Ursachen für CPVT könnten in der veränderten Bindungsfähigkeit von CSQ für Ca²⁺, einer Beeinflussung der Bindung von CSQ an den RyR oder einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit des RyR liegen. Die Arrhythmien von Patienten, die diese Mutationen zeigen, könnten dadurch erklärt werden. CSQ^{D307H} und CSQ^{K206N} scheinen folglich die Ca²⁺-Homöostase und damit die Kontraktion des Herzmuskels zu beeinflussen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass den CSQ-Mutationen eine wichtige pathogene Rolle im Herzen zukommt. Die Aufklärung des Pathomechanismus der mutierten CSQ-Proteine sollte helfen neue Strategien zur Therapie der CPVT zu entwickeln. Somit könnte das adenovirale Zellsystem die Basis für zukünftige gentherapeutische Ansätze darstellen.

7. Anhang

7.1. Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Alle radioaktiven Substanzen wurden von Hartmann Analytics, Braunschweig, Immundiagnostik (Bensheim) oder von NEN-DuPont, Bad Homburg bezogen. Das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen.

Genotypisierung

TE/SDS-Puffer	Tris EDTA SDS pH 8,0	50 mM 100 mM 0,5% (V/V)
Proteinase-K-Lösung	Proteinase K	1,0% (m/V)
Na-Acetat-Lösung	Natriumacetat PH 6.0	3 M
TAE-Puffer	Tris Essigsäure Na-EDTA pH 8,0	40 mM 0,11% (V/V) 1 mM
10 x Taq Puffer	Tris KCl MgCl ₂ Eppendorf, Hamburg, Deutschland (D)	100 mM 500 mM 15 mM
5 x TaqMaster® PCR Enhancer	Eppendorf, Hamburg, D	
10 x Probenpuffer (DNA-Elektrophorese)	Bromphenolblau Glycerol 1 x TAE	q.s. 50% (V/V) 50% (V/V)
Ethidiumbromid 1%ig in H ₂ O	Merck, Darmstadt, D	
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, D	
dNTPs	MBI Fermentas, Heidelberg, D	

Probenentnahme und Aufbereitung

M1 -Puffer	EDTA β -Mercaptoethanol	4 mM 0,1% (V/V)
SDS/NaHCO ₃ -Puffer	SDS NaHCO ₃	10% (m/V) 20 mM
Histidin/Sucrose-Puffer	Sacharose Histidin pH 7,4	0,25 M 0,03 M
P1-Puffer	NaHCO ₃ NaF Na ₄ P ₂ O ₇ pH 7,4	10 mM 50 mM 5 mM
Normal-Tyrode	20 ml Stamm 19 ml Stamm II 5 ml Stamm III 0,5 g Glucose 25 mg Ascorbinsäure 9,3 mg Titriplex III ad 1000 ml bidest Wasser, pH 7,4	
Stamm I	NaCl KCl CaCl ₂ -Stamm MgCl ₂ -Stamm pH 7,4	2,99 M 0,134 M 2,25 M 1,05 M
Stamm II	NaHCO ₃	0,595 M

Stamm III	NaH ₂ PO ₄	0,042 M
-----------	----------------------------------	---------

Albumin aus Rinderserum Biorad Protein Assay Reagenz	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, D Biorad [®] Laboratories, München, D
---	---

Untersuchung der Proteinexpression

Probenpuffer (mit SDS)	Tris-HCl	62,5 mM
	SDS	10%
	Glycerol	20%
	Bromphenolblau	q.s.
	pH 6,8	

vor Gebrauch frisch zusetzen:

Dithiothreitol	40 mM
----------------	-------

Probenpuffer (ohne SDS)	Tris-HCl	625 mM
	Glycerol	20%
	Bromphenolblau	q.s.
	pH 6,8	

vor Gebrauch frisch zusetzen:

Dithiothreitol	40 mM
----------------	-------

Sammelgel (4%)	Acrylamid	4% (m/V)
	Bis-Acrylamid	0,2% (m/V)
	Tris	125 mM
	SDS	0,1% (m/V)
	TEMED	0,064% (V/V)
	Ammoniumpersulfat bidest. Wasser	0,1% (m/V)

Trenngel (10%)	Acrylamid	10% (m/V)
	Bis-Acrylamid	0,5% (m/V)

