

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

**Untersuchungen zur ventrikulären Funktion an Mäusen mit
herzspezifischer Deletion von Calsequestrin**

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

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

von

Carola Marie Fahrion
geboren am 20.07.1990 in Rodewisch

Gutachter:

- 1.) Prof. J. Neumann
- 2.) Prof. W.-H. Zimmermann
- 3.) Prof. F. U. Müller

12.07.2016

22.02.2017

Referat

Im Herzen ist die Calcium (Ca^{2+})-Homöostase eine Schlüsselkomponente der Regulation der myokardialen Kontraktilität. Das wichtigste Ca^{2+} -bindende Protein im Herzen ist die kardiale Isoform des Calsequestrins (CSQ2), welches im junctionalen sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisiert ist. Mutationen oder Deletionen des CSQ2 können mit einer veränderten Sensitivität für β -adrenerge Stimulation, katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT) und plötzlichem Herztod vergesellschaftet sein. Zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen wurde ein CSQ2 Knock-out Mausmodell charakterisiert. CSQ2 war gegenüber Wildtyp-Mäusen (WT) nur schwach in heterozygoten Mäusen reduziert, währenddessen es in homozygoten Mäusen, nicht detektiert werden konnte. Ferner zeigte sich eine Zunahme der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-Expression in homozygoten Tieren, verglichen mit den heterozygoten und WT-Tieren. Die Phospholamban-Expression (PLB) war in allen Gruppen unverändert. Diese Resultate könnten für eine erhöhte SERCA-Aktivität sprechen. Man maß die Calsequestrin 1 (CSQ1)- und CSQ2-Expression in schnellen und langsamen Skelettmuskelfasern, um den globalen CSQ2 Knock-out, ohne Beeinflussung der CSQ1-Expression, zu bestätigen. Die kardiale Funktion wurde mittels isolierten, perfundierten, spontan schlagenden Herzen (Langendorff-Modell) beurteilt. Man maß eine erhöhte basale Kontraktilität der homozygoten linken Ventrikel im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und heterozygoten Mäusen, die sich durch den β -sympathomimetischen Effekt von Isoprenalin nicht steigern ließ. Um die Ca^{2+} -Speicherung der Organe zu untersuchen, wurden Versuche mit 10 mM Coffein an Langendorff-Hezen durchgeführt. Die Coffein-Effekte waren in allen homozygoten Präparationen vermindert, was für einen geringeren Ca^{2+} -Gehalt des SR sprechen könnte. Somit scheint CSQ2 nicht nur bedeutsam für die Entwicklung der basalen Kraft, sondern auch für die Inotropie im Ventrikel zu sein.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Calsequestrin, ein Ca ²⁺ -bindendes Protein	1
1.2. Der Herzzyklus	2
1.3. Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien	4
1.4. Einfluss von Calsequestrindefekten auf den menschlichen Herzzyklus	4
1.5. Behandlungsstrategien der CPVT	5
1.6. Calsequestrin-Überexpression	5
2. FRAGESTELLUNG	6
3. MATERIAL UND METHODEN	7
3.1. Tiermodell	7
3.2. Herzfunktion in vitro	8
3.2.1. Anästhesie der Tiere und Organentnahme	8
3.2.2. Langendorff-Versuche	9
3.2.3. Erfassung der Versuchsdaten	10
3.3. Herzfunktion in vivo	10
3.3.1. Sedierung und Vorbereitung der Tiere	10
3.3.2. Echokardiografie	10

3.4. Molekularbiologische Methoden	11
3.4.1. DNA Isolation	11
3.4.2. PCR und Agarosegelelektrophorese	11
3.5. Biochemische Methoden	12
3.5.1. Homogenisierung der Proben	12
3.5.2. Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate	12
3.5.3. SDS-PAGE nach Porzio und Pearson	13
3.5.4. Western Blot	14
3.5.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen	14
3.5.6. Stains All	15
3.6. Histologie	15
3.7. Statistische Auswertung	16
4. ERGEBNISSE	17
4.1. Das Tiermodell	17
4.2. Herzfunktion in vitro	19
4.2.1. Langendorff-Versuchsreihe 1	19
4.2.2. Langendorff-Versuchsreihe 2	24
4.3. Herzfunktion in vivo	32
4.4. Biochemische Untersuchungen	32
4.4.1. Genotypisierung und histologische Untersuchung	32
4.4.2. Western Blot	34
4.4.3. Stains All	38
5. DISKUSSION	40
5.1. Diskussion des Genkonstrukts und der Methoden	40
5.2. Herzfunktion in vitro	41
5.2.1. Entwicklung der Tiere	41
5.2.2. Langendorff-Versuchsreihe 1	42
5.2.3. Langendorff-Versuchsreihe 2	43
5.2.4. Arrhythmien	44

5.3. Herzfunktion in vivo	45
5.3.1. Echokardiografie	45
5.4. Biochemische Untersuchungen	45
5.5. CPVT in Maus und Mensch - Ein Vergleich	47
5.6. Klinischer Ausblick	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	50
7. LITERATURVERZEICHNIS	52
8. THESEN	58
9. ANHANG	59
9.1. Tierexperimentelle Versuche	59
9.1.1. Narkose vor Langendorff	59
9.1.2. Narkose bei Echo	59
9.1.3. Tyrode	59
9.2. Biochemische Untersuchungen	59
9.2.1. Genotypisierung	59
9.2.2. Homogenisierung	60
9.2.3. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	60
9.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	60
9.2.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen	60
9.2.6. Stains All-Lösung	62
9.3. Primer, PCR-Programm, Antikörper	62
9.4. Substanzen	64
9.5. Geräte und Bezugsquellen	66
CURRICULUM VITAE	X
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XI
ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	XII
DANKSAGUNG	XIII

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1:</i>	
Ca ²⁺ -Homöostase in der Herzmuskelzelle	3
<i>Abbildung 2:</i>	
Schematische Darstellung des konstitutiven CSQ2 Knock-out Modelles	8
<i>Abbildung 3:</i>	
Kontraktionskraft in Abhängigkeit von Reizfrequenz	19
<i>Abbildung 4:</i>	
Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Reizfrequenz	20
<i>Abbildung 5:</i>	
Schlagfrequenz in Abhängigkeit von Reizfrequenz	21
<i>Abbildung 6:</i>	
Kontraktionskraft nach Isoprenalin-Gabe	22
<i>Abbildung 7:</i>	
Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Isoprenalin-Gabe	23
<i>Abbildung 8:</i>	
Kontraktionskraft nach Coffein-Gabe	24
<i>Abbildung 9:</i>	
Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Coffein-Gabe	25
<i>Abbildung 10:</i>	
Frequenz nach Coffein-Gabe	26
<i>Abbildung 11:</i>	
Kontraktionskraft nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe	27
<i>Abbildung 12:</i>	
Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe	28
<i>Abbildung 13:</i>	
Frequenzzeichnung nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe	28
<i>Abbildung 14:</i>	
Kontraktionskraft nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe	29
<i>Abbildung 15:</i>	
Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe	30

<i>Abbildung 16:</i>	
Frequenzaufzeichnung nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe	30
<i>Abbildung 17:</i>	
Kontraktilität von spontan schlagenden Herzen der Wildtyp- und Knock-out Gruppen unter basalen Bedingungen	31
<i>Abbildung 18:</i>	
Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte zur Genotypisierung	33
<i>Abbildung 19:</i>	
Immunhistologische Färbung von Wildtyp- und Knock-out Proben	33
<i>Abbildung 20:</i>	
Proteinabhängigkeit der Herzproben zur Darstellung von CSQ	35
<i>Abbildung 21:</i>	
Detektierung von PLB bei erhitzten und nicht erhitzten Herzproben	35
<i>Abbildung 22:</i>	
Nachweise von SERCA, CSQ1/2 unter Verwendung von Herz- und Wadenproben	36
<i>Abbildung 23:</i>	
Darstellung von SERCA, CSQ und PLB bei erhitzten Herzproben	36
<i>Abbildung 24:</i>	
Identifizierung von CSQ1/2 des Wadenmuskels	37
<i>Abbildung 25:</i>	
Quantitative Auswertung von SERCA, CSQ und PLB der Herzproben	37
<i>Abbildung 26:</i>	
Darstellung von SERCA und CSQ1/2 aller verwendeten Gewebearten	38
<i>Abbildung 27:</i>	
Stains All-Färbung eines Geles	39

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	
Darstellung der Genotypen Gruppe 1	17
<i>Tabelle 2:</i>	
Darstellung der Genotypen Gruppe 2	18
<i>Tabelle 3:</i>	
Darstellung der Genotypen beider Gruppen	18
<i>Tabelle 4:</i>	
Vergleich der Genotypen bezüglich Herzfrequenz und Ejektionsfraktion vor und nach Isoprenalin-Injektion	32
<i>Tabelle 5:</i>	
PCR-Programm	62
<i>Tabelle 6:</i>	
Übersicht der verwendeten Antikörper	63
<i>Tabelle 7:</i>	
Größenbereiche für Proteinnachweise im Western Blot	63

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcytlase
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriophosphat
β -ARK	β -Adrenozeptorkinase
β -AR	β -Adrenozeptor
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium ²⁺ -Ionen
CAMKII	Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CPVT	katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien
CSQ1	Calsequestrin 1, schnelle Muskelfasern
CSQ2	Calsequestrin 2, kardiale und langsame Muskelfasern
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dF/dt	Kraftänderung/Zeiteinheit (Kontraktions/Relaxationsgeschwindigkeit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriophosphat
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hz	Hertz
ICD	Implantierbarer Cardioverter Defibrillator
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

Iso	Isoprenalin
JCN	Junctin
Kg	Kilogramm
Ko	Kontrolle
Log	Logarithmus
LTCC	L-Typ- Ca ²⁺ -Kanäle
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
n.b.	nicht berechenbar
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
OD	optische Dichte
p	statistische Signifikanz (<0,05)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	PhosphorImager units (arbiträre Einheiten x 10 ⁶)
PK	Proteinkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
PLB	Phospholamban

Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RGS	Regulatorprotein des G-Protein-Signalwegs
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2 (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s.	siehe
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	transgen
TnC	Ca ²⁺ -bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
TRD	Triadin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V 1.	Volt
V 2.	Volumen
v. a.	vor allem
vs.	im Vergleich zu
WT	Wildtyp
(W/V)	weight-volume-percentage = Masse-Volumen-Anteil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Ca^{2+} -Ionen sind essentiell im menschlichen Körper. Sie werden mit der Nahrung aufgenommen und vor allem im Duodenum und Jejunum resorbiert (Ewe, 1974). Zu 99% kommen Ca^{2+} -Ionen im Knochen vor, wo sie an Phosphat-Ionen gebunden, als Hydroxylapatit, für Festigkeit sorgen. Etwa 1% des organischen Gewebes und der Körperflüssigkeiten wird von Ca^{2+} gebildet. In seiner ionisierten Form spielt es eine Rolle als zweiter Botenstoff (Second Messenger) bei Erregungsübertragungen und Zellvorgängen, außerdem bei der Blutgerinnung, Sekretion von Hormonen und natürlich bei Muskelkontraktionen, die auch die des Herzens mit einschließen (Marks, 2013). Hier sei auch die Kopplung von Erregung und Kontraktion in der Systole erwähnt. Die Ca^{2+} -Aufnahme, -Ausscheidung und -Freisetzung oder der Einbau von Ca^{2+} in den Knochen, wird hormonell bestimmt. Dabei wirken das Parathormon aus der Nebenschilddrüse und Calcitriol aus der Niere gegensinnig zum Calcitonin aus der Schilddrüse. Die Ausscheidung erfolgt renal. Der Tagesbedarf beträgt zwischen 600 und 1400 mg (Michaëlsson et al., 2013). Störungen im Ca^{2+} -Stoffwechsel führen zu verschiedenen Krankheitsbildern, so etwa der Duchenneschen Muskeldystrophie, Osteoporose, Rachitis oder Herz-Rhythmus-Störungen (Phillips et al., 2008; Michaëlsson et al., 2013). Die folgende Arbeit beschäftigt sich allen voran mit der Herzspezifischen Wirkung des Ca^{2+} und seiner Wirkung auf die Muskelarbeit.

1.1. Calsequestrin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein

Im menschlichen Körper sind einige verschiedene Ca^{2+} -bindende Proteine bekannt. Neben Calretikulin oder Calmodulin spielt Calsequestrin eine entscheidende Rolle. Die beiden Isoformen des Calsequestrin werden, je nach Muskelgewebstyp, unterschiedlich exprimiert (Paolini et al., 2007). In der schnellen Skelettmuskulatur sorgt CSQ1 für eine geregelte Muskelkontraktion. Im Herzen und im Ösophagus übernimmt diese Aufgabe CSQ2, hier wird CSQ1 nicht gefunden. Die langsame Skelettmuskulatur weist beide Isoformen auf, wobei CSQ1 75% und CSQ2 25%, ausmachen (Lee und Michalak, 2010). CSQ2 ist ein saures Protein, dessen Gen auf dem Chromosom 1 des Menschen kodiert wird (Knollmann et al., 2009).

Es besitzt eine geringe Affinität, aber eine hohe Kapazität für Ca^{2+} -Ionen (Lee und Michalak, 2010). Es kommt an der Innenseite des junctionalen SR im Myokard vor und kann mit dem Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2), als auch den Membranproteinen Triadin und Junctin, einen tetradischen Komplex eingehen (Zhang et al., 1997; Lee und Michalak, 2010). Dieser Komplex, auch „ Ca^{2+} Release Unit“ (CRU) genannt, ist an der Regulation der Ca^{2+} -induzierten- Ca^{2+} -Freisetzung beteiligt (Kornyejev et al., 2011). Triadin und Junctin bilden hier die Verbindungsstelle und verankern Calsequestrin mit dem Ryanodin-Rezeptor (Jones et al., 1995). Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen im SR ist Calsequestrin fest mit Triadin und somit auch an den Ryanodin-Rezeptor gekoppelt, weshalb eine spontane Öffnung des Ca^{2+} -Freisetzungskanal nicht möglich ist. Steigt allerdings die Ca^{2+} -Konzentration im SR, bindet Calsequestrin mehr Ca^{2+} und der Zusammenschluss mit Triadin wird gelockert. Es resultiert eine vollständige Lösung des Calsequestrins vom Ryanodin-Rezeptor, was in einer Öffnung des Letztgenannten gipfelt. Ca^{2+} kann nun durch den Ryanodin-Rezeptor aus dem SR ins Zytosol austreten (Györke et al., 2004). Initial wurde vermutet, CSQ2 hätte nur eine Speicherfunktion für Ca^{2+} , aber neuere Studien zeigen, CSQ2 kann auch an der Ca^{2+} -Freisetzung, der Pufferung freier Ca^{2+} -Ionen, der Ca^{2+} -Bindungskapazität des SR und der Aktivitätsmodulation der Ryanodin-Kanäle, beteiligt sein (Paolini et al., 2007). Außerdem regelt es zum Teil die Kopplung von Erregung und Kontraktion, besonders nach β -adrenerger Stimulation (Valle et al., 2013).

1.2. Der Herzzyklus

Spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich nach Depolarisation und Ca^{2+} strömt aus den T-Tubuli in die Kardiomyozyten ein. Die Bindung von Ca^{2+} an die Ryanodin-Rezeptoren vermittelt die Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung (Fabiato und Fabiato, 1975). Es resultiert eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration im SR. Um den Ca^{2+} -Spiegel im SR aufrecht zu erhalten, diffundiert gebundenes Ca^{2+} von Calsequestrin ab. Die freien Calsequestrin-Monomere binden die Ryanodin-Rezeptoren und inhibieren somit eine weitere Ca^{2+} -Freisetzung. Während der Refraktärzeit werden die Ca^{2+} -Speicher des SR wieder aufgefüllt: die SERCA2 (Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums) füllt die Ca^{2+} -Vorräte wieder auf.

Dies vermindert zum Teil eine spontane Entleerung des Ca^{2+} aus dem SR während der Diastole (Györke et al., 2009). Das zytosolische Ca^{2+} diffundiert dann vor allem zum kontraktilem Apparat, wo es an Troponin C bindet und zur Kraftentwicklung durch Auslösung des Aktin-Myosin Querbrückenzyklus führt (Zot und Potter, 1987).

Zusammenfassend erfolgt der Rücktransport von Ca^{2+} in das SR mittels der SERCA. Deren Aktivität wird durch Phospholamban bestimmt. Dephosphoryliertes Phospholamban bindet an die SERCA, wodurch eine Konformationsänderung zur Inaktivierung der SERCA führt. Nach β -adrenerger Stimulation wird, durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CAMKII), Phospholamban auf Serin 16 und Threonin 17 phosphoryliert und damit inaktiviert, was dementsprechend eine Steigerung der SERCA-Aktivität bewirkt (siehe Abb. 1). Auf diese Weise beschleunigt vermutlich die β -adrenerge Stimulation die Relaxation.

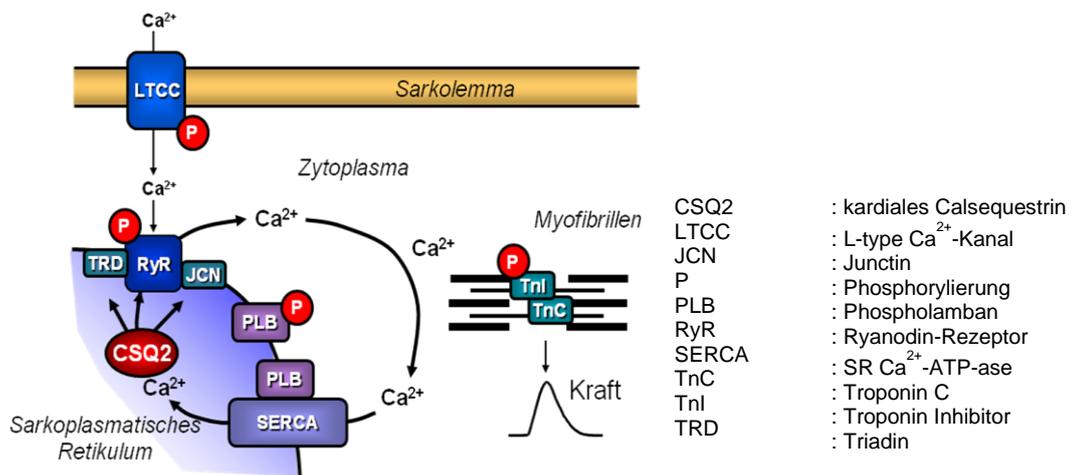


Abbildung 1: Ca^{2+} -Homöostase in der Herzmuskelzelle

Infolge einer Depolarisation der Zellmembran der Herzmuskelzelle kommt es zur Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) des Sarkolemm, wodurch Ca^{2+} aus den T-Tubuli in das Innere der Herzmuskelzelle einströmen kann. Hier bindet es unter anderem an den Ryanodin2-Rezeptor (RyR), welcher in Verbindung mit Triadin (TRD) und Junctin (JCN) steht. Es resultiert die Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung. Das frei gesetzte zytosolische Ca^{2+} diffundiert zum kontraktilem Apparat, wo es an Troponin C (TnC) bindet und zur Kraftentwicklung führt. Der Rücktransport des Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) wird über die sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) vermittelt. Deren Aktivität wird durch Phospholamban (PLB) reguliert. Zur Inaktivierung der SERCA führt die Bindung von dephosphoryliertem PLB an die SERCA. Wird PLB hingegen phosphoryliert (P, Serin 16 und Threonin 17) und somit inaktiviert, bewirkt dies dementsprechend eine Steigerung der SERCA-Aktivität. Im SR wird Ca^{2+} unter anderem an Calsequestrin2 (CSQ2) gebunden.