	Tris	100 mM
	Glycin	300 mM
	SDS	01% (m/V)
	Glycerol	13,3% (V/V)
	Polyacrylamid	0,2% (m/V)
	TEMED	0,086% (V/V)
	Ammoniumpersulfat bidest. Wasser	0,04% (m/V)
Elektrodenpuffer (SDS-Page)	Tris	50 mM
	Glycin	125 mM
	SDS	1% (m/V)
	pH 8,8	
Proteingrößenstandard (Amersham Biosciences, Freiburg, D)	Phosphorylase b	97,0 kDa
	Albumin	66,0 kDa
	Ovalbumin	45,0 kDa
	Carboanhydrase	30,0 kDa
	Trypsininhibitor	20,1 kDa
	α -Lactalbumin	14,4 kDa
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25% (V/V)
	Eisessig	10% (V/V)
	Coomassie-Blau	0,15% (m/V)
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	10% (V/V)
	Methanol	30% (V/V)

Transferpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	42 mM
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	8 mM
	pH 7,4	
Ponceau S-Lösung	Ponceau-S	0,1% (m/V)
	Eisessig	1% (V/V)
Puffer A	Tris	13 mM
	NaCl	154 mM
	pH 7,4	
Puffer C	Tris	13 mM
	NaCl	154 mM
	Tween 20	0,1% (V/V)
	pH 7,4	
TBS	Tris	10 mM
	NaCl	154 mM
	pH 9,4	
AP-Puffer	NaCl	100 mM
	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5 mM
	Triethanolamin	100 mM
	pH 9,4	
BCIP-Stammlösung	BCIP	5% (m/V)
	in Dimethylformamid	

NBT-Stammlösung	NBT	5% (m/V)
	Dimethylformamid	70% (V/V)
	in A. bidest	
Albumin aus Rinderserum	Sigma-Aldrich®	Steinheim, D
BCIP	biomol	Hamburg, D
Cellophan®-Papier	Biorad®	Laboratories, München, D
Coomassie-Blau	Merck	Schwalbach, D
ECL ^{Plus} -Substrat	Amersham®	Biosciences, Freiburg, D
NBT	Sigma-Aldrich®	Steinheim, D
Ponceau-S	ICN Biomedicals	Eschwege, D
Protran Nitrocellulose Membran BA 85	Schleicher und Schuell®	Dassel, D

Arbeitstechniken mit DNA

TE-Puffer	Tris	50 mM
	EDTA	100 mM
	pH 8,0	
10 x SSC	NaCl	1,5 M
	tri-Natriumcitrat	150 mM
	pH 7,0	
2 x SSC	NaCl	300 mM
	tri-Natriumcitrat	30 mM
	pH 7,0	
100 x Denhardt`s	Ficoll (400)	2 %
	Polyvinylpyrrolidon (PVP)	2 %
	BSA	2 %

Depurinierungslösung	HCl	0,25 M
Heringssperma DNA denaturiert		10mg/ml

Prähybridisierungslösung:	Formamid, deionisiert	50% (V/V)
	20x SSC	6x
	100x Denhardt-Lösung	5x
	20% SDS	0,5%
	10 mg/ml Heringssperma DNA	100µg/ml
	Blocking Reagenz (Roche, Mannheim, D)	0,1% (m/V)

Hybridisierungslösung:	Formamid, deionisiert	50% (V/V)
	20x SSC	6x
	100x Denhardt-Lösung	5x
	20% SDS	0,5%
	10 mg/ml Heringssperma DNA	100µg/ml
	Blocking Reagenz (Roche, Mannheim, D)	0,1% (m/V)
	Sonde (10 min denaturiert)	

Waschpuffer 1(2 x SSC + 0,1% SDS)

(2 x SSC + 0,1% SDS)	NaCl
	300 mM
	Natriumcitrat
	30 mM
	SDS
	0,1 %
	pH 7,0

Waschpuffer 1(0,1 x SSC + 0,1% SDS)