1.3. Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien

Ein Krankheitsbild, welches im konkreten Zusammenhang mit einer, unter anderem, gestörten Calsequestrin-Expression steht, ist CPVT (katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen kann. Diese treten vor allem bei Stress oder emotionalen Belastungssituationen auf (Priori et al., 2011). Besonders junge Erwachsene und Kinder sind davon betroffen. Die Krankheit äußert sich mit Synkopen, Bradykardien und ventrikulären Arrhythmien (Knollmann et al., 2009). Der plötzliche Herztod ist eine Komplikation und spiegelt somit die Schwere der Erkrankung wider (Valle et al., 2013). Strukturell, sowie funktionell, finden sich keine Auffälligkeiten dieser Herzen. Es sind keine histologischen Veränderungen oder Hypertrophien feststellbar (Györke et al., 2009). 2001 wurde der Ryanodin2-Rezeptor, als Auslöser dieser Krankheit vermutet. Man konnte eine autosomal-dominante Mutation des Rezeptors in einer Patientengruppe nachweisen. Kurze Zeit später wurde eine seltenere Mutation des CSQ2-Gens entdeckt, die zur Entwicklung des gleichen Krankheitsbildes führte. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Form der Erkrankung. In beiden Fällen kommt es zum Erliegen der elektrophysiologischen Kopplung des Herzens (Priori et al., 2011). Homozygote Träger der miss-sense oder non-sense Mutation des CSQ2 zeigen das volle klinische Bild, wobei heterozygote Patienten auch asymptomatisch bleiben können (Knollmann et al., 2009; Priori et al., 2015).

1.4. Einfluss von Calsequestrindefekten auf den menschlichen Herzyklus

Es ist denkbar, dass in Myozyten, denen CSQ2 fehlt, Ca^{2+} -Ionen keinen inhibitorischen Einfluss mehr auf den Ryanodin-Rezeptor ausüben können, woraus eine reduzierte basale Ca^{2+} -Konzentration im SR resultieren könnte (Knollmann et al., 2006). Die Füllungszeit des Speichers wäre somit wesentlich verkürzt, was eine vorzeitige Ca^{2+} -Freisetzung beenden könnte.

1.5. Behandlungsstrategien der CPVT

Es existieren einige Behandlungsansätze der CPVT. Die medikamentöse Therapie beinhaltet die Gabe von β -Adrenozeptor-Blockern und von Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten (Chopra et al., 2009). Diese Therapiestrategien erwiesen sich allerdings als nur mäßig erfolgversprechend. Flecainid, zuvor nur bekannt als ein Na^+ -Kanal-Blocker der Klasse Ic, bildet einen neuen Ansatz in der Behandlung der CPVT (Knollmann et al., 2006). Flecainid reduziert, durch die Wirkung auf den RyR2, wohl die Frequenz der spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR, sowohl bei Formen, denen ein Calsequestrin-, als auch ein Ryanodin-Rezeptor-Defekt zu Grunde liegt. Bei Versagen der Therapie mit β -Adrenozeptor-Blockern ist, nach gegenwärtigen Erkenntnissen, eine Symptomkontrolle mittels α -Adrenozeptor-Blockern zu erwägen. Es zeigte sich, dass u.a. Phentolamin und Labetalol sich günstig, sowohl auf die Ruhefrequenz, als auch auf Frequenz und Rhythmus bei körperlicher Aktivität und Stress (z.B. Adrenalin), auswirken können. Gefährliche Arrhythmien konnten so reduziert werden (Kurtzwald-Josefson et al., 2014). Ein invasiverer Behandlungsansatz ist die Implantation eines ICD (Implantierbarer Cardioverter Defibrillator). Da dieser aber, infolge hohen β -adrenergen Stresses, selbst ventrikuläre Tachykardien auslösen kann, kann dieser Behandlungsansatz nur in Sonderfällen eingesetzt werden. Herztransplantationen oder Ganglionektomie des Ganglion stellatum sind nur in seltenen Fällen indiziert (Knollmann et al., 2009).

1.6. Calsequestrin-Überexpression

Bei Überexpression von nicht-mutierten CSQ2 in Herzen transgener Mäuse, entwickelt sich eine Herzinsuffizienz, die Herzmasse steigt und eine erhöhte Mortalität wurde mehrfach beschrieben. Auch die hypertrophe Kardiomyopathie steht im Zusammenhang mit der CSQ2-Überexpression (Knollmann et al., 2006; Lee und Michalak, 2010). Als Ursache für diese pathophysiologischen Veränderungen wird ein höherer Ca^{2+} -Gehalt des SR in Folge erhöhter Calsequestrin-Mengen und erhöhter Bindungskapazität für Ca^{2+} diskutiert. Außerdem werden Ca^{2+} -abhängige Transkriptionsfaktoren aktiviert (Guo et al., 2012; Kubalova et al., 2004). Diese Veränderungen bedingen eine verminderte Kopplung von Erregung und Kontraktion, sowie bisweilen auch Arrhythmien (Lee und Michalak, 2010).

2. Fragestellung

Anhand eines Maus-Modells sollte versucht werden eine Ablation des Calsequestrins beim Menschen in einem Tiermodell nachzuahmen. Deshalb wurde ein CSQ2 Knock-out Modell untersucht.

Um das Modell zu charakterisieren sollte der Einfluss der positiv inotropen Substanz Isoprenalin auf das Herz, mittels Echokardiografie und Langendorff-Modell, untersucht werden. Biochemische Unterschiede sollten im Western-Blot-Verfahren gemessen werden. Vergleichend wurden Proben von Wildtyp-Herzen und heterozygoten Tieren analysiert. Ziel dieser Arbeit sollte sein, das CSQ2 Knock-out Modell spezifisch zu phänotypisieren und Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen herauszuarbeiten.

Außerdem sollte die vorliegende Arbeit Unterschiede der verschiedenen Genotypen bezüglich Herzarbeit, Leistung und Rhythmus, prüfen. Die essenzielle Frage, die im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand, war die nach der genauen Funktion und Aufgabe des Calsequestrins im Herzen. Ein Verständnis der Wirkung von Stressreizen auf das Herz bildete die Basis für die zu Grunde liegende Fragestellung. Neue Erkenntnisse könnten dazu beitragen, die Wirkung von Calsequestrin-Mutationen bei Patienten besser zu verstehen und neue Therapieansätze der CPVT liefern.

3. Material und Methoden

3.1. Tiermodell

Bei dem hier verwendeten Mausmodell handelt es sich um einen konstitutiven Calsequestrin 2 Knock-out. Die Deletion von CSQ2 konnte mittels des loxP/Cre- Rekombinationssystem erreicht werden. Eine Selbst-Exzisions-Technik wurde angewandt, um eine tACE-Cre/Neo^r-Kassette, welche zwischen zwei loxP-Seiten liegt, während der Keimzellpassage mit Hilfe eines Hoden-spezifischen Promotors, zu entfernen (Bunting et al., 1999). Das gentechnisch veränderte Allel wurde durch homologe Rekombination mit dem „targeting vector“ (Ziel-Vektor) in embryonalen Stammzellen von Sv 129-Mäusen generiert. Nach Blastozysteninjektion der Stammzellen und Entwicklung chimärer Mäuse, trat die Selbst-Exzision in allen aus den umgenerierten Stammzellen hervorgegangenen Spermien auf, die zu einem verkürzten Exon 1 des CSQ2 führten. Somit war kein Start-Codon mehr für die Translation von CSQ2 vorhanden. Die chimären Mäuse wurden in einen C57BL/6 Hintergrund gekreuzt (siehe Abb. 2). Embryonales Stammzell-Targeting, Blastozysten-Injektion und Züchtung der Chimären wurde durch die Firma PolyGene (Ruemlang, Schweiz) realisiert. Homozygote und heterozygote Mäuse konnten mittels Genotypisierung und PCR identifiziert werden. Die Größen der PCR-Produkte lagen bei 0,93 kbp für das mutierte Allel und bei 1,2 kbp für das Wildtyp-Allel. Folgende Primer wurden genutzt: Forward Primer 5' - AAATAGATC ACCGGCTTCCC - 3' und Reverse Primer 5'- GCCCTGCTCCCTGGATAAAG - 3' (siehe 9.3.).

Die Versorgung der Tiere entsprach der Leitlinie für Pflege und Gebrauch von Labortieren des US Nationalen Institutes für Gesundheit (NIH Publikation No. 85-23, korrigiert 1996). Eine Genehmigung der Tierversuche lag vor.

Tierversuchsnummer: 42502-2-1078-MLU

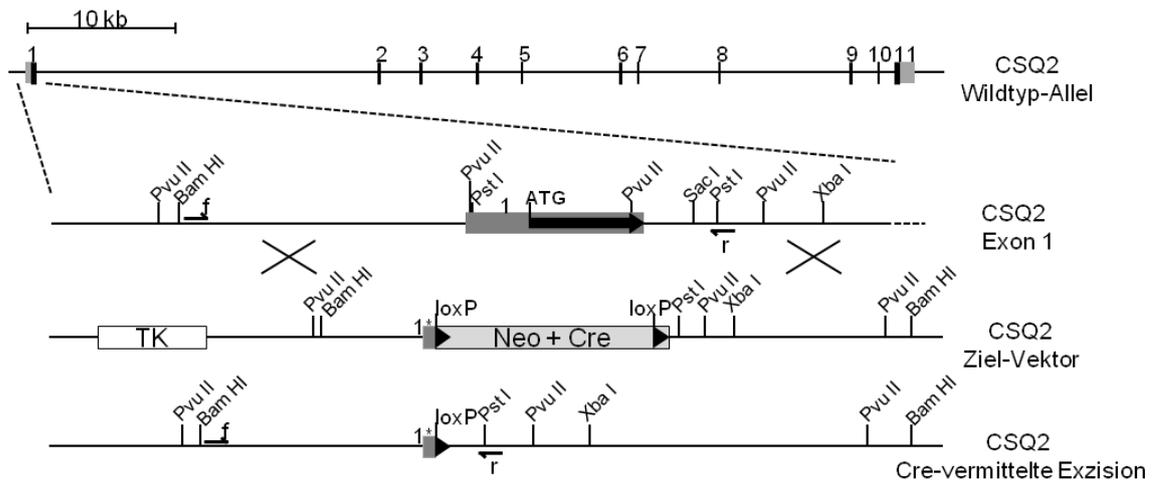


Abbildung 2: Schematische Darstellung des konstitutiven CSQ2 Knock-out Modells

Zur Generierung transgener Mäuse mit einem selektiven CSQ2 Knock-out wurde ein loxP/Cre-Rekombinationssystem in embryonalen Stammzellen der Maus in der Arbeitsgruppe angewandt. In Selbst-Exzisionstechnik wurde eine tACE-Cre/Neo^r-Kassette, mit Hilfe eines Hoden-spezifischen Promotors entfernt, wodurch es zur Expression eines verkürzten Exon 1 des CSQ2 kam. Die Translation von CSQ2 konnte durch das nun fehlende Start-Codon verhindert werden. Eine Unterscheidung der homo- und heterozygoten Tiere erfolgte durch Genotypisierung und PCR (PCR-Produkt mutiertes Allel: 0,93 kbp/Wildtyp-Allel: 1,2 kbp).

3.2. Herzfunktion in vitro

3.2.1. Anästhesie der Tiere und Organentnahme

Die Mäuse wurden, entsprechend ihres Gewichtes, mit Pentobarbital (1,5 mg/kg/KG) narkotisiert und mit Heparin (1000 IE = 0,2 ml) antikoaguliert (siehe 9.1.1.). Die Injektionen erfolgten intraperitoneal. Durch einen Schnitt unterhalb des Diaphragmas und Durchtrennung des Brustbeins wurde die Entnahme des Herzens durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der gesamte Aortenbogen unbeschädigt blieb. In einem mit physiologischer Nährlösung (Tyrodelösung; siehe 9.1.3.) gefüllten Becherglas wurde das Herz gespült und daraufhin in die Präparationsschale überführt, welche ebenfalls Carbogen-begaste (95% O₂, 5% CO₂) Tyrodelösung enthielt. Nun wurden Lungen- und Thymusgewebe abpräpariert, um den Aortenbogen anschließend auf die Kanüle der Langendorff-Apparatur aufzufädeln und zu fixieren. Es war unabdingbar das System blasenfrei zu halten, da dies sonst zu Embolien hätte führen können. Sobald das Herz in der Langendorff-Anlage befestigt war, wurde dessen komplette Versorgung mit der Apparatur gesteuert.

Nach Beendigung des Versuchs wurde das Herz in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80°C gelagert und für biochemische Experimente weiter verwendet (siehe 3.4.). Für diese Untersuchungen wurden außerdem Speiseröhre-, Waden- und Oberschenkelmuskel entnommen.

3.2.2. Langendorff-Versuche

Beim Langendorff-Modell handelt es sich um eine experimentelle Anordnung, bei der isolierte, perfundierte, spontan schlagende Herzen untersucht werden (Langendorff et al., 1898). Es wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, nach jeweils unterschiedlichen Protokollen. Während des gesamten Versuchsablaufs wurden die Herzen über eine begaste Tyrodelösung mit Elektrolyten und Sauerstoff versorgt, wobei ein konstanter Druck um 55 mmHg eingestellt wurde. Bei der Präparation der Maus Herzen für das Protokoll 1, wurde der rechte Vorhof abgetrennt, sodass der darin befindliche Sinusknoten keinen Einfluss mehr auf die Herzaktionen nehmen konnte. Nach erfolgreicher Befestigung in die Apparatur wurde das Präparat zunächst 10 bis 15 Minuten perfundiert, um eine Stabilisierung zu erreichen. Mit Hilfe eines Reizgerätes wurde ein Stimulationsreiz erzeugt (1 Hz; 1,5 Hz; 2 Hz; 2,5 Hz; 3 Hz; 3,5 Hz; 4 Hz; 4,5 Hz; 5 Hz), welchem das Herz folgte. Nach 5 Hz wurde erneut mit 1 Hz gereizt und gewartet, bis das Präparat sich wieder stabilisiert hatte. Mit einer externen Pumpe wurde nun $1\ \mu\text{M}$ Isoprenalin in die Perfusionslösung gegeben, dessen Effekt schon nach wenigen Minuten sichtbar war.

Bei Gruppe 2 wurden komplette Herzen verwendet, ohne vorherige Abtrennung des rechten Vorhofes. Hier wurden zunächst Coffein (10 mM) und dann zweimal Isoprenalin ($1\ \mu\text{M}$) zugegeben. Zwischen den drei Schritten erfolgte jeweils eine sorgfältige Spülung des Präparates. Alle Versuchsorgane wurden bei -80°C aufbewahrt und weiter verwendet (siehe 3.4.).

3.2.3. Erfassung der Versuchsdaten

Die Daten wurden während der Versuche mit dem Programm LabChart 5 aufgenommen. Bei der darauffolgenden Auswertung wurden Kontrollwerte mit den dazugehörigen Effektwerten erhoben. Im Windows Programm Excel, sowie der Varianzanalyse ANOVA erfolgte die statistische Auswertung (siehe 3.7.). Grafiken wurden mit dem Programm Prism 5 erstellt (siehe 9.5.).

3.3. Herzfunktion in vivo

3.3.1. Sedierung und Vorbereitung der Tiere

Um eine suffiziente Narkose der Tiere während des Versuches zu erreichen, wurde mit einem volatilen Narkosegas (Isofluran) gearbeitet. Die Mäuse wurden einzeln mit einem Inhalationsschlauch in Bechergläser gegeben und diese mit Aluminiumfolie verschlossen. Zwei Minuten lang wurden die Tiere mit 2 Vol.-% Isofluran und einem Sauerstoff Flow von 1,5 l/min begast (siehe 9.1.2.). Bei erfolgreicher Narkotisierung folgte die Sicherung der Tiere mittels Kunstseidenpflaster (Transpore 3M) auf dem Untersuchungstisch. Auch die Inhalationsschläuche wurden gleichermaßen befestigt, um ein verfrühtes Erwachen zu verhindern. Während des Versuches wurde mit 1,5 Vol.-% Narkosegas gearbeitet.

3.3.2. Echokardiografie

Die Ultraschallmessungen erfolgten mit einem VEVO-System (siehe 9.5.). Zunächst wurde Enthaarungscreme auf den Thorax-Bereich der zu untersuchenden Maus verteilt. Nach sorgfältiger Entfernung des Fells wurde das Ultraschallgel aufgetragen und der Schallkopf entsprechend ausgerichtet. Es wurde darauf geachtet, dass die Herzspitze und der Abgang der Aorta auf dem sonografischen Bild gut erkennbar waren. Es wurden Ruhewerte und Effektwerte nach β -adrenerger Stimulation mit 100 μ l Isoprenalin (Konzentration: 10 mM; i.p. Applikation) erhoben. Zur Auswertung wurden B- und M-Mode aufgezeichnet. Mit B-Mode wurden 300 Bilder hintereinander aufgenommen und es war möglich, Diastole und Systole darzustellen. Der M-Mode hingegen erlaubte die Analyse der Herzfrequenz und Ejektionsfraktion.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. DNA Isolation

Zur Bestimmung der verschiedenen Genotypen der Versuchstiere, führten wir eine Genotypisierung der Mäuse durch. Durch eine Phenolaufreinigung erfolgte die Isolation von genomischer DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse. Dazu wurden zu den Schwanzbiopsien 700 µl TE/SDS, sowie 20 µl Proteinase K gegeben und diese über Nacht schüttelnd bei 55°C inkubiert (siehe 9.2.1.). Es wurden anschließend 700 µl Phenol hinzugefügt, die Proben gemischt und drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde dekantiert und mit 350 µl Phenol, sowie 350 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), versetzt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes. Durch Zugabe von 70 µl Na-Acetat (pH 6), 700 µl 100% Ethanol und einer 10-minütigen Zentrifugation wurde die DNA gefällt und sedimentiert. Es folgte ein Waschschrift mit 70% Äthanol. Getrocknet wurden die DNA-Sedimente in einer Vakuumzentrifuge, dann mit 50 µl TE (pH 8) versetzt und bei 65°C wieder gelöst. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 260 nm und 280 nm gegen TE (pH 8) im Eppendorf BioPhotometer (Programm: ds DNA; siehe 9.5.). Aus beiden Werten wurde der Quotient ermittelt, welcher als Maß für die Reinheit der DNA genutzt werden konnte. Es wurden nur Proben verwendet, deren Quotient zwischen 1,8 - 2,0 lag und somit einem hohen Reinheitsgehalt entsprachen. Die DNA-Konzentration der Proben, wurde mit dem 260 nm Wert am Photometer, bestimmt.

3.4.2. PCR und Agarosegelelektrophorese

Der PCR-Ansatz wurde aus 0,1 µg der extrahierten DNA (siehe 3.4.1.), unter Zugabe von 5 µl 10 x Standard Puffer (Ampliqon)/15 mM Magnesiumchlorid, 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µl Forward-Primer (P9), 0,5 µl Reverse-Primer (P11), 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (Ampliqon) und auf 50 µl mit DEPC-Wasser, hergestellt. Es schloss sich die Polymerase-Kettenreaktion an. Zunächst erfolgte die Denaturierung, worauf sich das Annealing und letztlich die Elongation anschloss (siehe 9.3.; Tab. 5). Dieser Zyklus wurde 29-mal wiederholt. 50 µl der entstandenen Mischung wurden mit 12,5 µl Ladepuffer versetzt und 20 µl davon auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Vermittelt durch einen angelegten Strom (80 mA, 15 Minuten), gelang die Auftrennung der Moleküle. Die Gele wurden zur Auswertung unter UV Licht (312 nm) betrachtet und anschließend den entsprechenden Genotypen zugeordnet (Wildtyp +/+, Heterozygot +/-, Knockout -/-).

3.5. Biochemische Methoden

3.5.1. Homogenisierung der Proben

Die im Langendorff-Versuch verwendeten Herzen, sowie die zusätzlich entnommenen Oberschenkel, Wadenmuskel und Ösophagusproben, wurden für den Proteinnachweis benutzt. Diese wurden bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C gelagert. Alle für die Homogenisation benötigten Geräte wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Proben wurden in ein Teflungefäß und einer kleinen Wolframcarbidkugel gegeben, mit 100 µl Lysispuffer versetzt und anschließend bei 2.100 rpm im Mikrodismembrator pulverisiert (siehe 9.2.2.; 9.5.). Das tiefgekühlte Pulver wurde mit einem Spatel entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit weiteren 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit dem Rüttler gemischt und auf Eis gelagert. Es wurde 3 x 15 Sekunden eine Ultraschallhomogenisation auf Eis durchgeführt, worauf sich eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur anschloss. Um alle restlichen unlöslichen Bestandteile zu entfernen, wurde 30 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.5.2. Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate

Um den Proteingehalt der Proben zu ermitteln, wurde eine dreifache Protein-Bestimmung nach Lowry durchgeführt. Als Proteinstandard wurde 1 mg Rinderserum/ml verwendet. Es wurde eine aufsteigende Verdünnungsreihe der Proben und des Standards mittels Aqua destillata hergestellt, diese jeweils mit 500 µl Lösung D (2% Na₂-CO₃ in 0,1 NaOH; 1% Na⁺-K⁺-Tartrat; 0,5% CuSO₄) versetzt und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden jedem Röhrchen 0,1 ml der Lösung E (Folin-Ciocalteus) zugegeben, gemischt und wieder 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (siehe 9.2.3.).

Die Standard- und Probenlösungen wurden in Küvetten umgefüllt und bei 595 nm im Eppendorf BioPhotometer (Programm: Lowry; siehe 9.5.) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Programm Excel.

3.5.3. SDS-PAGE nach Porzio und Pearson

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden zunächst die nötigen Glasplatten mit Äthanol und Aqua destillata gesäubert, woraufhin die Gelapparatur zusammengebaut werden konnte (siehe 9.5.). Es wurden 10%ige Trenngelle verwendet, die in die Apparatur gegossen wurden und über Nacht bei 4°C (Kühlraum) auspolymerisieren konnten. Als Verdunstungsschutz wurde Aqua destillata Isopropanol und Parafilm verwendet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde darauf ein 4%iges Sammelgel gegossen, welches 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehen gelassen wurde. Die Proben wurden entsprechend ihres Proteingehaltes mit 2 x Ladepuffer und 10 mM NaHCO₃/20% SDS hergestellt, um die gewünschten Konzentrationen (25 µg/Spur, 50 µg/Spur, 75 µg/Spur, 80 µg/Spur, 100 µg/Spur, 150 µg/Spur, 200 µg/Spur) zu erzielen (siehe 9.2.4.). Zur Denaturierung wurden Marker und Proben 10 Minuten lang bei 95°C erhitzt. Nicht erhitzte Proben wurden bei Raumtemperatur verwendet. Pro Spur wurde das Gel mit 100 µl Probe beladen, sowie 25 µl des Markers. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer, die kontinuierlich auf 4°C gekühlt und mit Elektrophoresepuffer bestückt war (siehe 9.2.4.). Zunächst wurde eine Stromstärke von 40 mA pro Gel angelegt welche, nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatte, auf 60 mA erhöht wurde. Nach 240 Minuten hatten die Lauffront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Trenngels erreicht und das Gel konnte für den Transfer verwendet werden. Um nahe beieinander liegende Banden besser auftrennen zu können, wurde bei einigen Versuchen die Elektrophoresezeit auf etwa 280 Minuten erhöht.

3.5.4. Western Blot

Für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde ein Aufbau, aus zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, der Nitrozellulose-Membran, des Geles, unter Zugabe von Transferpuffer, luftblasenfrei zusammengestellt (siehe 9.5.). Dieses wurde für den Transfer mit dem entsprechenden Puffer in die Transferkammer überführt und über Nacht bei 4,5 Ah und 4°C stromkonstant laufen gelassen. Zur Erfolgskontrolle des Transfers wurden die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit Ponceaurot angefärbt (siehe 9.2.4.).

3.5.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen

Zum Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde zunächst die Nitrozellulose-Membran den Proteingrößen entsprechend zugeschnitten (SERCA: 96 kDa, CSQ: circa 55 kDa, PLB nicht erhitzt: 19-25 kDa, PLB auf 95°C erhitzt: <12 kDa; siehe Tab. 7). Die Membranstreifen wurden in Plastikgefäße überführt und 2 x 10 Minuten mit TBST gespült, um das Ponceaurot auszuwaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wurden die SERCA-, sowie auch die CSQ-Streifen mit 5% Milchpulver in TBST, eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Selbiges erfolgte mit den PLB-Streifen, hier wurde jedoch 2% Rinderserum-Albumin in TBST, anstelle des Milchpulvers, verwendet (siehe 9.2.5.). Der Blockierungspuffer wurde abgegossen und der erste Antikörper hinzugegeben (SERCA: anti-SERCA, Verdünnung 1:3000 in 5% Milchpulver in TBST; CSQ: anti-CSQ, Verdünnung 1:1000 in 5% Milchpulver in TBST; PLB: anti-PLB, Verdünnung 1:1000 in 2% BSA in TBST; siehe 9.3.; Tab. 6). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Dekantierung des ersten Antikörpers wurde jeder Streifen 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur, wobei für jeden Streifen eine Antikörperverdünnung von 1:1000 verwendet wurde (SERCA: anti-mouse IgG in 5% Milchpulver in TBST; CSQ: anti-rabbit IgG in 5% Milchpulver in TBST; PLB: anti-mouse IgG in 5% Milchpulver in TBST; siehe 9.3.; Tab. 6). Danach wurde 3 x 10 Minuten mit TBST und 2 x 2 Minuten mit AP-Puffer gespült.

Es wurden zwei verschiedene Nachweisreaktionen angewandt. Zunächst die quantitative Darstellung mit ECF-Substrat-Lösung (siehe 9.2.5.). 10 ml der Lösung wurden auf die Streifen gegeben, 5 Minuten dunkel inkubiert, mit AP-Puffer gespült und anschließend konnten die Banden via PhosphorImager (Typhoon; siehe 9.5.) sichtbar gemacht werden. Die Auswertung erfolgte mit der ImageQuant-Software. Als semiquantitative Nachweismethode wurde die Farbreaktion mit NBT/BCIP verwendet (siehe 9.2.5.). Die frisch hergestellte Farbstofflösung wurde auf die Membranstreifen gegeben bis Banden zu sehen waren. Anschließend wurden die Blots mit Aqua destillata gespült und zur Dokumentation eingescannt.

3.5.6. Stains All

Es wurden Gele, wie unter 3.5.3. aufgeführt, gegossen und die Proteine mittels Gelelektrophorese getrennt. In die Sammelgeltaschen wurden die Herzproben in 150 µg/Spur und 200 µg/Spur Konzentrationen pipettiert. Für Vergleichszwecke wurde außerdem eine Herzprobe einer transgenen Maus, die CSQ2 im Herzen überexprimiert, aufgetragen. Zur Fixierung wurden die Gele über Nacht in 25%igem Isopropanol in Wasser bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es erfolgten drei Waschschriffe mit der Fixierlösung, wobei abwechselnd gespült und eine zehnminütige Einwirkung durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde die Färbelösung (67,5% TrisBase; 7,5% Formamid; 25% Isopropanol; 0,025% Stains All) für 24 Stunden in Dunkelheit aufgetragen (Campbell 1983; siehe 9.2.6.). Die Entfärbung erfolgte durch Fixierlösung und einer Belichtungszeit von circa 20 Minuten auf einem Transilluminator.

3.6. Histologie

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie in Halle an der Saale wurden unter der Aufsicht von Herrn Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann, Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt.

3.7. Statistische Auswertung

Die hier aufgeführten Daten sind als Mittelwerte mit dem dazu gehörigen Standardfehler (SEM), der gemessenen Einzelwerte angegeben. Die Anzahl der durchgeführten Experimente wurde mit n angegeben. Mittels T-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet. Unter Verwendung der Varianzanalyse ANOVA und die darauffolgende Fehlertestung nach Bonferroni, wurden mehrere Parameter untersucht. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und entsprechend gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Das Tiermodell

Die verwendeten Mäuse waren lebensfähig und fertil. Makroskopisch fanden sich, in Vorbereitung auf die weiteren Versuche, keine Pathologien der Herzen. In den untersuchten Altersgruppen waren das relative Herz- und Lebergewicht unverändert, wohingegen das relative Lungengewicht erhöht war (siehe Tab. 1/2/3).

Berechnung relatives Organgewicht: Organgewicht/Körpergewicht (mg/g)

Tabelle 1: Darstellung der Genotypen Gruppe 1

In Gruppe 1 war das relative Herzgewicht unverändert. Es konnten keine Alternationen zwischen den Genotypen verzeichnet werden. W: weiblich; M: männlich; m: Monate

Genotyp	Anzahl (n)	Alter (m)	Gewicht (g)	Herzgewicht (mg)	Rel. Herzgewicht (mg/g)
+/+	W: 2 M: 5	10,4 ± 0,06	33,4 ± 1,5	202 ± 2,2	6,04 ± 0,61
+/-	W: 3 M: 6	18,7 ± 0,08	38,4 ± 1,9	208 ± 3,4	5,41 ± 0,88
-/-	W: 5 M: 1	12,3 ± 0,04	30 ± 1,7	152 ± 1,8	5,06 ± 0,12

Tabelle 2: Darstellung der Genotypen Gruppe 2

In Gruppe 2 war das relative Herzgewicht unverändert. Zwischen beiden Gruppen 1/2 gibt es keine Unterschiede bezüglich des relativen Herzgewichtes.

Genotyp	Anzahl (n)	Alter (m)	Gewicht (g)	Herzgewicht (mg)	Rel. Herzgewicht (mg/g)
+/+	W: 0 M: 4	4,7 ± 0,04	23,4 ± 1,1	146 ± 1,3	6,23 ± 0,16
+/-	W: 4 M: 5	6,5 ± 0,09	21 ± 2,4	114 ± 3,6	5,42 ± 0,78
-/-	W: 3 M: 2	6,4 ± 0,02	20,4 ± 2,3	103 ± 3,2	5,04 ± 0,52

Tabelle 3: Darstellung der Genotypen beider Gruppen

Bei beiden Versuchsgruppen (1/2), konnte ein konstantes relatives Lebergewicht detektiert werden, wohingegen das relative Lungengewicht der -/- Tiere erhöht war, gegenüber +/+ und +/- . * p < 0,05 vs. +/+; # p < 0,05 vs. +/-

Genotyp	Anzahl (n)	Rel. Lungengewicht (mg/g)	Rel. Lebergewicht (mg/g)
+/+	W: 2 M: 9	6,41 ± 0,65	44,4 ± 2,8
+/-	W: 7 M: 11	6,85 ± 0,38	51,9 ± 3,1
-/-	W: 8 M: 3	8,89 ± 0,5*#	54,6 ± 3,5

4.2. Herzfunktion in vitro

4.2.1. Langendorff-Versuchsreihe 1

Die Versuche an isolierten perfundierten Herzen wurden unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Sie dienten der Untersuchung verschiedener Kontraktionsparameter des Herzens (Kraft, Kontraktions-, Relaxationszeit, Frequenz). Durch zwei Versuchsreihen sollten Unterschiede in der Herzfunktion zwischen den einzelnen Genotypen ermittelt werden, um so Aufschluss über die Ca^{2+} -Homöostase zu erhalten (siehe 3.2.2.). In der ersten Versuchsreihe wurde der rechte Vorhof abgetrennt, um eine Reizung des Herzens durch den Sinusknoten zu unterbinden. Nach entsprechender Äquilibration wurde von extern mit verschiedenen Frequenzen (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 Hz) gereizt und die oben genannten Parameter bestimmt. Unterschiede in der Kontraktionskraft zeigten sich bei 2 Hz, 2,5 Hz und 3 Hz im Vergleich zwischen den homozygoten Tieren und Wildtyp-Herzen. Weitere signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen, auch nicht im Vergleich mit heterozygoten Herzen (siehe Abb. 3).

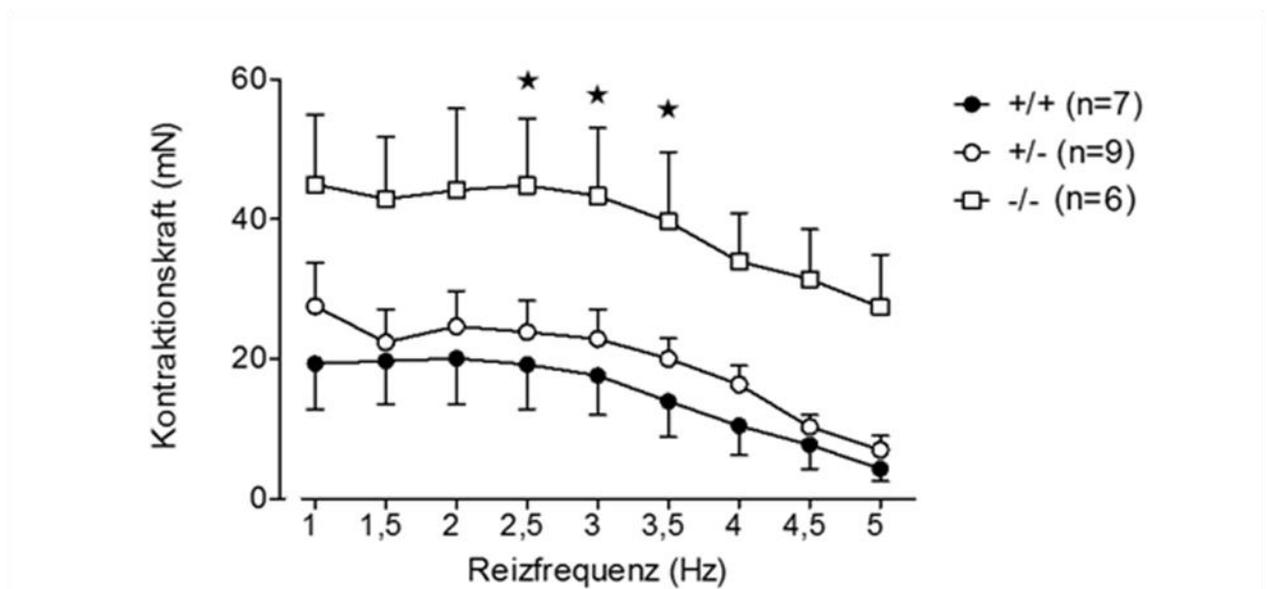


Abbildung 3: Kontraktionskraft in Abhängigkeit von Reizfrequenz

Dargestellt ist die Kontraktionskraft (mN) von isolierten perfundierten Herzen, in Abhängigkeit von Reizfrequenz (Hz), bei Proben mit präexperimentell entferntem rechtem Vorhof. Angelegt wurden Frequenzen zwischen 1 Hz – 5 Hz. * $p < 0,05$ vs. +/+

Die Kontraktionsgeschwindigkeit war bei den Knock-out Herzen erhöht gegenüber den Wildtyp-Herzen (bis auf die Reizung mit 2 Hz) und zusätzlich zu den Heterozygoten (bei 4,5 Hz und 5 Hz). Die Relaxationsgeschwindigkeit zeigte das gleiche Ergebnis.

Hier fanden sich erhöhte Werte der homozygoten Herzen gegenüber den Wildtyp-Herzen bei allen Reizfrequenzen und zwischen Homozygoten und Heterozygoten im Frequenzbereich von 1,5; 2,5; 4; 4,5; 5 Hz (siehe Abb. 4).

Die Auswertung der Frequenz zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen, da alle Herzen der vorgegebenen Reizfrequenz gefolgt sind (siehe Abb. 5). Das erwartete positive Treppenphänomen (Anstieg der Kontraktionskraft bei steigender Reizfrequenz = Frequenzinotropie; Bowditch 1871), ließ sich nicht nachweisen.

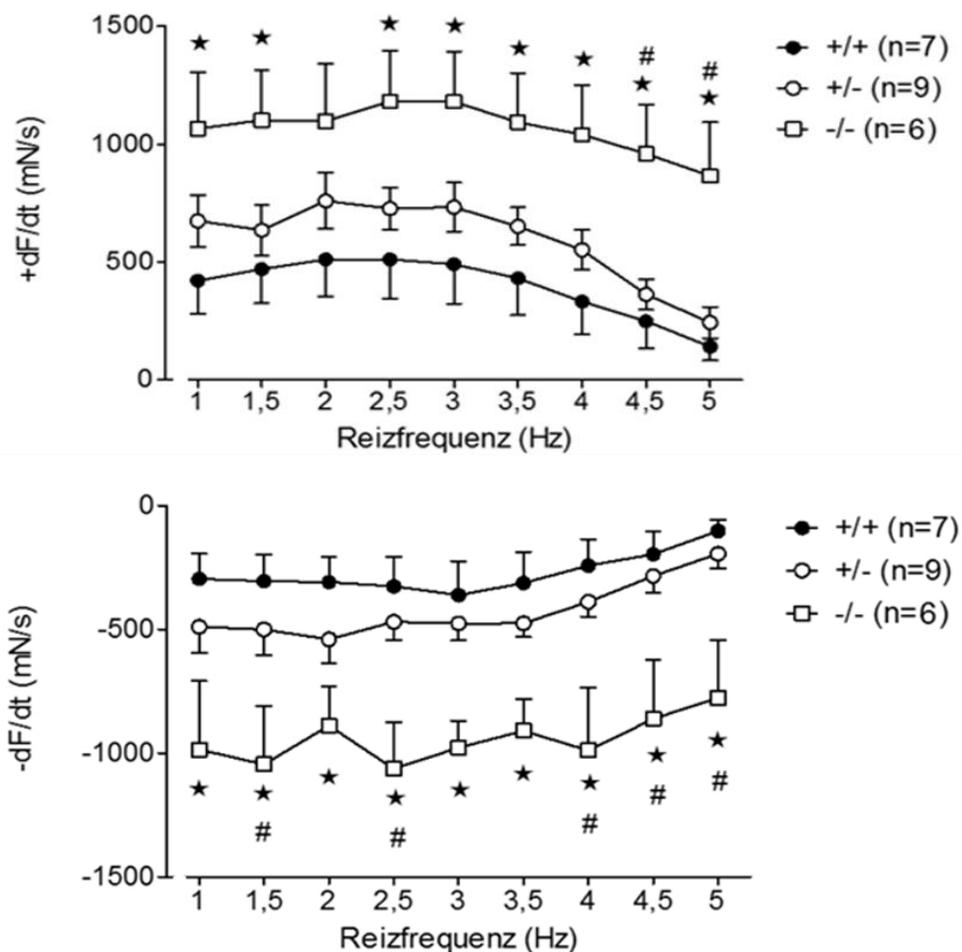


Abbildung 4: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Reizfrequenz

Abgebildet sind Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ($\pm dF/dt$; mN/s) bei Herzproben mit abgetrenntem rechtem Vorhof und externer Stimulierung. Auch hier wurden Frequenzen zwischen 1 Hz bis 5 Hz angelegt. Die $-/-$ Proben waren, verglichen mit $+/+$ und $+/-$ Proben, in Bezug auf Relaxations- und Kontraktionszeit stetig erhöht. * $p < 0,05$ vs. $+/+$; # $p < 0,05$ vs. $+/-$

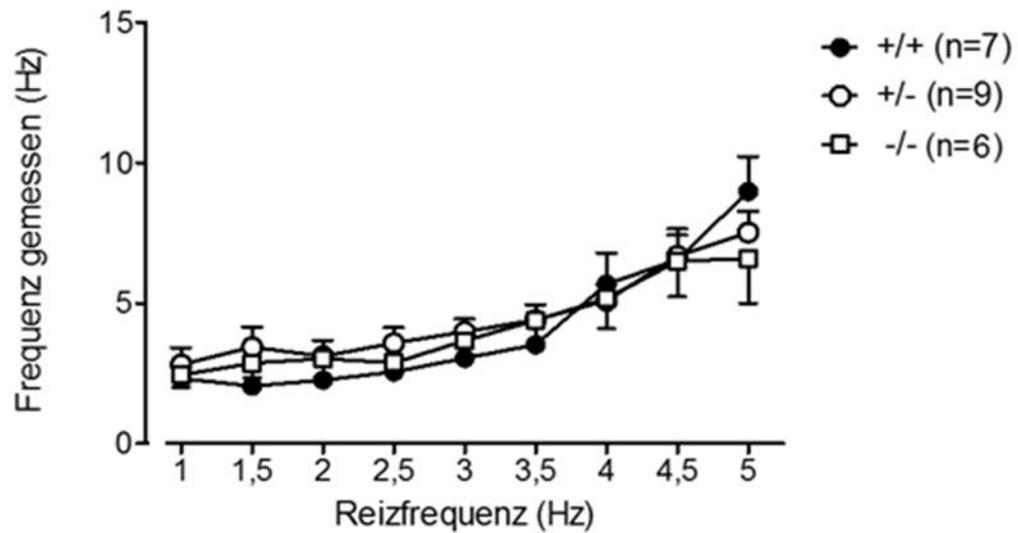


Abbildung 5: Schlagfrequenz in Abhängigkeit von Reizfrequenz

Da bei allen verwendeten Herzen der Gruppe 1, der rechte Vorhof entfernt wurde und alle Proben mit den gleichen Reizfrequenzen (1 - 5 Hz) behandelt wurden, gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Dieser Versuch diente als Kontrolle, dass alle Herzen dem angelegten Reiz gefolgt sind.