(0,1 x SSC + 0,1% SDS)	NaCl	15 mM
	Natriumcitrat	1,5 mM
	SDS	0,1 %
	pH 7,0	

Immunhistologische Untersuchungen

PBS	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	pH 7,0	

Hämodynamische Messungen

Krebs-Henseleit-Puffer	NaCl	118 mM
	NaHCO ₃	25 mM
	EDTA	0,5 mM
	KCl	4,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
	MgSO ₄	1,2 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
	Glukose	11 mM
		pH 7,4 mit Carbogen begast

Urethan Injektionslösung	Urethan	0,4 g/ml
	NaCl	0,9 % (m/v)
	pH 6,5	

Urethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Avertin [®]	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Kontraktionskraftmessungen

Tyrodelösung	NaCl	119,8 mM
	KCl	5,4 mM
	CaCl ₂	1,8 mM
	MgCl ₂	1,05 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	NaHCO ₃	22,6 mM

Na ₂ EDTA	0,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Glukose	5,0 mM
pH 7,4	

Kontinuierlich begast mit 95% O₂ und and 5% CO₂ bei 35°C

Isolation der Mauskardiomyozyten

Ca ²⁺ -freie-Tyrode-Lsg. 5x	NaCl	140 mM
	KCl	5,8 mM
	KH ₂ PO ₄	0,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	0,4 mM
	MgSO ₄	0,9 mM
	vor der Verwendung frisch zugeben:	
	HEPES	10 mM
	Glukose	11,1 mM
	pH 7,3	

„Kraftbrühe“	Glutaminsäure	50 mM
	Taurin	20 mM
	Glukose	10 mM
	MgSO ₄	3 mM
	EGTA	0,5 mM
	KCl	30 mM
	KH ₂ PO ₄	30 mM
	HEPES	20 mM
	pH 7,3 mit KOH	

Messung der intrazellulären Ca²⁺-transienten Ratio

Messpuffer	NaCl	120 mM
	KCl	5,4 mM
	CaCl ₂	1,8 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	MgCl ₂	1,05 mM
	Glukose	5 mM
	HEPES	5 mM
	EDTA	5 x 10 ⁻⁵ mM
	Ascorbinsäure	0,028 mM

Indo-1/AM Molecular Probes
Pluronic™ F-127 (20% in DMSO)

Molecular Probes, Eugene, USA
Molecular Probes, Eugene, USA

Antikörper

Tab. 7.1.: Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen (pk=polyklonal, mk=monoklonal; AP=alkalische Phosphatase, -HRPO=konjugiert an Meerrettich-Peroxidase).

1. Antikörper	Verdünnung	Firma/Referenz	2. Antikörper	Verdünnung	Firma/Referenz
Anti- CSQ (mk)	1:1000	Upstate/Biomol	Alkalische Phosphatase/Protein A [¹²⁵ I]-Protein A	1:1000	MacDouglas et al. 1991
Anti- E2a (pk)	1:10	Upstate/Biomol	Anti-Maus IgG-AP	1:1000	Qiagen
Anti- PLB A1 (mk)	1:1000	Upstate/Biomol	Anti-Maus IgG-AP	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti- PLB Threonin17 (pk)	1:500	Badrilla	Anti-Kaninchen IgG-HRPO	1:1000	Amersham
Anti- PLB Serin16	1:500	Badrilla	Anti-Kaninchen IgG-HRPO	1:1000	Amersham
Anti- TRD	1:1000	Kobayashi et al. 1999	[¹²⁵ I]-Protein A	1:1000	von NEN-DuPont
Anti- JCN	1:1000	Jones et al. 1995	[¹²⁵ I]-Protein A	1:1000	von NEN-DuPont
Anti- SERCA	1:1000	Jones et al. 1995	[¹²⁵ I]-Protein A	1:1000	von NEN-DuPont
Anti- RyR (mk)	1:2000	Zhang et al. 1997	Anti-Maus IgG-AP	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti- RyR-P (pk)	1:5000	Badrilla	Anti-Kaninchen IgG-AP	1:1000	Sigma-Aldrich

Die 2. Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und von Sigma-Aldrich (Steinheim, D), bzw. [¹²⁵I]-Protein A von NEN-DuPont (Bad Homburg, D) oder Amersham (Buckinghamshire, UK) bezogen.