Anschließend an diesen Versuch wurde jedes Herz mit 1 Hz gereizt und mit 1 μ M Isoprenalin stimuliert. Es wurden Werte vor und nach Isoprenalin-Gabe erhoben. Die Kontraktionskraft zeigte für Kontrollwerte einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out Herzen, den Wildtyp-Herzen und den Heterozygoten. Die Homozygoten wiesen höhere Werte auf. Nach Isoprenalin-Gabe ließ sich ein Unterschied zwischen den Knock-out Herzen und den Wildtyp-Herzen darlegen, wobei die Homozygoten nicht auf Isoprenalin reagierten. Bei letztgenannten wurden ebenfalls wieder höhere Werte detektiert (siehe Abb. 6).

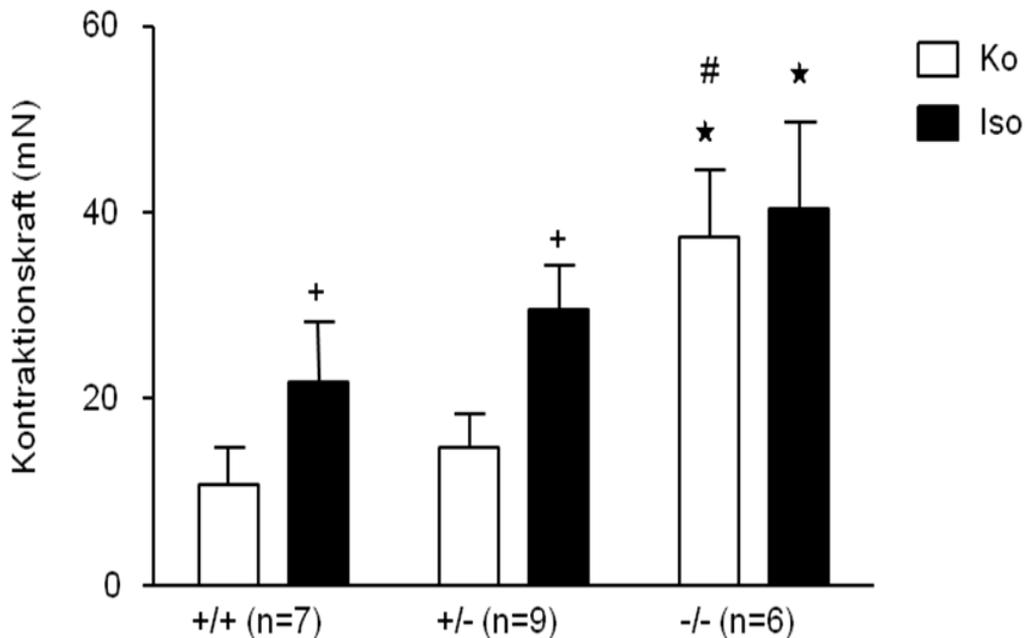


Abbildung 6: Kontraktionskraft nach Isoprenalin-Gabe

Nachdem die Herzen mit verschiedenen Frequenzen gereizt wurden, erfolgte die Einstellung der Reizfrequenz auf 1 Hz. Es wurde mit 1 μ M Isoprenalin stimuliert. In dieser Abbildung ist die Kontraktionskraft (mN) vor (Ko) und nach Isoprenalin-Gabe (Iso) dargestellt. * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-; + $p < 0,05$ vs. Ko

Selbiges traf auch bei der Auswertung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit zu. Hier wurden die niedrigsten Kontroll- und Stimulationswerte bei den Wildtypherzen gefunden und die höchsten bei den Knock-outs. Die Werte der heterozygoten Tiere befanden sich zwischen beiden Vergleichsgruppen. Die Kontraktionsgeschwindigkeit wies signifikante Unterschiede zwischen Knock-outs und Wildtyp-Herzen auf (Kontroll- und Stimulationswerte), sowie für die Kontrollwerte zwischen Homozygoten und Heterozygoten, als auch im Vergleich der Werte für Kontrolle und Stimulation der Heterozygoten. Die Relaxationsgeschwindigkeit zeigte Unterschiede für Kontroll- und Stimulationswerte zwischen den Knock-outs und den Wildtyp-Herzen, den Kontrollwerten zwischen den Knock-outs und den Heterozygoten, außerdem zwischen den Kontroll- und Stimulationswerten innerhalb der heterozygoten Gruppe (siehe Abb. 7). In die Versuche wurden nur Herzen einbezogen, deren Schlagfrequenz der angelegten Reizfrequenz gefolgt sind. Auffällig war, dass die Herzen der Knock-out und der heterozygoten Tiere häufig Arrhythmien zeigten, nicht jedoch die Wildtyp-Herzen. Sowohl unter basalen, als auch unter β -adrenerger Stimulation wurden Rhythmusstörungen beobachtet (ohne Abbildung).

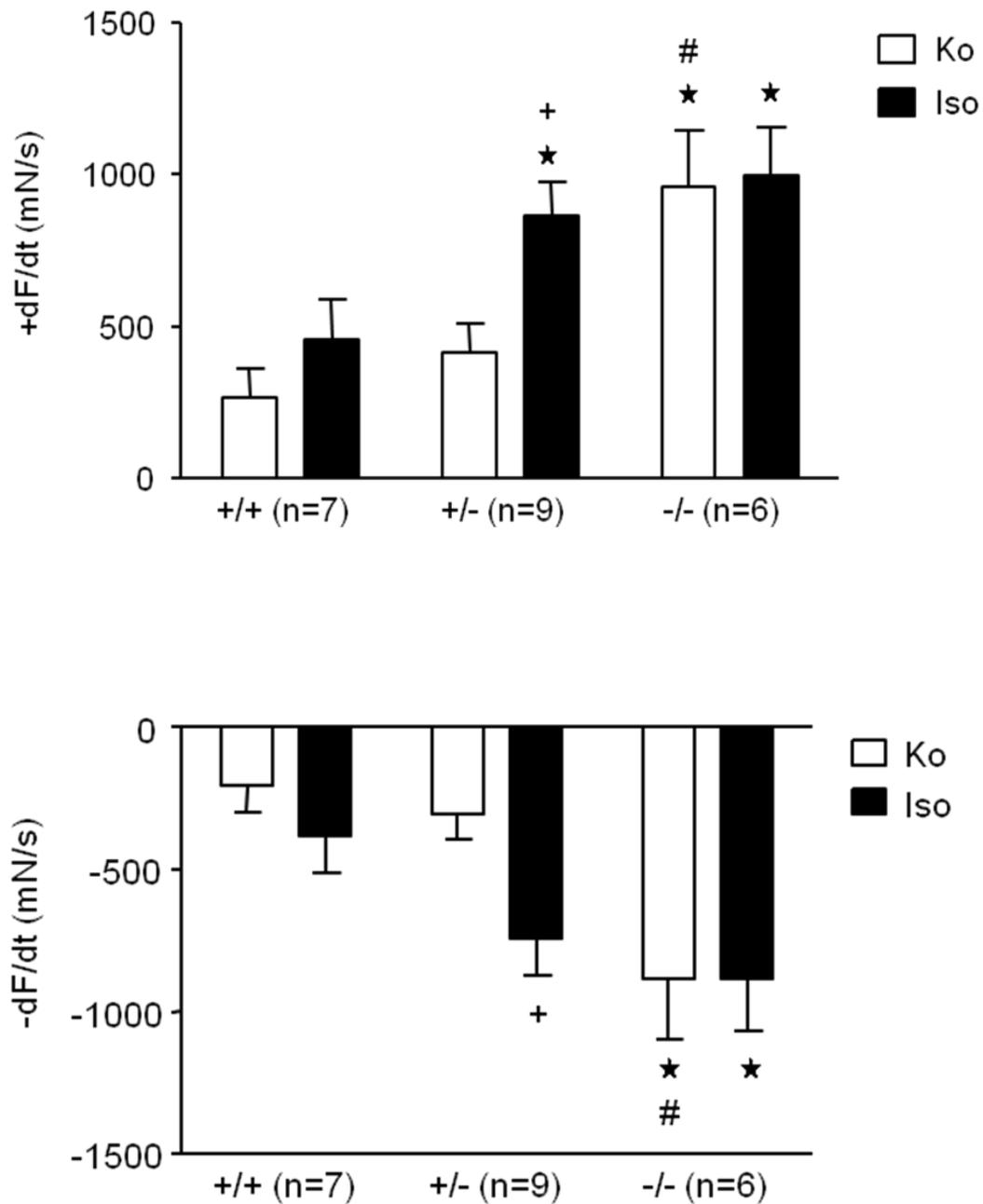


Abbildung 7: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Isoprenalin-Gabe

Dargestellt ist die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (+/-dF/dt; mN/s) vor (Ko) und nach Isoprenalin-Gabe (Iso; 1 μ M) der Gruppe 1 Herzen.
 * p < 0,05 vs. +/+; # p < 0,05 vs. +/-; + p < 0,05 vs. Ko

4.2.2. Langendorff-Versuchsreihe 2

Die zweite Versuchsreihe wurde mit intakten Herzen, das heißt mit erhaltenen rechten Vorhöfen durchgeführt, weshalb die Sinusknoten in der Lage waren spontan zu schlagen. Die Herzen wurden zunächst mit Coffein (10 mM) behandelt und nach einer Auswaschphase mit Tyrodelösung zweimal mit Isoprenalin (1 μ M) stimuliert. Es wurden die gleichen Parameter, wie auch schon in der ersten Versuchsreihe erhoben. Kontraktionskraft und Kontraktions- als auch Relaxationsgeschwindigkeit, zeigten die höchsten Werte bei den homozygoten Herzen, nach Coffein-Gabe. Die Kraft war für Kontroll- und Stimulationswerte zwischen den Wildtyp-Hezen und den Knock-outs signifikant verschieden. Die Knock-out Herzen zeigten einen sehr geringen Coffein-Effekt im Gegensatz zu den Wildtyp Herzen (siehe Abb.8).

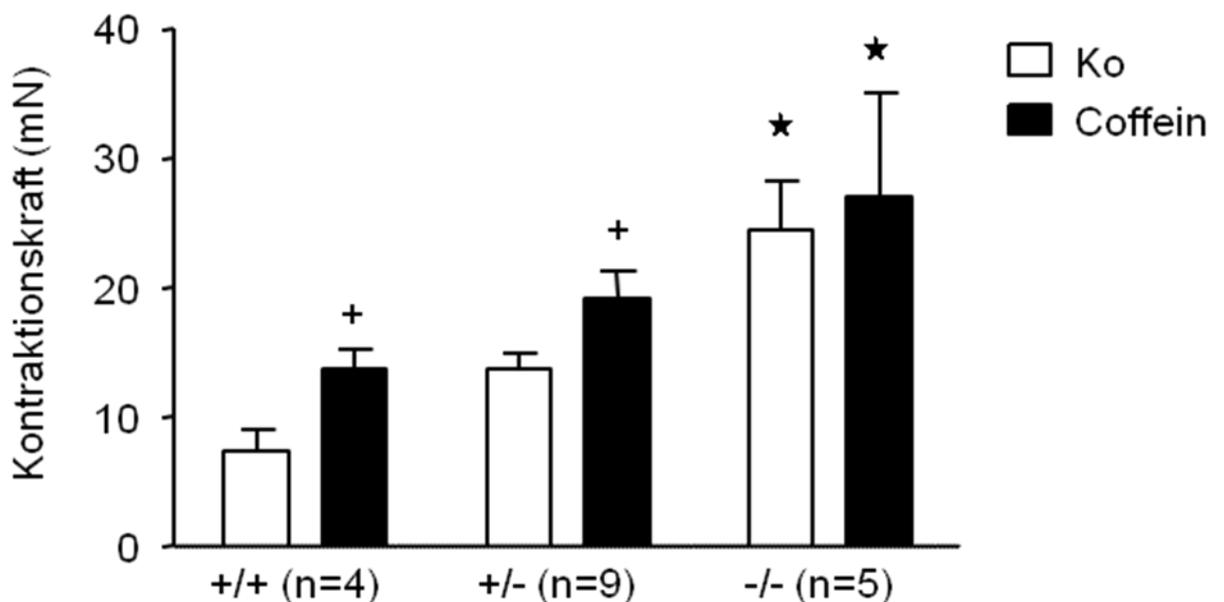


Abbildung 8: Kontraktionskraft nach Coffein-Gabe

Abgebildet ist die Auswertung der Kontraktionskraft (mN) vor (Ko) und nach Coffein-Gabe (Coffein; 10 mM) der Gruppe 2 Proben. Bei diesen Herzen wurde der rechte Vorhof belassen. Es erfolgte die Einspannung in die Langendorff-Apparatur und, nach einer Äquilibrationsphase, die Gabe von Coffein. Eine externe Reizung wurde nicht durchgeführt. * $p < 0,05$ vs. +/+; + $p < 0,05$ vs. Ko

Für die Kontraktionsgeschwindigkeit fanden sich erhöhte Kontrollwerte der homozygoten Herzen, gegenüber denen, der heterozygoten und Wildtyp-Herzen. Unterschiede in der Relaxationsgeschwindigkeit gab es zwischen den einzelnen Gruppen nicht (siehe Abb. 9).

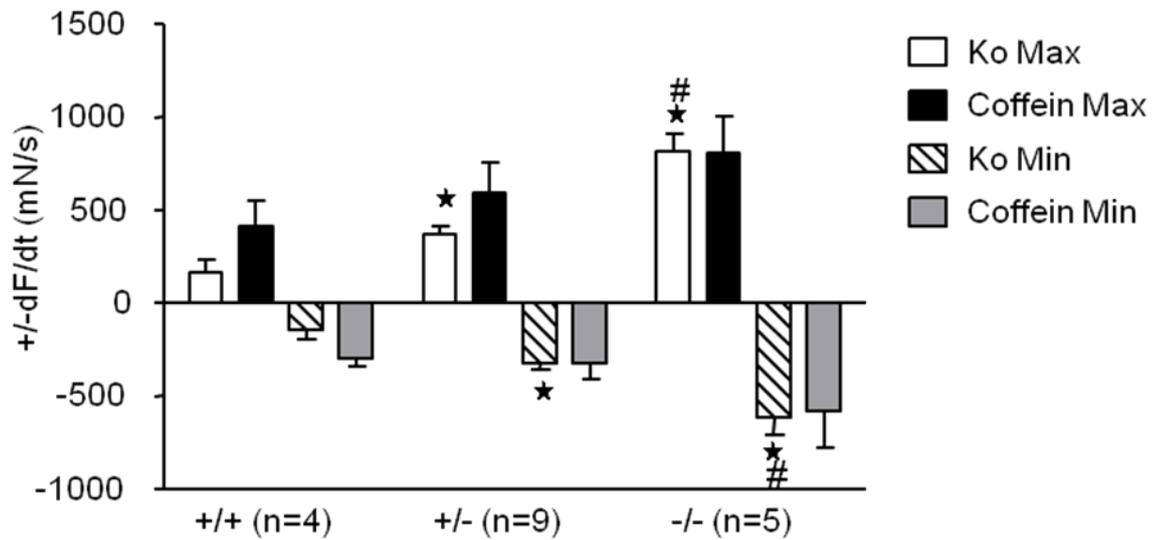


Abbildung 9: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Coffein-Gabe

Bei erhaltenem rechten Vorhof ist hier die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (\pm -dF/dt; mN/s) vor (Ko Max/Ko Min) nach Coffein-Gabe (Coffein Max/Coffein Min; 10 mM) dargestellt. * $p < 0,05$ vs. +/+; # $p < 0,05$ vs. +/-

Die Basalwerte der Frequenz lagen für alle Genotypen bei ca. 4 Hz. Nach Stimulation zeigten die Wildtyp-Herzen einen Anstieg gegenüber der Kontrolle. Die beiden anderen Gruppen reagierten schwächer, wohingegen bei den Knock-outs kein Effekt nachweisbar war und hier die niedrigsten Werte gemessen wurden (siehe Abb. 10).