7.2. Geräte und Bezugsquellen

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Autoclav Tuttnauer Systec Typ 3850 EL	Systec GmbH, Wettenberg, D
Betazähler TRI-CARB 1600 TR	Canberra Packard GmbH, Dreieich, D
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Blotkammer Hoefer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Doppler-Echokardiographie System Sonos 5500	Philips Medical Systems, Bothell, Washington, USA
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Elektroporator	Biorad Laboratories GmbH, München, D
Filtrationsanlage Harvester M24	Brandel, Biomedical Research and Development Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA
Gammazähler Cobra II Auto Gamma	Canberra Packard GmbH, Dreieich, D
Geldokumentation Fluo-Link	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D
Gene Pulser	Biorad Laboratories GmbH, München, D
Grass stimulator SD9	Grass, Quincy, Massachusetts, USA
Hybridisierungsofen Hybaid Mini 10	Hybaid, Heidelberg, D
Kontrollmonitor PVM 97	SONY, Tokio, Japan
Mikro-Dismembrator U	B. Braun Biotech International AG, Melsungen, D
Mikromanipulator Narishige MN-3333	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, D

Mikroskop (invers)	Diaphot 200 Nikon, Tokio, Japan
PCR-Gerät Gene Amp ® PCR System 9700	PerkinElmer Analytical Instruments, Shelton, USA
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
PhosphorImager Kassetten	Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA
Photomultiplier D 104	Photon Technologie International (PTI), Brunswick, New Jersey, USA
Polytron PT-10/35	Kinematica AG, Littau, Schweiz
PowerLab Bridge amplifier, Modell ML 110	ADInstruments, Spechbach, D
PowerLab 2/20, Modell ML 820	ADInstruments, Spechbach, D
Pumpe P1	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttler Modell Unimax 2010, RO-5	Heidolph GmbH, Schwabach, D
Software Felix™ (Ver. 1.1)	Photon Technologie International (PTI), Brunswick, New Jersey, USA
Stimulator CS	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA
Szintillationszähler	Canberra Packard, Dreieich, D
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischzentrifuge Modell 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11	Eppendorf AG, Hamburg, D
Transfereinheit Hoefer	Hoefer Scientific Instruments San Francisco, USA
Ultraschallstab VirSonic® 60	Virtis, New York, USA
UV-Lichtanlage Docu Gel-V 8A400	MWG Biotech, Ebersberg, D
Vakuum Blotter Model 785	Biorad Laboratories GmbH, München, D

Vakuum-Geltrockner Model 583	Biorad Laboratories GmbH, München, D
Vakuumzentrifuge SpeedVac Plus AR Modell SC 110AR	Savant Instruments Inc., Farmingdale New York, USA
Zentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Universal 16	Hettich/Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf, D
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf, D

7.3. Primer und PCR-Programme

In den folgenden Tabellen sind die Primer und PCR-Programme zur Amplifikation der verschiedenen Untereinheiten sowie die verwendeten Sequenzierungsprimer angegeben. Alle Primer sind in 5' – 3'- Orientierung geschrieben.

Tab. 7.3.1: PCR-Nachweis von pAdEasy			
Ad Easy for	TTG ATA GGG TCT CTT ACC AGC		
Ad Easy rev	AAC AGT GCG GGA ATG TTA CC		
Produktgröße	ca. 1250 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	94°C	9 Zyklen
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	20 sec	94°C	19 Zyklen: Verlängerung der Elongation um 5 sec je Zyklus
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.3.2: PCR-Nachweis von CSQ in rekomb. pAdEasy			
CSQ-PCR for	CTC CCC ACT TCT CTC AAC		
CSQ-SEQ-P2R	CCT TCT TCA TCA AAA CCC		
Produktgröße	ca. 1400 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	94°C	9 Zyklen
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	20 sec	94°C	19 Zyklen: Verlängerung der

Annealing	30 sec	58°C	Elongation um 5 sec je Zyklus
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.3.3: Amplifikation von CSQ in pTRE2-CSQ

pVL1393 for	GGA GAC GGA ZCC CAG ATG AAG AGA
pTRE2-CSQ-PR	TTC CCA TTC TAA ACA ACA CC
Produktgröße	1382 bp

Tab. 7.3.4: Amplifikation von CSQ in pTRE2-CSQ

pAcHLT-A for	AAC CCA TAT GTA AGA GAA CAC ACC
pTRE2-CSQ-PR	TTC CCA TTC TAA ACA ACA CC
Produktgröße	1376 bp