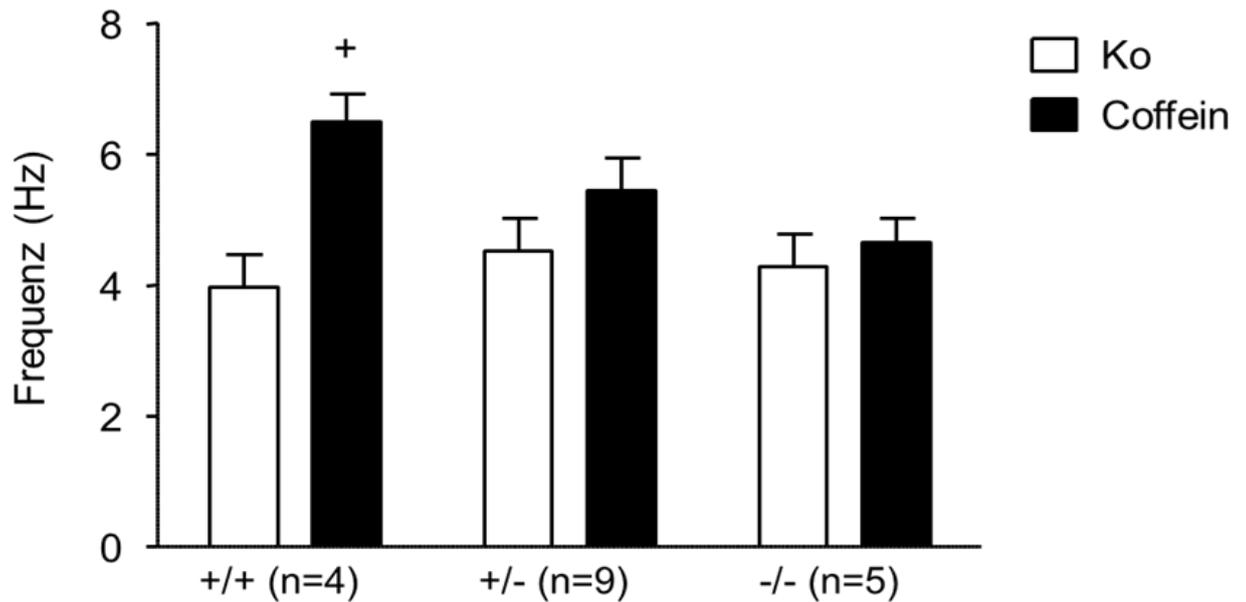


Abbildung 10: Frequenz nach Coffein-Gabe

Frequenzen (Hz) der Gruppe 2 Proben, vor (Ko) und nach Coffein-Gabe (Coffein; 10 mM), werden hier verglichen. Die Herzen schlugen mit Eigenfrequenz, bei erhaltenem Sinusknoten. + $p < 0,05$ vs. Ko

Nach Auswaschen des Coffeins erfolgte die erste Isoprenalin-Gabe ($1 \mu\text{M}$). Ähnlich den vorangegangenen Experimenten waren auch hier die Basalwerte für Kontraktionskraft (siehe Abb. 11) und Kontraktions-, als auch Relaxationsgeschwindigkeit (siehe Abb. 12), bei den Knock-out Herzen am größten, sowie am niedrigsten bei der Frequenz (siehe Abb. 13), verglichen mit den anderen Genotypen. Kraft und Frequenz waren nach Isoprenalin-Stimulation, jeweils erhöht gegenüber der Kontrolle bei Wildtyp-Hezen und Heterozygoten. Die homozygote Gruppe zeigte nur schwache Effekte.

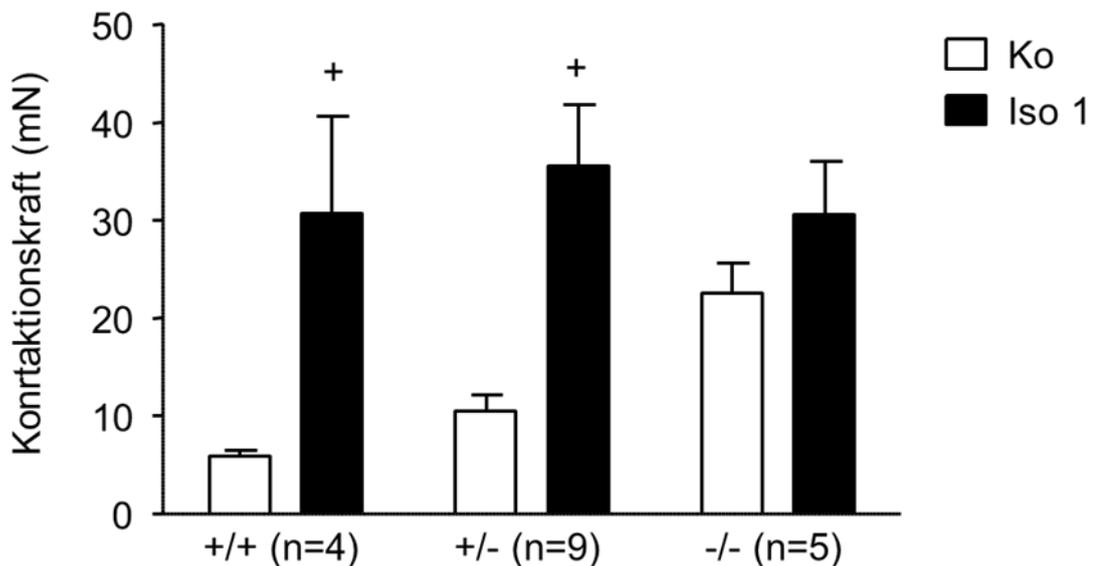


Abbildung 11: Kontraktionskraft nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe

Es erfolgte das Auswaschen der Gruppe 2 Herzen, welche zuvor mit Coffein behandelt wurden. Nach diesem Vorgang wurde Isoprenalin ($1 \mu\text{M}$) zugegeben. Dargestellt ist die Kontraktionskraft (mN) vor (Ko) und nach Isoprenalin-Gabe (Iso 1), der spontan schlagenden Herzen. + $p < 0,05$ vs. Ko

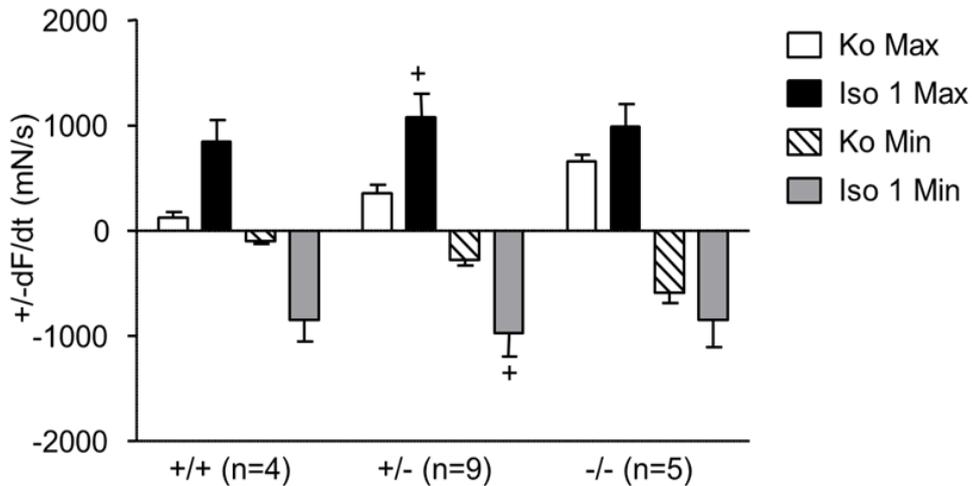


Abbildung 12: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe

Abgebildet ist die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (+/-dF/dt; mN/s) vor (Ko Max/Ko Min) und nach (Iso 1 Max/Iso 1 Min) Gabe von Isoprenalin (1 μ M). Vor Isoprenalin-Gabe wurde das Coffein aus den Herzen der Gruppe 2 ausgewaschen. + p < 0,05 vs. Ko

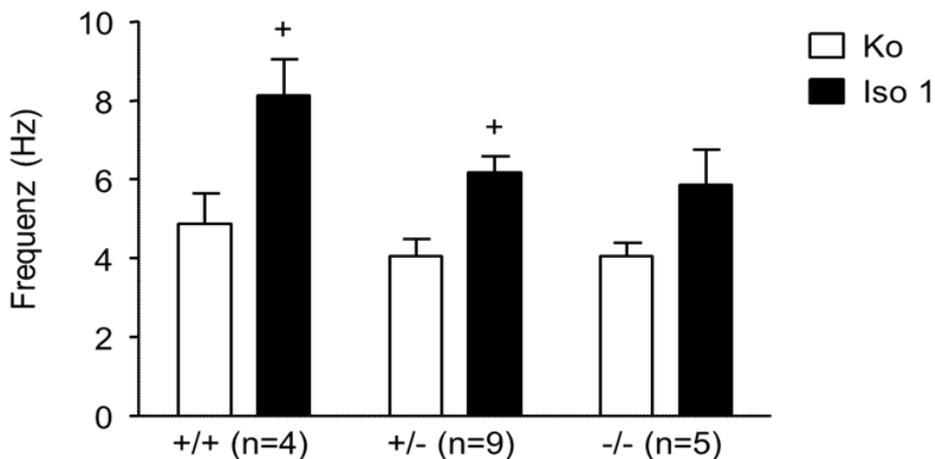


Abbildung 13: Frequenzaufzeichnung nach Auswaschen von Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe

Es erfolgte die Auswertung der Herzfrequenz (Hz) vor (Ko) und nach Isoprenalin (Iso 1) Stimulation (1 μ M). Vor Isoprenalin-Gabe wurde das Coffein ausgewaschen. + p < 0,05 vs. Ko

Erneut wurden die Präparate ausgewaschen und mit Isoprenalin (1 μM) behandelt. Hier wiesen die homozygoten Herzen bei allen Parametern die höchsten Werte und die geringsten Effekte, auf (siehe Abb. 14; Abb. 15; Abb. 16). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erhoben werden.

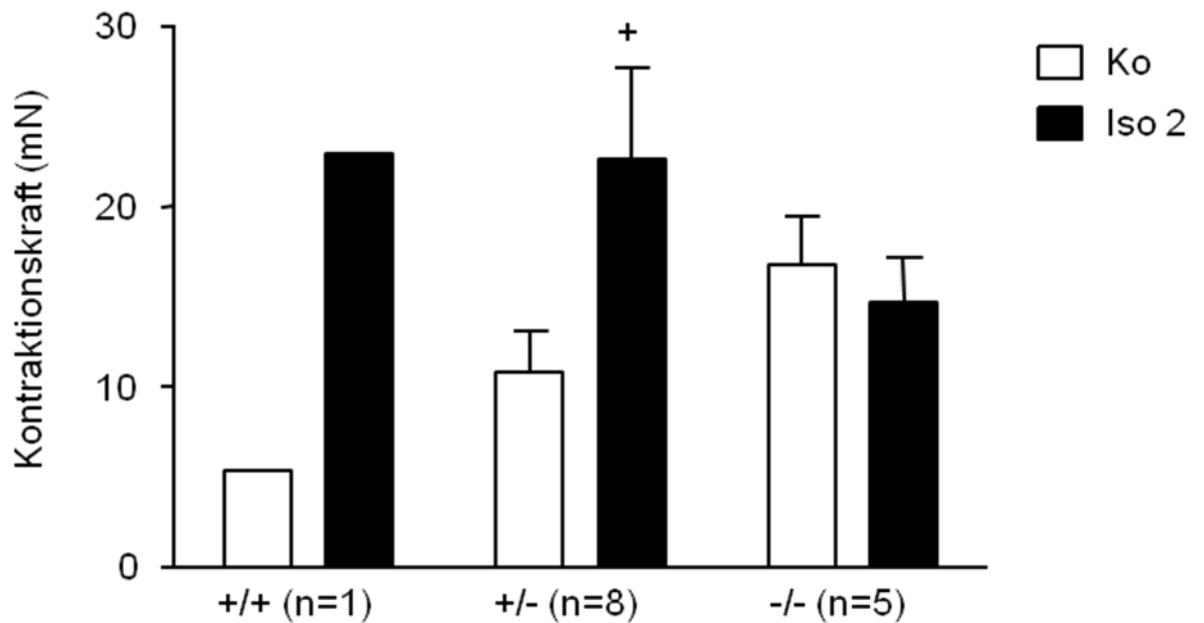


Abbildung 14: Kontraktionskraft nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe

Die Präparate, welche mit Coffein und einer ersten Isoprenalin-Gabe behandelt worden waren, wurden erneut gespült und das Isoprenalin (Iso 1) ausgewaschen. Nach diesem Vorgang erfolgte die zweite Gabe von Isoprenalin (1 μM). Dargestellt ist hier die Kontraktionskraft (mN) vor (Ko) und nach (Iso 2) der zweiten Exposition. + $p < 0,05$ vs. Ko

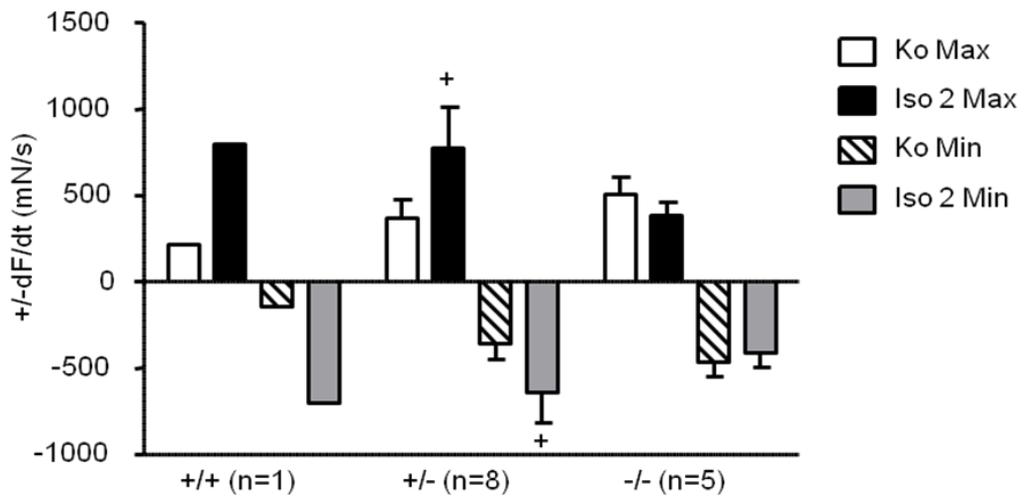


Abbildung 15: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe

Dargestellt ist die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (+/-dF/dt; mN/s) der Herzen der Gruppe 2, nach Auswaschen von Isoprenalin (Iso 1) und wiederholter Isoprenalin-Gabe (1 μ M). Die Werte wurden vor (Ko Max/Ko Min) und nach (Iso 2 Max/Iso 2 Min) der zweiten Gabe erhoben. + p < 0,05 vs. Ko

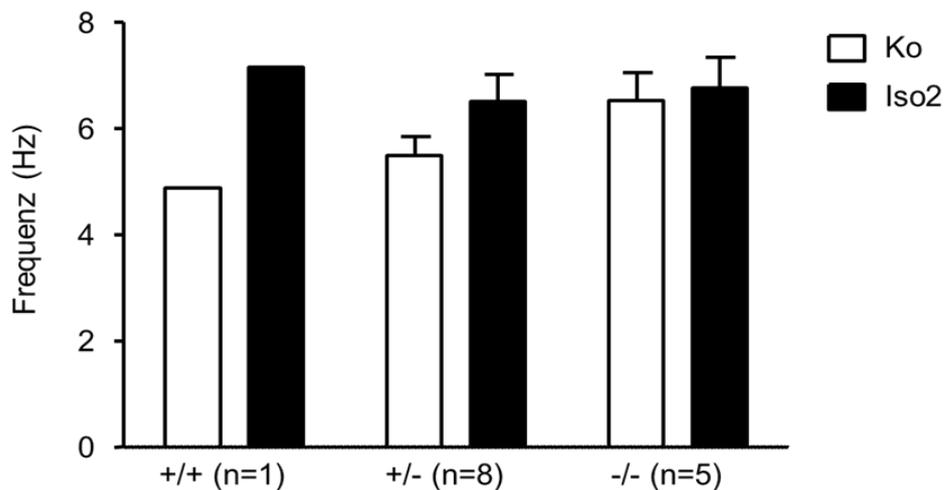


Abbildung 16: Frequenzzeichnung nach Auswaschen von Isoprenalin- und zweiter Isoprenalin-Gabe

Da der rechte Vorhof weiterhin belassen wurde, schlugen die Herzen nach zweiter Isoprenalin-Gabe (1 μ M) auch mit ihrer Eigenfrequenz. Abgebildet ist die Herzfrequenz (Hz) vor (Ko) und nach (Iso 2) zweiter Isoprenalin-Gabe.

Für die zweite Isoprenalin-Gabe konnten nicht alle Herzen ausgewertet werden, da diese nach Coffein- und erster Isoprenalin-Gabe nicht mehr reagierten (Anzahl Coffein-/ erste Isoprenalin-Gabe: +/+ :4, +/- : 9, -/- : 5; Anzahl zweite Isoprenalin-Gabe +/+ : 1, +/- : 8, -/- : 5). Zu erwähnen ist auch, dass sich unregelmäßig episodische Arrhythmien während der Aufzeichnung der Daten, bei der homozygoten und heterozygoten Gruppe, sowohl vor als auch nach inotroper Stimulation, zeigten (siehe Abb. 17). In der Wildtypgruppe konnten keine Arrhythmien detektiert werden.

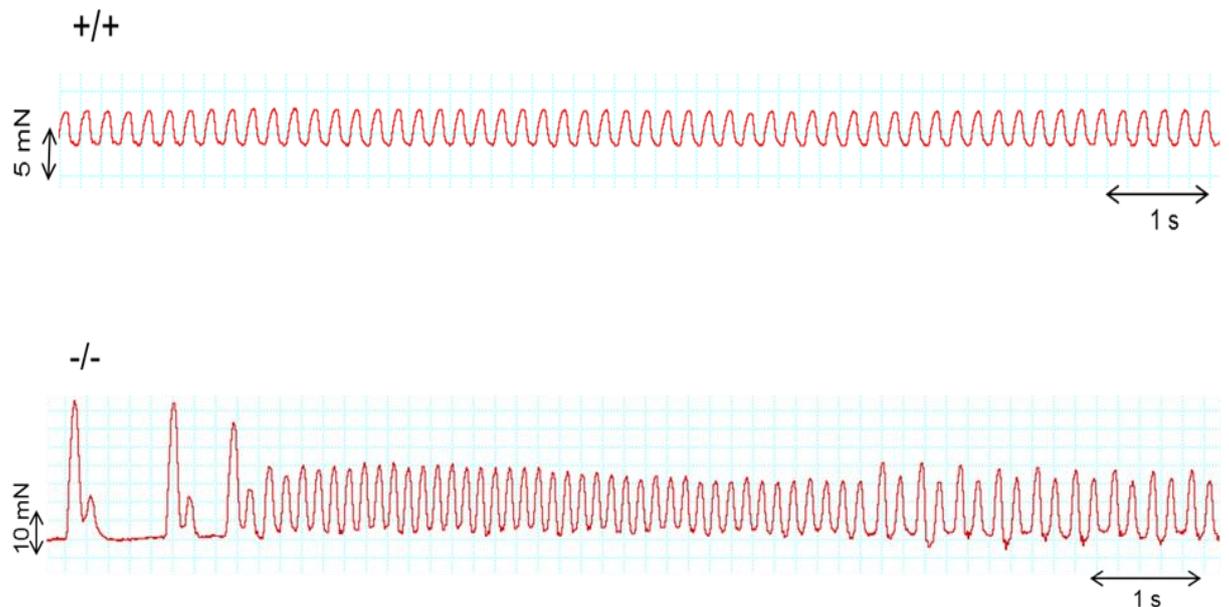


Abbildung 17: Kontraktilität von spontan schlagenden Herzen der Wildtyp- und Knock-out Gruppen unter basalen Bedingungen

Dargestellt sind Rhythmusstörungen der -/- Tiere, welche sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter inotroper Stimulation durch Isoprenalin und Coffein, auftraten. Tiere der +/+ Gruppe zeigten keine Rhythmusstörungen. Beispielhaft werden Aufnahmen von Langendorff-Versuchen der +/+ und -/- Herzen unter Ruhebedingungen gezeigt.