Tab. 7.3.5.: Amplifikation von CSQ in pAlter-CSQ-D307H

pVL1393 for	GGA GAC GGA TCC CAG ATG AAG AGA
M13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Produktgröße	1350 bp

Tab. 7.3.6.: Mutagenese (D307H) von CSQ in pAlter-CSQ-D307H (ssDNA)

Amp repair	GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG
Tetracyclin knock out	GCC GGG CCT CTT GCG GGC GTC CAT TCC
Asp/His rev	AGC ATC GTG TGG ATT CAC CCG GAT GAC TTT CCT

Tab. 7.3.7.: Mutagenese (K206N) von CSQ in pAlter-CSQ (ssDNA)

Amp repair	GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG
Tetracyclin knock out	GCC GGG CCT CTT GCG GGG GTC CAT TCC
K206rev	AAA GGG GTT GCA ACA AAG AAC TTG TCC TTG AAG

Tab. 7.3.8.: Mutagenese (K180E) von CSQ in pAlter-CSQ (ssDNA)

Amp repair	GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG
Tetracyclin knock out	GCC GGG CCT CTT GCG GGG GTC CAT TCC
K180rev	AAA GGG GTT GCA ACA AAG AAC TTG TCC TTG AAG

8. Literaturverzeichnis

Aaron BM, Oikawa K, Reithmeier RA, Sykes BD (1984) Characterization of skeletal muscle calsequestrin by ¹H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 259: 11876-11881

Ailor E, Betenbaugh MJ (1998) Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells. *Biotechnol Bioeng* 58: 196-203

Baker B, Paquette M, Szalai JP, Driver H, Perger T, Helmers K, O'Kelly B, Tobe S (2000) The influence of marital adjustment on 3-year left ventricular mass and ambulatory blood pressure in mild hypertension. *Arch Intern Med* 160: 3453-3458

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994) Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476: 279-293

Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF (2004) Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 85: 33-69

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850-854.

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447

Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Second edition. Kluwer Academic Press, Boston, MA

Bers DM (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37: 417-494

Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499: 291-306

Berridge MJ (2003) Cardiac calcium signalling. *Biochem Soc Trans* 31: 930-933

Beuckelmann DJ, Wier WG (1988) Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol* 405: 233-255

Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Second edition. Kluwer Press, Boston, MA

Bers DM (2002) Calcium and cardiac rhythms: Physiological and pathophysiological. *Circ Res* 90: 14-17

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG (2001) Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and $\text{Na}^{(+)}\text{-Ca}^{(2+)}$ exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* 88: 1254-1258

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO, Mintzer MC (1983) Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein. *J Biol Chem* 258: 1197-1204

Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van Bilsen M, Obrein TX, Evans SM (1993) Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* 55: 77-95

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Coumel P, Fidelle J, Lucet V, Attuel P, Bouvrain Y (1978) Catecholaminergic-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases. *Br Heart J* 40: 28-37

Del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (1999) Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100: 2308-2311

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: 1012-9

Di Virgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silverstein SC (1988) Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions. *J Immunol* 140: 915-920

Dillmann WH, Mehta HB, Barrieux A, Guth BD, Neeley WE, Ross J Jr (1986) Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71. *Circ Res* 59: 110-114

Dirksen WP, Lacombe VA, Chi M, Kalyanasundaram A, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Zhou Z, Vedamoorthy S, Li N, Chiamvimonvat N, Carnes CA, Franzini-Armstrong C, Györke 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

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

Ellis RJ, Hemmingsen SM (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14: 339-342

Evenäs J, Malmendal A, Forsén S (1998) Calcium. *Curr Opin Chem Biol* 2: 293-302.
Review

Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol Lond* 249: 469-495

Feldmann AM, Ray PE, Sitan CM, Mercer JA, Miobe W, Bristow MR (1991) Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in andomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction. *Circulation* 83: 1866-1872

Feldman DE, Frydman J. (2000) Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol* 10: 26-33

Fink AL (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79: 425-449

Frank KF, Mesnard-Rouiller L, Chu G, Young KB, Zhao W, Haghghi K, Sato Y, Kranias EG (2001) Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res Cardiol* 96: 636-644