4.3. Herzfunktion in vivo

Zur in vivo Untersuchung wurde bei narkotisierten Mäusen eine Echokardiografie durchgeführt (siehe 3.3.2.). Als Kontraktilitätsparameter wurden Ejektionsfraktion und Herzfrequenz für alle 3 Genotypen bestimmt. Es wurden Basalwerte und jene nach β -adrenerger Stimulation (Isoprenalin 1 μ M) erhoben. Dabei ergaben sich keine Veränderungen zwischen, jedoch innerhalb der einzelnen Gruppen, nach entsprechender Erregung (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Vergleich der Genotypen bezüglich Herzfrequenz und Ejektionsfraktion vor und nach Isoprenalin-Injektion

Gezeigt werden die echokardiografisch ermittelte Herzfrequenz und Ejektionsfraktion, vor und nach Isoprenalin-Injektion (100 μ l; Konzentration: 10 mM; i.p. Applikation). Verwendet wurden lebende, narkotisierte (Isofluran) Mäuse aller Genotypen. + p < 0,05 vs. vor Isoprenalin-Injektion

Genotyp (n)	Vor Isoprenalin-Injektion		Nach Isoprenalin-Injektion	
	Herzfrequenz (bpm)	Ejektionsfraktion (%)	Herzfrequenz (bpm)	Ejektionsfraktion (%)
+/+ (8)	290 \pm 46,06	78,0 \pm 4,05	468 \pm 35,55 ⁺	98,6 \pm 0,24 ⁺
+/- (12)	406 \pm 37,09	71,1 \pm 4,01	550 \pm 26,69 ⁺	96,1 \pm 1,28 ⁺
-/- (5)	244 \pm 75,95	74,0 \pm 1,95	473 \pm 33,51 ⁺	97,2 \pm 1,39 ⁺

4.4. Biochemische Untersuchungen

4.4.1. Genotypisierung und histologische Untersuchung

Zur Identifizierung von CSQ2 Knock-out Tieren, wurde eine Genotypisierung mittels PCR durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien isoliert (siehe 3.4.1.). Nach der DNA Isolation erfolgte zunächst eine Qualitätsbestimmung der DNA, welche bei allen Proben auf einen hohen Reinheitswert (A260/A280 entspricht 1,8-2,0) schließen ließ.

Daran wurde die PCR angeschlossen (siehe 9.3.; Tab. 5) und die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente, was die einzelnen Genotypen unterscheidbar machte (siehe 3.4.2.; Abb. 18). Durch die Deletion des Exon1 erhält man bei der Genotypisierung ein verkleinertes PCR-Produkt für das Knock-out Allel. Die heterozygoten Tiere zeigten beide PCR-Produkte, wohingegen die Wildtyp Mäuse nur das lange (1,2 kb) und die homozygoten Mäuse nur das kurze (0,93 kb) PCR-Produkt ergaben. Somit konnten die Tiere den entsprechenden Gruppen zugeordnet werden.

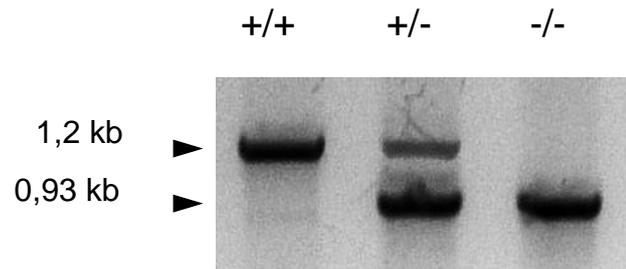


Abbildung 18: Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte zur Genotypisierung

Dargestellt sind die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte. Durch Deletion des Exon1 erhält man ein verkleinertes PCR-Produkt für das Knock-out Allel $-/-$ (0,93 kb). Die Wildtyp $+/+$ Mäuse enthalten nur das ungekürzte, lange Allel (1,2 kb). Heterozygote $+/-$ Herzen enthalten beide Sequenzen.

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnten keine Unterschiede der genetisch veränderten Tiere, im Vergleich zu den Wildtyp-Proben, nachgewiesen werden (siehe 3.6.; Abb. 19).

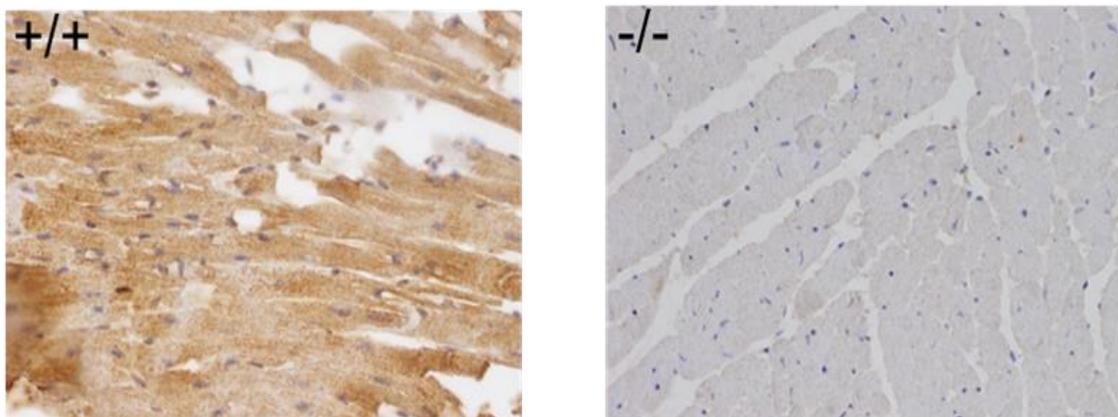


Abbildung 19: Immunhistologische Färbung von Wildtyp- und Knock-out Proben

Abgebildet sind 2 histologische Schnitte durch Herzmuskelgewebe unterschiedlicher Genotypen ($+/+$; $-/-$). Beide wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. CSQ2 erscheint braun im $+/+$ Gewebe. In der $-/-$ Probe konnte kein CSQ2 nachgewiesen werden.

4.4.2. Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher Masse (siehe 3.5.3.; 3.5.4.). Um die Unterschiede in der Herzfunktion erklären zu können, wurde die Expression von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen, wie CSQ, SERCA und Phospholamban untersucht. Um den linearen Messbereich zu finden, wurde zunächst eine Proteinabhängigkeit der Herzproben durchgeführt (siehe Abb. 20). Des Weiteren wurden erhitzte (95°C , 10 Minuten) und nicht erhitzte (Raumtemperatur) Proben verwendet, um die Phospholamban-Bande eindeutig zu identifizieren. Phospholamban bildet unter nativen Bedingungen Pentamere mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Nach Erhitzen der Proben in Gegenwart von SDS zerfallen diese in die Monomere von ca. 6 kDa (siehe Abb. 21). Infolge besserer Bandenschärfe wurde grundsätzlich mit erhitzten Proben ($100\ \mu\text{g}/\text{Spur}$) weiter gearbeitet. Zunächst wurden Herz/Wade-Mischungen hergestellt, um die beiden Isoformen des CSQs (1/2) zu detektieren (siehe Abb. 22). Im Herzmuskel konnte nur CSQ2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 23), wohingegen der Wadenmuskel (*Musculus gastrocnemius*) sowohl CSQ1, als auch CSQ2 exprimiert (siehe Abb. 24). CSQ2 konnte in beiden Geweben bei den homozygoten Tieren nicht detektiert werden und zeigte eine geringere Ausprägung in den heterozygoten Proben, im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen (siehe Abb. 23; Abb. 24).

CSQ1 zeigte keine Veränderung der Expression auf Proteinebene, zwischen den verschiedenen Genotypen. Außerdem wurde Ösophagusgewebe untersucht, welches auch beide Isoformen des CSQ exprimiert. Da hier jedoch nur ein deutlich schwächeres Signal detektiert werden konnte, im Vergleich zu den Wadenproben, wurde für weitere Analysen Wadengewebe dem des Ösophagus vorgezogen (siehe Abb. 26). Im Folgenden wurden Herz/Oberschenkel-Mischungen untersucht. In der Oberschenkelmuskulatur konnte nur CSQ1 nachgewiesen werden. Phospholamban konnte in Waden- Oberschenkel- und Ösophagusgewebe nicht festgestellt werden. SERCA konnte in allen Geweben nachgewiesen werden.

Eine quantitative Auswertung, der oben genannten Proteine, erfolgte nur für die Herzproben (siehe 3.5.5.). Phospholamban diente als Bezugsgröße für CSQ2 und SERCA, da dieses, in allen Genotypen, einen nahezu konstanten Wert aufwies. SERCA zeigte einen Anstieg in homozygoten und heterozygoten Mauserzen, verglichen mit denen der Wildtyp-Proben. CSQ2 konnte im Knock-out-Gewebe nicht nachgewiesen werden. Zwischen heterozygoten und homozygoten Proben konnte kein Unterschied für CSQ2 festgestellt werden (siehe Abb. 25).

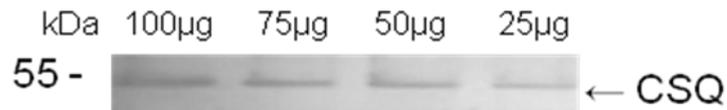


Abbildung 20: Proteinabhängigkeit der Herzproben zur Darstellung von CSQ

Verdeutlicht wird der Banden-Schwärzungsgrad bei Auftragung von unterschiedlichen Proteinmengen auf ein 10% Polyacrylamidgel (100 µg/Spur, 75 µg/Spur, 50 µg/Spur, 25 µg/Spur). Dargestellt ist das Protein Calsequestrin (CSQ) einer +/+ Herzprobe, welches bei 55 kDa detektiert werden kann. Es wurde eine NBT/BCIP Färbung verwendet.

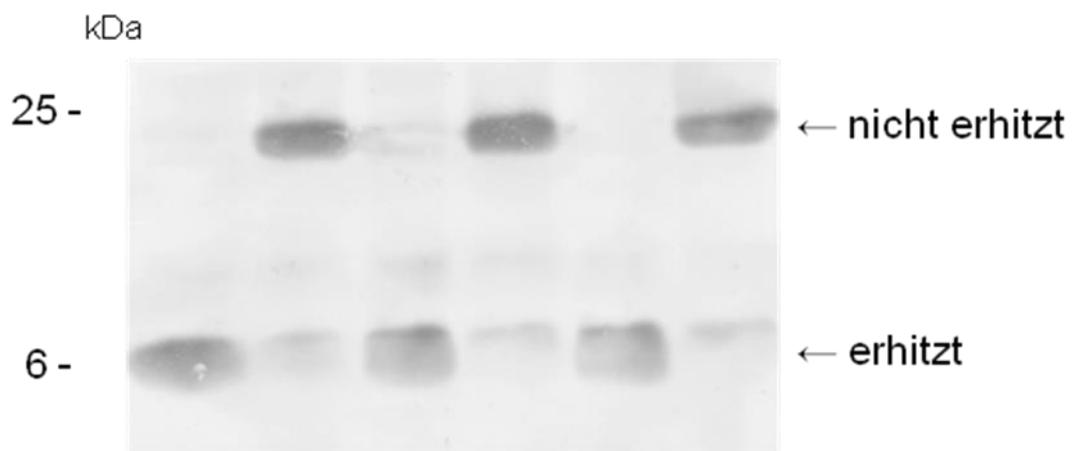


Abbildung 21: Detektierung von PLB bei erhitzten und nicht erhitzten Herzproben

Zur Identifikation von Phospholamban (PLB) wurden erhitzte und nicht erhitzte +/+ Herzproben (100 µg/Spur) verwendet. Abgebildet werden PLB-Banden unter beiden Bedingungen bei NBT/BCIP Färbung. Nicht erhitzt lässt sich das Pentamer bei 19-25 kDa nachweisen, erhitzt zerfällt es in Monomere welche < 12 kDa erkennbar sind. Alle weiteren Experimente wurden mit erhitzten Proben durchgeführt.

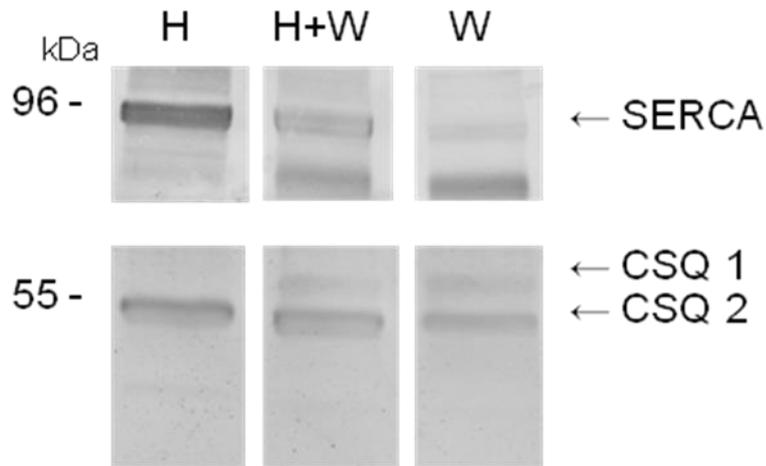


Abbildung 22: Nachweise von SERCA, CSQ1/2 unter Verwendung von Herz- und Wadenproben

Da im Wadenmuskelgewebe (M. gastrocnemius) beide Isoformen des Calsequestrins (CSQ1/2) exprimiert werden, erfolgte die Darstellung dieses Gewebes im Vergleich zu Herzgewebe $+/+$ und einer Herz/Wade-Mischung $+/+$, zur besseren Identifikation der einzelnen Isoformen. Nachweisbar sind hier sowohl SERCA (96 kDa), als auch CSQ1 (ca. 57 kDa) und CSQ2 (55 kDa). Die Elektrophoresezeit wurde auf ca. 280 Minuten verlängert, um eine bessere Auftrennung der Banden zu erreichen. Verwendet wurde eine NBT/BCIP Färbung. H, Herz 80 $\mu\text{g}/\text{Spur}$; H+W, Herz+Wade 80/100 $\mu\text{g}/\text{Spur}$; W, Wade 100 $\mu\text{g}/\text{Spur}$

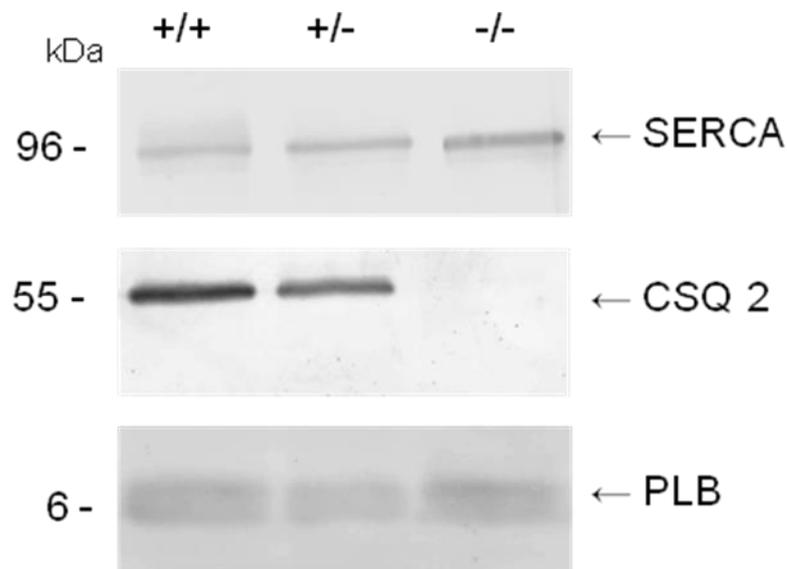


Abbildung 23: Darstellung von SERCA, CSQ und PLB bei erhitzten Herzproben

Abgebildet ist ein Western Blot auf dem SERCA, CSQ2 und PLB als repräsentatives Beispiel, der zur quantitativen Auswertung genutzten Herzproben (100 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) gezeigt sind. Es wurden alle Genotypen untersucht ($+/+$, $+/-$, $-/-$). Dargestellt wird die NBT/BCIP Färbung.

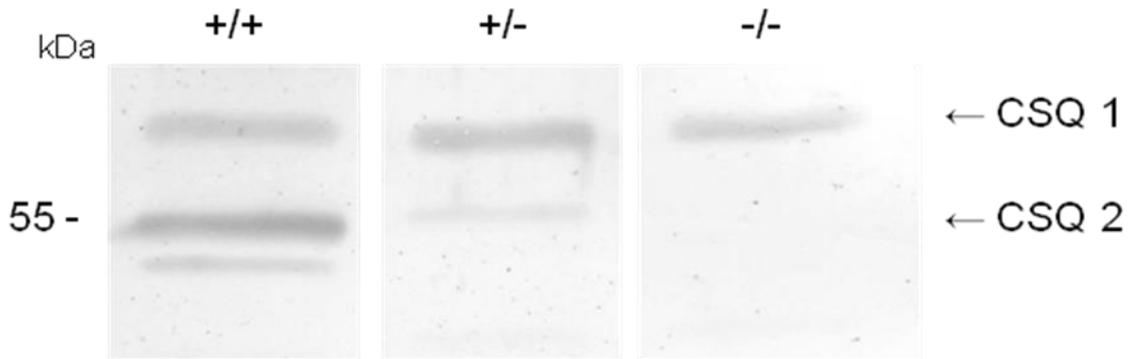


Abbildung 24: Identifizierung von CSQ1/2 des Wadenmuskels

Um den konstitutiven CSQ2 Knock-out bestätigen zu können, wurde Gewebe untersucht, welches beide Isoformen von Calsequestrin exprimiert. Gezeigt werden die verschiedenen Genotypen des Wadenmuskeltgewebes (*M. gastrocnemius* +/+, +/-, -/- 100 µg/Spur). In der NBT/BCIP Färbung lassen sich beide Isoformen klar unterscheiden (CSQ1 ca. 57 kDa, CSQ2 55 kDa). Die Laufzeit der Elektrophorese wurde auf etwa 280 Minuten erhöht.

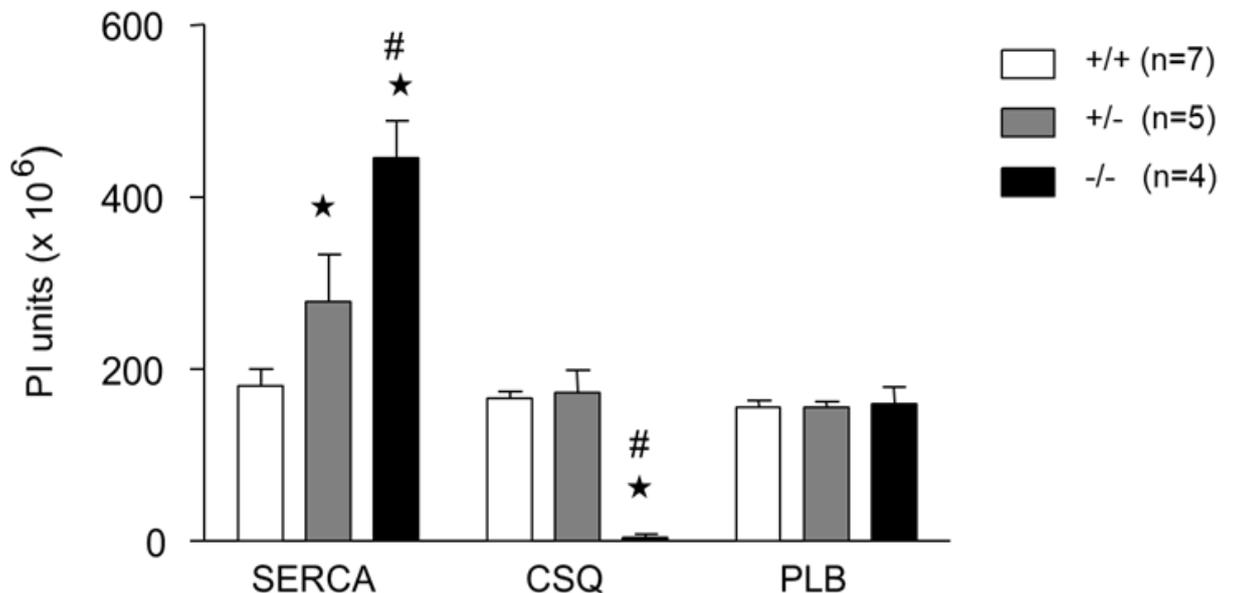


Abbildung 25: Quantitative Auswertung von SERCA, CSQ und PLB der Herzproben

Die quantitative Auswertung der Protein-Expression von SERCA, CSQ und PLB erfolgte nach Zugabe von ECF-Substrat-Lösung mit der ImageQuant-Software (PI units x 10⁶). Als Bezugsgröße diente PLB, da es in allen Gruppen gleich stark exprimiert wurde. * p < 0,05 vs. +/+; # p < 0,05 vs. +/-

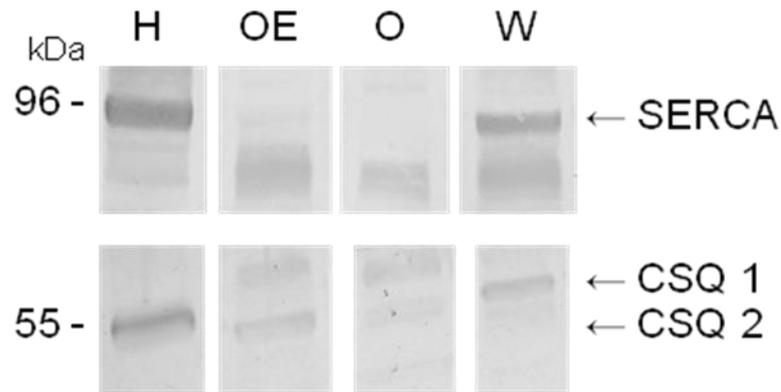


Abbildung 26: Darstellung von SERCA und CSQ1/2 aller verwendeten Gewebearten

Abgebildet sind, für jeweils alle untersuchten Gewebetypen, die Western Blot der Proteine SERCA und CSQ. Hier dargestellt sind Proben von +/+ Geweben in NBT/BCIP Färbung. Da bei Ösophagus- und Oberschenkelproben, trotz hoher aufgetragener Konzentration, nur ein schwaches Signal detektiert werden konnte, wurde für alle Experimente bezüglich CSQ1 Wadengewebe genutzt. H, Herz 80 µg/Spur; OE, Ösophagus 200 µg/Spur; O, Oberschenkel, 200 µg/Spur; W, Wade 200 µg/Spur

4.4.3. Stains All

Durch die Färbung von Gelen mit „Stains All“ ist es möglich Ca^{2+} -bindende Proteine dunkelblau-violett, andere Proteine rot und Lipide gelb-orange zu färben (Campbell et al., 1983). Zunächst wurden Gele hergestellt, auf denen nur Herzproben von Wildtyp-Proben, Heterozygoten, Homozygoten und, für Vergleichszwecke, eine Probe eines CSQ-Überexprimierers aufgetragen wurden (siehe 3.5.6.). Die Proben aus dem Herzen der CSQ-überexprimierenden Maus zeigte bei 55 kDa ein sehr starkes Signal. Auch im Wildtyp war diese Bande erkennbar, hingegen bei dem Knock-out nicht. Im nächsten Schritt wurde die Knock-out Probe mit der des Überexprimierers gemischt. Auf dem Gel wurde links davon eine homozygote Probe und rechts die des Überexprimierers aufgetragen. Bei letztgenannten und der Mischung sind starke Banden erkennbar, welche beim Knock-out fehlen (siehe Abb. 27). Die unterschiedlichen Farben der Gele kamen durch abweichende Belichtungszeiten zu Stande.

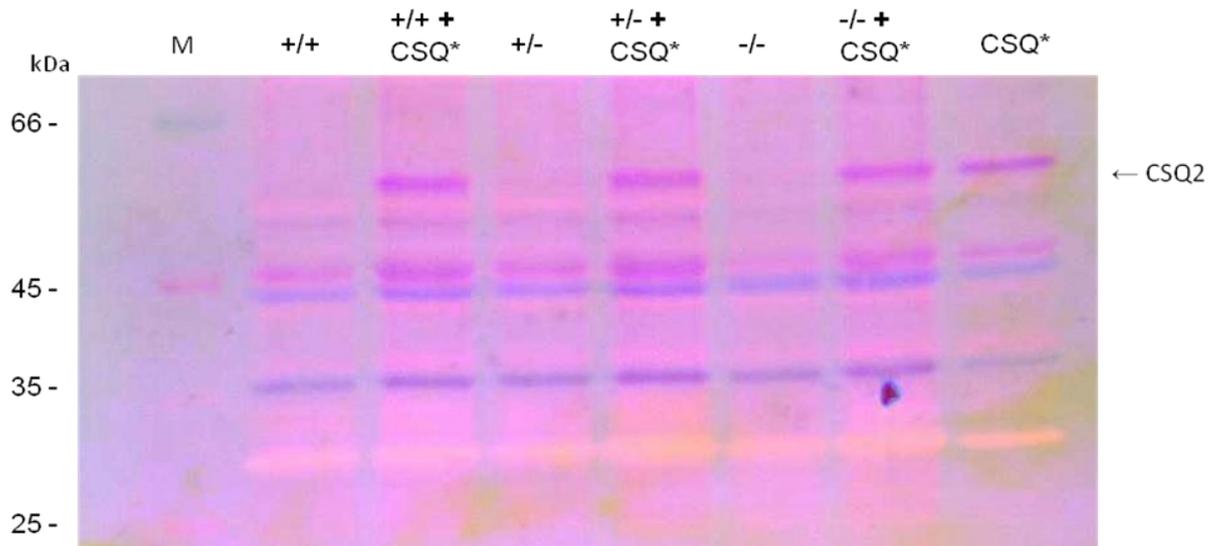


Abbildung 27: Stains All-Färbung eines Geles

Exemplarisch ist ein mit Stains All gefärbtes Polyacrylamidgel 10% abgebildet. Es sind jeweils die einzelnen Genotypen (+/+, +/-, -/-) aufgetragen. Daneben finden sich die Mischungen mit dem Extrakt aus dem Herzen einer CSQ2-überexprimierenden transgenen Maus (+/+ + CSQ*, +/- + CSQ*, -/- + CSQ*) und letztgenannter allein. Ca²⁺-bindende Proteine werden durch eine dunkelblau-violette Färbung erkenntlich gemacht. M, Marker; CSQ*, CSQ-Überexprimierer 100 µg/Spur; +/+, +/-, -/- 150 µg/Spur; +/+ + CSQ*, +/- + CSQ*, -/- + CSQ* 200 µg/Spur

5. Diskussion

Mutationen im kardialen Calsequestrin-Gen des Menschen konnten mit CPVT in Verbindung gebracht werden (Faggioni et al., 2011; Faggioni et al., 2012). Die Wirkungsweise, die molekularen Aufgaben und der Einfluss des intakten und mutierten Proteins auf den Herzzyklus wurden schon vielfach untersucht (Knollmann et al., 2006; Song et al., 2007; Seidman et al., 2007; Übersicht bei: Faggioni und Knollmann, 2012). Vergleichend werden hier Gemeinsamkeiten und Unterschiede der eigenen Ergebnisse mit den bereits vorhandenen dargelegt. Außerdem werden die Resultate dieser Arbeit erörtert und interpretiert, um das Verständnis der Calsequestrin-Funktion im Herzen zu verbessern.

5.1. Diskussion des Genkonstrukts und der Methoden

Es erfolgte der Knock-out des Exon1 und gleichzeitig die Insertion von Stop-Codons (Gergs et al., 2010; Neumann et al., 2010; siehe Abb. 2). Dieses ist ein neues Modell, welches sich von den bisherigen unterscheidet. Im Vorfeld wurden schon Versuche mit Deletionen des Exon1 und des CSQ2 Promotors (Knollmann et al., 2006) sowie der Deletion des Exon9 (Song et al., 2007), durchgeführt. Alle publizierten Targeting-Konstrukte führten letztendlich dazu, dass CSQ2 nicht mehr exprimiert wurde. Durch Western-Blot-Verfahren konnte dies nachgewiesen werden. Dennoch sei erwähnt, dass einige Unterschiede zwischen den hier präsentierten Ergebnissen und denen, von z.B. Knollmann et al. 2006, eventuell auf die verschiedenen Genkonstrukte zurückzuführen sind.

Die physiologischen Experimente wurden an intakten Maus Herzen durchgeführt und nicht an isolierten Herzvorhöfen. Es lassen sich deshalb hier Aussagen über die Ventrikelfunktion und nicht über die Vorhöfe treffen. Denkbar ist ein unterschiedliches Verhalten des Organs bzw. des Teilorgans, auf spezielle Reize. Aufgrund der geringeren Ausbildung des SR im Vorhof, als im Ventrikel, ist die Ca^{2+} -Homöostase unterschiedlich reguliert. Die ventrikuläre Funktion wird stärker vom SR beeinflusst und ist daher aussagekräftiger, für Untersuchungen der Ca^{2+} -Homöostase (Urthaler et al., 1975; Hatem et al., 1997).

Da bei einigen Versuchen der Sinusknoten belassen wurde, konnte hier die Eigenfrequenz des Herzens beurteilt werden. Für andere Versuche wurde der Sinusknoten entfernt und eine elektrische Reizung durchgeführt, um die Herzfrequenz zu kontrollieren (siehe 3.2.2.).

Möglicherweise kam es bei einigen Präparationen durch die Entfernung des rechten Vorhofes und somit des Sinusknotens zu Rhythmusstörungen, wie Bradykardien, Tachykardien oder Arrhythmien, die, trotz optimaler Versuchsbedingungen, nicht vermeidbar waren. Dies muss bei der Analyse von Arrhythmien berücksichtigt werden.

5.2. Herzfunktion in vitro

5.2.1. *Entwicklung der Tiere*

Wie schon erwähnt, waren die Nachkommen der genetisch veränderten Tiere lebensfähig und fertil. Makroskopisch zeigte sich eine normale Herzmorphologie. Aus der Literatur ist Ähnliches bekannt (Knollmann et al., 2006). Song et al. hingegen beschrieben 2007 eine verkürzte Lebenserwartung der Versuchstiere, infolge einer milden kardialen Hypertrophie, die diese nach etwa 35 Wochen entwickelten. Knollmann et al. berichteten 2006 über eine Verdickung der linken Ventrikelwand. In unserer Versuchsreihe zeigte sich bei dem untersuchten Kollektiv weder eine Veränderung des relativen Herzgewichts, noch des relativen Lebergewichts (siehe 4.1.; Tab. 1/2/3). Eventuell konnten wir keine Hypertrophie des Myokards oder eine Herzinsuffizienz feststellen, da wir für unsere Versuche relativ junge Tiere verwendeten. Perspektivisch sind Untersuchungen in diese Richtung bei älteren Tieren geplant.

Wir fanden ein erhöhtes relatives Lungengewicht, der homozygoten im Vergleich zu den Wildtyp-Proben (siehe 4.1.; Tab. 1/2/3). Die Steigerung des relativen Lungengewichtes könnte ein Hinweis auf eine bisher unbekannt Funktion von CSQ2 in der Lunge sein, oder mit einem Kompensationsmechanismus in der fetalen Entwicklung der homozygoten Tiere zusammenhängen.

Beide Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bereits vorhandenen Daten. Das relative Herzgewicht der Knock-out Tiere wurde als erhöht und das relative Lungengewicht als unverändert gegenüber der heterozygoten und Wildtyp-Proben, beschrieben (Knollmann et al., 2006; Song et al., 2007). Die Daten sind nicht unbedingt vergleichbar, da sich das Alter der Tiere und das verwendete Knock-out Verfahren, zwischen diesen und den zitierten Arbeiten, unterscheidet.

5.2.2. Langendorff-Versuchsreihe 1

Zur Erhebung genauer Parameter der Kontraktilität und Funktion des Herzens führten wir Versuche am isolierten Herz durch. Um den kardialen Stress, den CPVT Patienten erfahren nachzuahmen, wurde Isoprenalin, ein unselektiver β -Adrenozeptoragonist, gegeben (siehe 3.2.2.).

Es wurde die Kraft-Frequenz-Beziehung der Herzen untersucht. Stimuliert man ein Maus-Herz extern, nach Entfernung des Sinusknotens, so steigt mit höherer Reizfrequenz die Kontraktionskraft meist am Ventrikel (Rossman et al., 2004). Die Frequenz-Kraft Beziehung wird auch als „positives Treppenphänomen“ bezeichnet. Diesbezüglich konnten wir allerdings keine Zunahme der Inotropie feststellen, weder für die homo-, noch die heterozygoten Gruppen. Mit steigender Frequenz sank die Kontraktionskraft in allen Gruppen. Auffällig waren stets erhöhte Werte der Knock-outs (siehe 4.2.1.). Da alle Proben gleich reagierten, ist es nicht möglich, eine Veränderung zwischen den homozygoten Tieren und den Wildtyp-Hezen zu registrieren. Die Ergebnisse der ersten Ableitung bestätigen diese Resultate. Zur Kontrolle des Experimentes wurden die Stimulationsfrequenzen mit den gemessenen Frequenzen verglichen. Die Proben folgten ihrer Reizfrequenz (siehe Abb. 5). Nach Beendigung des Versuches wurden die Herzen mit 1 Hz gereizt und unter β -adrenergen Stress gesetzt. Hier maßen wir wieder erhöhte Basalwerte der Kontraktionskraft für homozygote Präparate, im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen. Ein Effekt von Isoprenalin war kaum messbar (siehe Abb. 6). Gleiches gilt für die Kontraktionsgeschwindigkeit (siehe Abb. 7). In der heterozygoten Gruppe und bei den Wildtyp-Hezen konnte ein, wenn auch geringer Effekt von Isoprenalin, detektiert werden (Liu et al., 2011). Denkbar ist ein zu junges Alter der Tiere, vor Organentnahme und deshalb eine geringere Empfindlichkeit auf β -sympathomimetischen Stress (Castillo-Hernandez et al., 2010). Entscheidend in dieser Untersuchung sind die dauerhaft höheren Basalwerte der Inotropie in Knock-out Proben und der fehlende Isoprenalin-Effekt.

Ein solcher Effekt wurde am isoliert perfundierten Herzen bisher noch nicht beschrieben, im Gegenteil, in der Vergangenheit konnten keine Unterschiede in der basalen Kontraktionskraft des Herzens zwischen Homozygoten und Wildtyp-Proben ermittelt werden (Knollmann et al., 2006).

Eine Erklärung hierfür kann über die Beziehung zwischen CSQ2 und dem Ryanodin-Rezeptor versucht werden. Ist CSQ2 vermindert, kann CSQ seinen hemmenden Einfluss auf den Ryanodin-Rezeptor nicht mehr ausüben (Tania et al., 2010; Dulhanty et al., 2012).

Die Öffnung und somit die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR ist damit wahrscheinlicher. Das „zusätzliche“ Ca^{2+} bewirkt dementsprechend eine Zunahme der basalen Kontraktionskraft. Unter der Wirkung β -adrenergen Stresses ist es den Herzzellen nicht möglich, noch mehr Ca^{2+} für die Herzmuskelkontraktion zur Verfügung zu stellen, weshalb β -adrenerge Stimulation durch Isoprenalin die Kraft nicht weiter steigern kann (Zhang et al., 2014). Die Ca^{2+} -Speicher des SR sind aufgrund der fehlenden Bindungsfähigkeit möglicherweise gering gefüllt und reichen nicht aus, um einen positiven inotropen Effekt von Isoprenalin vermitteln zu können (Chen et al., 2013). Ein weiteres Problem ergibt sich durch die Arbeit des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX). In Herzen werden drei Na^+ -Ionen, im Austausch gegen ein Ca^{2+} -Ion während der Diastole transportiert (Shattock et al., 2015). In der Systole steigt der Ca^{2+} -Spiegel innerhalb der Zelle an und die Transportrichtung des Austauschers läuft in die entgegengesetzte Richtung, das heißt, die Zelle verliert Ca^{2+} (Xu et al., 2012). Vorstellbar ist eine konstant erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in den Herzen der transgenen Tiere. Der NCX transportiert demzufolge mehr Ca^{2+} aus der Zelle heraus, wodurch der Ca^{2+} -Verlust steigt. Kommt es zu β -adrenergen Stress, können keine weiteren Ca^{2+} -Reserven genutzt werden, da ein konstanter Auswärtstransport des Moleküls aus der Zelle erfolgt. Eine weitere Steigerung der Herzmuskelkraft tritt hypothetisch nicht ein.

5.2.3. Langendorff-Versuchsreihe 2

In der zweiten Versuchsserie wurden Herzen mit intaktem rechtem Vorhof genutzt. Die Herzen schlugen spontan (siehe 4.2.2.). Zunächst erfolgte die Applikation von Coffein. Dieses kann an den Ryanodin-Rezeptor binden und somit eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bewirken (Kong et al., 2008). Coffein konnte in unseren Experimenten nur einen schwachen positiv inotropen Effekt an homozygoten Herzen auslösen. Ein stärkerer Effekt zeigte sich bei den Wildtyp- und heterozygoten Herzen. Es war wieder eine signifikant erhöhte basale Kontraktionskraft und Kontraktionsgeschwindigkeit, der Knock-outs sichtbar (siehe Abb. 8; Abb. 9).

Mit Coffein lässt sich der relative Ca^{2+} -Gehalt im SR ermitteln. Der positiv inotrope Effekt von Coffein auf die Wildtyp-Herzen ist vereinbar mit einem hohen Ca^{2+} -Gehalt in diesem Zellorganell (Clark et al., 1973). Nach externer Öffnung des Ryanodin-Rezeptors strömt Ca^{2+} aus und führt zur Kontraktion (Eisner, 2014).

In den Knock-out Präparaten ist dieser Vorgang nicht mehr vorhanden. Coffein kann den Ryanodin-Rezeptor zwar öffnen, aber infolge der reduzierten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit, kann Ca^{2+} nur in geringen Mengen freigesetzt werden. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht sich kaum und der Effekt bleibt aus. Ein größerer zytosolischer Ca^{2+} -Gehalt unter Ruhebedingungen erklärt die erhöhte Basalkraft. Gleichermaßen verhält es sich mit der Kontraktionsgeschwindigkeit. Eine Zunahme der Herzfrequenz nach Coffein-Stimulation konnte innerhalb der Wildtypgruppe erfasst werden. Diese zeigte ein normales Verhalten auf den externen Reiz. 2007 erhoben Song et al. ähnliche Daten. In ihren Experimenten wurden die Maus Herzen mit Mg^{2+} behandelt, welches im Stande ist, den Ryanodin-Rezeptor zu schließen. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich der Ca^{2+} -Regelkreis, die Arrhythmien nahmen ab und Kontraktionskraft, sowie Kontraktionsgeschwindigkeit normalisierten sich. Nach Auswaschung des Coffeins führten wir bei den Präparationen noch eine Isoprenalin-Gabe durch. Die Ergebnisse waren identisch mit denen der ersten Versuchsgruppe (siehe Abb. 11 - Abb. 16).

Es konnte eine deutliche positive Inotropie und Chronotropie, in den isolierten Herzen der Wildtyp-Proben und Heterozygoten, gemessen werden. Die basale Kontraktionskraft der Knock-outs war in unseren Versuchen ebenso erhöht. Wie schon erwähnt, ist dieses Ergebnis ein neuartiges, das bis dato noch nicht beschrieben werden konnte (Knollmann et al., 2006).

5.2.4. Arrhythmien

Entsprechend der Literatur ließen sich auch in unseren Experimenten Arrhythmien der Herzen messen (Knollmann et al., 2006; Song et al., 2007). Heterozygote und homozygote Geschwisterpaare wiesen unter basalen und β -adrenergen Bedingungen ventrikuläre Tachyarrhythmien auf, wie sie auch beim Menschen vorkommen (siehe Abb. 17). Ursächlich dafür sind möglicherweise die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration sowie ein spontan öffnender Ryanodin-Rezeptor (Guo et al., 2012). Beides könnte die unkoordinierte Herzmuskelkontraktion, die Ausprägung von Arrhythmien und folglich eine gestörte Blutversorgung des Herzmuskels, bewirken.