Gatti G, Trifari S, Mesaeli N, Parker JM, Michalak M, Meldolesi J (2001) Head-to-tail oligomerization of calsequestrin: a novel mechanism for heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum luminal proteins. *J Cell Biol* 154: 525-34

Gershoni JM (1988) Protein blotting: A manual. In: Glick NT (Hrsg.), *Methods of biochemical analysis*, Wiley, New York, 33. Auflage: 1-58

Graham F, Smiley J, Russel W, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-77

Groh S, Marty I, Ottolia M, Prestipino G, Chapel A, Villaz M, Ronjat M (1999) Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 274: 12278-12283

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Bio Chem* 260: 3440-3450

Guo W, Campbell KP (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 9027-9030

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185

Györke S, Györke I, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Williams SC (2004) Modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by calsequestrin in cardiac myocytes. *Biol Res* 37: 603-607

Hartl FU, Martin J (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 5: 92-102

He TC, Zhou S, da Costa LR, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514

He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, Lew WY, Hilal-Dandan R, Dillmann WH (1999) Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation* 100: 974-980

Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-9

Houle TD, Ram ML, Cala SE (2004) Calsequestrin mutant D307H exhibits depressed binding to its protein targets and a depressed response to calcium. *Cardiovasc Res.* 64: 227-33

Ikemoto N, Bhatnagar GM, Nagy B, Gergely J (1972) Interaction of divalent cations with the 55,000-dalton protein component of the sarcoplasmic reticulum. Studies of fluorescence and circular dichroism. *J Biol Chem* 247: 7835-7837

Ioshii SO, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T (1994) Organization of calsequestrin-positive sarcoplasmic reticulum in rat cardiomyocytes in culture. *J Cell Physiol* 158: 87-86

Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73: 197-227

Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, Gant TW, Thorgeirsson SS, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, et al. (1992) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1: 372-378

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26 kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30787-30796

Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca^{2+} signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 101: 1385-1393

Ju YK, Allen DG (1998) Intracellular calcium and Na^+ - Ca^{2+} exchange current in isolated toad pacemaker cells. *J Physiol* 508: 153-166

Kao JPY (1994) Practical aspects of measuring $[Ca^{2+}]$ with fluorescent indicators. *Meth Cell Biol* 40: 155-181

Kiarash A, Kelly CE, Phinney BS, Valdivia HH, Abrams J, Cala SE (2004) Defective glycosylation of calsequestrin in heart failure. *Cardiovasc Res* 63: 264-272

Kim E, Youn B, Kemper L, Campbell C, Milting H, Varsanyi M, Kang C (2007) Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* 373: 1047-1057

Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* 276: 4142-4149

Kirchhefer U, Baba HA, Kobayashi YM, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2002) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1334-H1343

Kirchhefer U, Neumann J, Bers DM, Buchwalow IB, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovasc Res* 59: 369-379

Kirchhof P, Klimas J, Fabritz L, Zwiener M, Jones LR, Schäfers M, Hermann S, Boknik P, Schmitz W, Breithardt G, Kirchhefer U, Neumann J (2007) Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin. *J Mol Cell Cardiol* 42: 962-971

Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR (2000) Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* 275: 17639-17646

Koss KL, Kranias EG (1996) Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79: 1059-1063

Kuniyasu A, Kawano S, Hirayama Y, Ji YH, Xu K, Ohkura M, Furukawa K, Ohizumi Y, Hiraoka M, Nakayama H (1999) A new scorpion toxin (BmK-PL) stimulates Ca²⁺-release channel activity of the skeletal-muscle ryanodine receptor by an indirect mechanism. *Biochem J* 339: 343-350

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

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* 59: 1378-1384

Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420

Latchman DS (2001) Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 51: 637-646

Leblanc N and Hume JR (1990) Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum, *Science* 248, S. 372-376

Levero M, Barban V, Manteca S, Ballay A, Balsamo C, Avantaggiati ML, Natoli G, Skellekens H, Tiollais P, Perricaudet M (1991) Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101: 195-202

Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL (1993) Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *4: 403-409*

Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2874-2878

Lucet V, Lupoglazoff JM, Fontaine B (2002) Andersen syndrome, ventricular arrhythmias and channelopathy (a case report) *Arch. Pediatr* 9: 1256-1259

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983) β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258: 464-471

Lindemann JP, Watanabe AM (1985) Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} -calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 260: 4516-4525

Liu N, Priori SG (2008) Disruption of calcium homeostasis and arrhythmogenesis induced by mutations in the cardiac ryanodine receptor and calsequestrin. *Cardiovasc Res* 77: 293-301

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fass AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

MacLennan DH, Wong PT (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1231-1235

Marber MS (1994) Stress proteins and myocardial protection. *Clin Sci (Lond)*. 86: 375-381

Marshall RD (1972) Glycoproteins. *Annu Rev Biochem*. 41: 673-702. Review.

Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, et al. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13: 1017-1030

Meissner G (1975) Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim Biophys Acta* 389: 51-68

Mehta HB, Popovich BK, Dillmann WH (1988) Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinase M. *Circ Res*. 63: 512-517

Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K (1990) Altered sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 85: 305-309

Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Dillmann WH (1994) Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem J* 3: 561-569

Meyer T, Stryer L (1991) Calcium spiking. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 20: 153-174

Milstein ML, McFarland TP, Marsh JD, Cala SE (2008) Inefficient glycosylation leads to high steady-state levels of actively degrading cardiac triadin-1. *J Biol Chem* 283: 1929-1935

Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias EG, Giles WR, Chien KR (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99: 313-322

Mitchell RD, Simmerman HKB, Jones LR (1988) Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 263: 1376-1381

Mohr L, Geissler M (2002) Gene therapy: new developments. *Praxis* 91: 2227-2235

Molkentin JD, Dorn GW 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63: 391-426

Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua HL, Russo LA, Peterson CJ, McDermott PJ, Watson PA (1987) Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 49: 533-543

Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1989) Regulation of myocardial Ca^{2+} -ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2966-2970

Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 69: 1742-1750

O'Brian JJ, Ram ML, Kiarash A, Cala SE (2002) Mass spectrometry of cardiac calsequestrin characterizes microheterogeneity unique to heart and indicative of complex intracellular transit. *J Biol Chem* 277: 37154-37160

Packer M (2001) Current role of beta-adrenergic blockers in the management of chronic heart failure. *Am J Med* 7A: 81S-94S

Park H, Wu S, Dunker AK, Kang C (2003) Polymerization of calsequestrin. Implication for Ca^{2+} regulation. *J Biol Chem* 278: 16176-16182

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

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 490: 27-34

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: 21-26

Priori SG, Corr PB (1990) Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol* 258: H1796-H1805

Qin J, Valle G, Nani A, Nori A, Rizzi N, Priori SG, Volpe P, Fill M (2008) Luminal Ca^{2+} regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol* 131: 325-34

Rao S, Verkman AS (2000) Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1-C18

Ringer S (1882) Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol* 3: 380-393

Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, Bicciato S, Arcelli D, Spedito A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Protasi F, Volpe P, Priori SG (2008) Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calsequestrin: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* 103: 298-306

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage

Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn GW 2nd, Kadambi VJ, Yatani A, Hoit BD, Walsh RA, Kranias EG (1998) Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 273: 28470-28477

Scott BT, Simmermann HKB, Collins JH, Nadal-Ginard B, Jones LR (1988) Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* 263: 8958-8964

Sham JSK, Cleemann L, Morad M (1995) Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 121-125

Schwinger RH, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca^{2+} -sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31: 479-491

Shin DW, Ma J, Kim DH (2000) The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca^{2+} and interacts with triadin. *FEBS Lett.* 486: 178-182

Simmerman HKB, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947

Slupsky JR, Ohnishi M, Carpenter MR, Reithmeier RA (1987) Characterization of cardiac calsequestrin. *Biochemistry.* 26: 6539-6544

Snopko RM, Aromolaran AS, Karko KL, Ramos-Franco J, Blatter LA, Mejía-Alvarez R (2007) Cell culture modifies Ca^{2+} signaling during excitation-contraction coupling in neonate cardiac myocytes. *Cell Calcium* 41: 13-25

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620

Tada M, Toyofuku T (1996) SR Ca^{2+} -ATPase/phospholamban in cardiomyocyte function. *J Card Fail* 2: S77-85

Terentyev D, Nori A, Santoro M, Viatchenko-Karpinski S, Kubalova Z, Gyorke I, Terentyeva R, Vedamoorthy S, Blom NA, Valle G, Napolitano C, Williams SC, Volpe P, Priori SG, Gyorke S (2006) Abnormal interactions of calsequestrin with the ryanodine receptor calcium release channel complex linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Circ Res* 98: 1151-1158

Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Vedamoorthy S, Oduru S, Györke I, Williams SC, Györke S (2007) Protein protein interactions between triadin and calsequestrin are involved in modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol* 583: 71-80

Terentyev D, Kubalova Z, Valle G, Nori A, Vedamoorthyrao S, Terentyeva R, Viatchenko-Karpinski S, Bers DM, Williams SC, Volpe P, Gyorke S (2008) Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ2 mutations linked to sudden cardiac death. *Biophys J* 95: 2037-2048

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels on nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

Valle G, Galla D, Nori A, Priori SG, Gyorke S, de Filippis V, Volpe P (2008) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia-related mutations R33Q and L167H alter calcium sensitivity of human cardiac calsequestrin. *Biochem J* 413: 291-303

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13: 213-217

Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Györke I, Terentyeva R, Volpe P, Priori SG, Napolitano C, Nori A, Williams SC, Györke S (2004) Abnormal calcium signaling and sudden cardiac death associated with mutation of calsequestrin. *Circ Res* 94: 471-477

Vinogradova TM, Zhou YY, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG (2004) Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ Res* 94: 802-809

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76: 615-619

Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res.* 47: 1-9

Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* 5: 476-483

Williams GA, Ayres SM (1985) Regulation of myocardial function in health and critical illness. *Crit Care Clin* 1: 435-451

Vinogradova TM, Zhou YY, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG (2004) Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+} releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ Res* 94: 802-809

Yano K, Zarain-Herzberg A (1994) Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol Cell Biochem* 135: 61-70

Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, Bridge JHB, Barry WH (1998) Effects of overexpression of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger on $[Ca^{2+}]$ transients in murine ventricular myocytes. *Circ Res* 82: 657-665

Yokoyama N, Hirata M, Ohtsuka K, Nishiyama Y, Fujii K, Fujita M, Kuzushima K, Kiyono T, Tsurumi T (2000) Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1493: 119-124

Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990) Characterisation of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase gene. *J Biol Chem* 265: 4670-4677

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272: 23389-23397

Zhang L, Franzini-Armstrong C, Ramesh V, Jones LR (2001) Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* 33: 233-47

Zhang XQ, Song J, Rothblum LI, Lun M, Wang X, Ding F, Dunn J, Lytton J, McDermott PJ, Cheung JY (2001) Overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger alters contractility and SR Ca²⁺ content in adult rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2079-H2088

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Schmitz und Herrn Prof. Dr. J. Neumann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung und die Bereitstellung der finanziellen Mittel, durch die die Anfertigung dieser Doktorarbeit erst ermöglicht wurde.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. U. Kirchhefer möchte ich für die naturwissenschaftliche Betreuung der Arbeit und dem dieser Arbeit entgegengebrachten Interesse danken.

Ein Dank geht an Nicole Hinsenhofen für die Einarbeitung in die Versuchsmethodik.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie (Münster) danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Insbesondere seien erwähnt Nicole Hinsenhofen, Frank Stümpel, Dr. Stefanie Grote-Wessels, Stefanie Koring, Nina Nordsiek, Danka Kucerova.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern, die ich jetzt nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich mich für die Mithilfe im Labor bedanken.

Bei Frank Stümpel möchte ich mich außerdem für die gute und freundschaftliche Kollegialität bedanken und für alle fachlichen und moralischen Hilfestellungen.

Frau Dr. L. Fabritz und ihrer AG möchte ich für die Durchführung der echokardiografischen Untersuchungen und die gute Zusammenarbeit danken.

Bei Prof. Dr. I. Buchwalow bedanke ich mich für die gute histologische Zusammenarbeit.

Für das engagierte und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich recht herzlich bei Priv. Doz. Dr. med. U. Kirchhefer bedanken.

Ein großes Dankeschön an alle Freunde und Bekannten, besonders erwähnt sei hier Nicole Gründker, die mich in der Zeit der Promotion begleitet und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Oma und Opa, meinen Bruder und Mark, deren immerwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Beendigung des Pharmazie-Studiums und zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

Diana Lütke Schürmann