5.3. Herzfunktion in vivo

5.3.1. Echokardiografie

Im Herzultraschall konnten wir Herzfrequenz und Ejektionsfraktion der Mäuse aufzeichnen. Die von uns erhobenen Daten wiesen keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Proben und Knock-outs auf (siehe 4.3.). Entsprechend dem menschlichen Patientenkollektiv mit Calsequestrin-Mutationen und schon publizierter Arbeiten an Knock-out Mäusen, registrierten auch wir keine morphologische Veränderungen am Herzen (Knollmann et al., 2006; Song et al., 2007). Daraus lässt sich vermuten, dass weder strukturelle noch makroskopisch funktionelle Defekte einen Einfluss auf die CPVT nehmen.

5.4. Biochemische Untersuchungen

Der Beweis des erfolgreichen CSQ2 Knock-outs lieferten uns die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen. Da CSQ2 in den Herzen der homozygoten Tiere nicht detektierbar war, lässt das auf einen erfolgreichen Knock-out schließen (siehe Abb. 23). In den heterozygoten Proben war CSQ2 nur um ca. 20% vermindert, verglichen mit den Wildtyp-Proben. Schlussfolgernd wurde CSQ2 noch exprimiert, wenn auch nicht im vollen Ausmaß (siehe Abb. 25). Ähnliche Ergebnisse lieferte Knollmann 2006, der eine Reduktion um 25% bei heterozygoten Herzen veröffentlicht hat.

Das von uns entwickelte Modell ist ein spezifisches konstitutives CSQ2 Knock-out-Modell. Dies konnten die Versuche an langsamen und schnellen Skelettmuskelfasern belegen. Herz- und Skelettmuskel Proben wurden gemischt, um eine Vergleichbarkeit zu erzielen und die Banden explizit CSQ1 und CSQ2 zuordnen zu können (siehe Abb. 24). Es zeigte sich eine Abnahme der CSQ2 Banden zwischen den Gruppen, währenddessen die CSQ1 Bande in allen Proben sichtbar war.

Triadin und Junctin, die die Brücke zwischen Calsequestrin und dem RyR2 bilden, zeigten in Versuchen von Seidman und Seidman 2007 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Wildtyp-Proben, heterozygoten und homozygoten Tieren.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Versuchen Knollmanns, 2006. Er beschrieb eine Abnahme beider Proteine in CSQ Knock-out Proben. Damit ist der tetradische Komplex gestört und die Wahrscheinlichkeit einer ungewollten Öffnung des Ryanodin-Rezeptors erhöht. Untersuchungen zu diesen Proteinen stehen in unserem Modell noch aus.

Phospholamban war bei unseren Versuchen in allen Gruppen konstant (siehe Abb. 25). Eine Reduktion des Phospholambans hätte eine Aktivitätssteigerung der SERCA bewirken können, da der hemmende Einfluss von Phospholamban auf die SERCA-Aktivität vermindert wäre (Wang et al., 2014). In der Literatur findet sich ebenfalls keine Abnahme von Phospholamban in Western-Blot-Versuchen (Knollman et al., 2006; Seidman et al., 2007). Interessanterweise fand sich jedoch eine Erhöhung der SERCA zwischen Knock-outs und Wildtyp-Herzen als auch zwischen Heterozygoten und Wildtyp-Herzen in der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise produzieren die Tiere, denen CSQ2 fehlt, ausgleichend mehr SERCA, um die Ca^{2+} -Konzentration im SR zu erhöhen. Durch die fehlende Speicherung kommt es, so könnte man vermuten, vor allem während der Diastole zur spontanen Ca^{2+} -Freisetzung und daraufhin zu Herz-Rhythmus-Störungen (Zhao et al., 2015). Die Erhöhung der SERCA-Protein-Expression könnte ein Versuch des Herzens sein, das freie Ca^{2+} zu reduzieren, vermutlich zurück an das SR zu transportieren und somit möglicherweise spontane Herzkontraktionen zu verhindern. Aus der Literatur sind Veränderungen der SERCA-Expression bei anderen CSQ2-KO-Mäusen nicht bekannt. Hier zeigte die SERCA-Protein-Expression konstante Werte zwischen allen Geschwistertieren (Knollmann et al., 2006; Seidman et al., 2007; Song et al., 2007).

In Anbetracht der zahlreichen Aufgaben, die Calsequestrin übernimmt, stellt sich die Frage, ob bei dessen Verlust oder Abnahme, andere Ca^{2+} -bindende Proteine kompensatorisch entgegenwirken. Wir verwendeten Stains All-Gelfärbungen, um eventuell hochregulierte Ca^{2+} -bindende Stoffe, anfärben zu können (King und Morrison, 1976; Campbell, 1983; Myers, 1996).

Für Vergleichszwecke verwendeten wir Herzproben einer Calsequestrin-überexprimierenden Maus (siehe 4.4.3.). Wir konnten keine Erhöhung anderer Proteine detektieren (siehe Abb. 27). Es sind dementsprechend keine kompensatorischen Vorgänge in Knock-out Proben, ermittelbar. Die Angaben aus vorhergehenden Arbeiten verhalten sich dahingehend divergent.

Song beschrieb 2007, sowie auch Seidman und Seidman 2006, eine Erhöhung des Calreticulins, welches ebenfalls ein Ca^{2+} -bindendes Protein im SR ist. Es ist vor allem in der fetalen Periode der Organismen ausgeprägt und sinkt im Laufe des Lebens ab (Karnabi et al., 2013).

Calstabin, ein Ryanodin-Rezeptor-bindendes Protein, blieb hingegen konstant (Song et al., 2007). Die Ergebnisse Knollmanns et al. 2006, stimmen mit den unseren überein. Es ist denkbar, dass noch mehr Versuche in Bezug auf weitere herzcharakteristische Ca²⁺-bindende Proteine nötig sind, um genauere Aussagen zu erzielen (Fukuda et al., 2014). Allen voran sollte die Expression des Ryanodin-Rezeptors gemessen werden, da auch hier in der Literatur Steigerungen in der Expression gezeigt wurden (Seidman et al., 2007; Song et al., 2007).

Zur Untersuchung etwaiger histologischer Veränderungen, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt (siehe Abb. 19). In Übereinstimmung mit der Literatur fanden sich keine pathologischen Befunde (Knollmann et al., 2006; Song, 2007). Dies ist hinweisend für eine intakte Zellmorphologie und unterstützt den makroskopischen Befund. Die genetische Modifikation hat scheinbar nur einen Einfluss auf die molekulare Ebene der Zellen.

5.5. CPVT in Maus und Mensch - Ein Vergleich

Stellt man die gefundenen Ergebnisse des Mausmodells, den klinischen Merkmalen betroffener Patienten gegenüber, so finden sich Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede (Greensmith et al., 2014). In beiden Gruppen sind stressinduzierte Arrhythmien auslösbar, jedoch kam es bei den Tieren nicht zum plötzlichen Herztod, beim Menschen hingegen schon (Knollmann et al., 2006). Denkbar ist eine geringere Empfindlichkeit der Organe auf katecholaminergen Stress, angesichts der kleineren ventrikulären Masse der Maus (Knollmann et al., 2006).

Eine Gemeinsamkeit ist die Tatsache, dass die Arrhythmien bei heterozygoten Merkmalsträgern, sowohl bei Mensch, als auch Tier, schwächer ausgeprägt sind. Erst durch Stresseinwirkung konnten bei heterozygoten Patienten Arrhythmien ausgelöst werden (Piori et al., 2002).

Ventrikuläre Arrhythmien konnten wir in Langendorff-Versuchen nachweisen (siehe Abb. 17). Vorarbeiten zur Elektrokardiografie lieferten Knollmann et. al. 2006. Die Tiere zeigten, gleichsam der Menschen, ein unauffälliges Ruhe EKG.

Zwar fanden wir in unseren Experimenten keine pathologischen Befunde, aber die Übertragung dessen auf den Menschen stellt sich schwierig dar. Es existieren wenige Patienten mit einer Calsequestrin-Mutation, weshalb es unmöglich ist, zunächst alle zu diagnostizieren und an allen Erkrankten ein Echokardiogram durchzuführen.

Des Weiteren ist denkbar, eventuelle pathologischen Befunde während der Untersuchung übersehen zu haben. Außerdem könnten gerade leichte Veränderungen, wie eine Verdickung der Wand des linken Ventrikels, als nichtig abgetan, oder als Ursache einer anderen Grunderkrankung, interpretiert worden sein (Heiner et al., 2011). Da gerade heterozygote Betroffene vollkommen asymptomatisch sein können, bleibt diese Patientengruppe unbemerkt (Rajagopalan et al., 2015). Wir können daher nur mutmaßen, ob wirklich alle Mutationsträger echokardiografisch unauffällig sind oder nur ein Teil von ihnen. Gleiches gilt für die Kontraktilität der Herzen, da keine Werte bezüglich intrakardialer ventrikulärer Druckmessungen dieser Erkrankten existieren. Selbst wenn die Patienten echokardiografisch unauffällig wären, würde dies nicht bedeuten, dass die Herzmuskulatur gleichsam Gesunder arbeiten würde, so wie es auch unsere Experimente zeigten. Auch wir fanden normale echokardiografische Befunde, im Langendorff-Modell zeigte sich hingegen eine erhöhte basale Kontraktilität. Ausgehend von den bis zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Merkmalen der Mutationsträger, ist es vorstellbar, dass sich im menschlichen Herz, ähnliche Befunde auf mikroskopischer und biomolekularer Ebene, finden (Kozlovski et al., 2014). Es ist immer schwierig den direkten Vergleich zwischen Maus und Mensch zu ziehen, dennoch war es uns möglich, catecholaminerge induzierte polymorphe ventrikuläre Tachykardien, infolge eines Calsequestrin Knock-outs, beim Tier hervorzurufen (siehe Abb.17). Auf der Basis dieser Ergebnisse erhält man einen genaueren Einblick in die Grundlagen der CPVT.

5.6. Klinischer Ausblick

Echokardiografisch, histologisch oder elektrokardiografisch lassen sich nur minimale Veränderungen bei CPVT in Ruhe finden. Auf molekularer Ebene lassen sich zwei Angriffsorte unterscheiden, die eine geregeltere Ca^{2+} -Homöostase schaffen könnten und als Ziele einer Gentherapie denkbar wären. Zunächst wäre eine Hochregulation anderer Ca^{2+} -bindender Proteine, wie zum Beispiel Calretikulin oder Calmodulin möglich (Martinho-Dias et al., 2016). Somit wäre eine Teilaufgabe des Calsequestrins kompensiert. Andererseits könnten Modifikationen von Proteinen wie SERCA, Phospholamban, Triadin und Junctin eine verbesserte Regulation des Ca^{2+} -freisetzenden Vorganges bedingen (Chan et al., 2011).

Die Überexpression von SERCA könnte mittels eines verstärkten Rücktransports von Ca^{2+} ins SR dem erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel entgegenwirken. Ein Hinweis auf die Funktionalität dieses Ausgleichs lieferten unsere Ergebnisse. Eine Herunterregulation des Phospholambans hätte ähnliche Konsequenzen, da dessen hemmende Wirkung auf SERCA wegfallen würde und folglich eine Aktivitätssteigerung der SERCA induziert würde. Allerdings wäre das Herz dann nicht mehr in der Lage auf β -adrenerge Stimulation zu reagieren (Luo et al., 1994). Triadin und Junctin könnten durch stärkere Ausprägung einen größeren hemmenden Effekt auf den Ryanodin-Rezeptor ausüben. Dieser bliebe verschlossen und Ca^{2+} könnte nicht spontan aus dem SR entweichen. Bei diesen drei Proteinen konnten unsere Versuche keine Veränderung demonstrieren.

Es existiert bereits ein Mausmodell eines doppelten Mutanten. Hier erfolgte ein Calsequestrin Knock-out mit einer gleichzeitigen SERCA-Überexpression. Bemerkenswert war eine erhöhte Mortalität der Tiere. Ursachen dafür waren die Entwicklung von Herzfehlern, dilatierte und hypertrophe linke Ventrikel sowie eine verstärkte Apoptose der Zellen (Kalyanasundaram et al., 2013). Einschränkend muss man sagen, dass in diesen Versuchen eine skelettale SERCA überexprimiert wurde, sodass die Interpretation der Daten nicht eindeutig ist. Vermutlich kommt es infolge der SERCA-Überexpression zu hyperaktiven oder porösen Ryanodin-Rezeptoren (Kontula et al., 2005).

Diese Ergebnisse sind dahin gehend neu, dass bei vergleichbaren Versuchen, nie eine erhöhte Sterblichkeit der Mäuse beobachtet werden konnte. Schlussfolgernd ergibt sich, dass die unterschiedliche Expression der Proteine nur Kompensationsmechanismen darstellen, die eventuell im weiteren Verlauf der Krankheit, zu ihren eigenen Komplikationen führen können. Dennoch könnten Modulationen im Proteinhaushalt die Häufigkeit der Arrhythmien reduzieren, sowie erhöhte Lebenszeit verschaffen. Es bestätigt die Tatsache, dass die Entwicklung und Behandlung der CPVT ein komplexer Vorgang und die Ca^{2+} -Homöostase ein vielschichtiger Prozess ist. Die Beeinflussung der Patienten auf molekularer Ebene ist allerdings noch Zukunftsmusik. Gegenwärtig besteht die Therapie in medikamentösen Behandlungsstrategien, wie β -Adrenozeptor-Blockern, Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten oder α -Adrenozeptor-Blockern (Knollmann et al., 2006; Chopra et al., 2009; Kurtzwald-Josefson et al., 2014). Invasivere Maßnahmen, wie die Implantation eines ICD oder Ganglioektomie müssen in Erwägung gezogen werden (Knollmann et al., 2009). Natürlich sind weitere Untersuchungen, vor allem auch am Menschen nötig, um genauere Ergebnisse und eventuelle therapeutische Optionen zu erlangen.

6. Zusammenfassung

Störungen im Ca^{2+} -Haushalt des menschlichen Herzens können zu schweren Herzrhythmusstörungen und Defekten der Herzarbeit und Leistung führen. Calsequestrin übernimmt eine Schlüsselrolle dieses Regelkreises. An einem neuen CSQ2 Knock-out Modell wurde die ventrikuläre Funktion näher untersucht. Die Knock-out Mäuse waren lebensfähig und fertil. Sie boten makroskopisch und echokardiografisch keine Auffälligkeiten. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung waren keine strukturellen, histologischen Defizite nachweisbar. Der Knock-out betraf nur die kardiale Isoform 2 des Calsequestrins, Calsequestrin1 blieb unverändert. Bezeichnend dafür waren die Ergebnisse des Western-Blot-Verfahrens. Hier fanden sich in den Herzen der Knock-out-Tiere eine, vermutlich kompensatorisch, verstärkte SERCA-Expression, wohingegen andere Proteine wie Phospholamban, Triadin und Junctin keine Veränderungen zeigten.

Die „Stains All“ Gelfärbung konnte keine weiteren Ca^{2+} -bindenden Proteine detektieren, welche statt des Calsequestrins erhöht exprimiert wurden. Im Langendorff-Modell wurde eine erhöhte basale Kontraktionskraft der Knock-out Ventrikel im Vergleich mit den Geschwistertieren gefunden, allerdings konnte nur ein minimaler β -sympathomimetischer Effekt des Isoprenalins, verzeichnet werden. Die Wirkung des Coffeins auf die Inotropie, war in Knock-out Herzen vermindert. Allerdings wiesen die Knock-out Tiere und die heterozygoten Tiere unter basalen und stimulierten Bedingungen Arrhythmien auf, nicht jedoch die Wildtyp-Herzen. Dieses Ergebnis stimmt mit den CPVT-Symptomen des Menschen überein. Es lassen sich Parallelen zwischen Maus und Mensch finden, weshalb sich die Resultate des Mausmodells, zumindest teilweise, auch auf den Menschen übertragen lassen. Calsequestrin hat somit eine globale Bedeutung für die Ca^{2+} -Homöostase.

CSQ2 ist nicht nur essenziell für die suffiziente Ca^{2+} -Speicherung im SR, sondern auch für die Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung über den inhibitorischen Einfluss auf den Ryanodin-Rezeptor. Als Konsequenz ergeben sich Korrelationen zwischen Veränderungen der basalen ventrikulären Funktion und dem Defekt des Calsequestrins. Auf β -adrenergen Stress kann der Herzmuskel nicht mehr adäquat reagieren.

7. Literaturverzeichnis

Blich M, Marai I, Suleiman M, Lorber A, Gepstein L, Boulous M, Khoury A (2015) Electrocardiographic comparison of ventricular premature complexes during exercise test in patients with CPVT and healthy subjects. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 38:398-402.

Bowditch HP (1871) Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Berichte der Sächsischen Akademie der Wissenschaften* 23:652–689.

Bunting M, Bernstein KE, Greer JM, Capecchi MR, Thomas KR (1999) Targeting genes for selfexcision in the germ line. *Genes and Development* 13:1524-1528.

Campbell K (1983) Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100 with the cationic carbocyanine dye "stains all". *The Journal of Biological Chemistry* 258:11267-11273.

Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO (1983) Staining of the Ca²⁺-binding Proteins, Calsequestrin, Calmodulin, Troponin C, and S-100, with the Cationic Carbocyanine Dye "Stainsall". *Journal of Biological Chemistry* 258:11267-11273.

Castillo-Hernandez Mdel C, Meraz-Cruz N, Guevara-Balcazar G, Lopez-Canales J, Lopez-Canales O, Galindo N, Castillo-Henkel C (2010) Age-related differences in the beta-adrenergic vasodilator response in rat aortic rings. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 53:29-32.

Chan YH, Wu LS, Yeh YH, Wu CT, Wang CL, Luqman N, Chen WJ, Hsu TS, Kuo CT (2011) Possible targets of therapy for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. - Insight from a theoretical model -. *Circulation Journal* 75:1833-1842.

Charlier HA, Olson RD, Thornock CM, Mercer WK, Olson DR, Broyles TS, Muhlestein DJ, Larson CL, Cusack BJ, Shadle SE (2005) Investigations of Calsequestrin as a Target for Anthracyclines: Comparison of Functional Effects of Daunorubicin, Daunorubicinol, and Trifluoperazine. *Molecular Pharmacology* 67:1505-1512.

Chen H, Valle G, Furlan S, Nani A, Gyorke S, Fill M, Volpe P (2013) Mechanism of calsequestrin regulation of single cardiac ryanodine receptor in normal and pathological conditions. *The Journal of General Physiology* 142:127-136.

Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Etensohn K, Pfeifer K, Akin B, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2007) Modest Reductions of Cardiac Calsequestrin Increase Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak Independent of Luminal Ca²⁺ and Trigger Ventricular Arrhythmias in Mice. *Circulation Research* 101:617-626.

Chopra N, Knollmann BC (2009) Cardiac calsequestrin: the new kid on the block in arrhythmias. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 20:1179-1185.

Clark A, Olson CB (1973) Effects of caffeine and isoprenaline on mammalian ventricular muscle. *British Journal of Pharmacology* 47:1-11.

- Dulhunty AF, Wium E, Li L, Hanna AD, Mirza S, Talukder S, Ghazali NA, Beard NA (2012) Proteins within the intracellular calcium store determine cardiac RyR channel activity and cardiac output. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39:477-484.
- Edwards JN, Blatter LA (2014) Cardiac alternans and intracellular calcium cycling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 41:524-532.
- Eisner D (2014) Calcium in the heart: from physiology to disease. *Journal of Experimental Physiology* 99:1273-1282.
- Ewe K (1974) Die intestinale Calcium-Resorption und ihre Störungen. *Klinische Wochenschrift* 52:57-63.
- Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of Physiology* 249:469-495.
- Faggioni M, Knollmann BC (2012) Calsequestrin 2 and arrhythmias. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 302:1250-1260.
- Faggioni M, Kryshchal DO, Knollmann BC (2012) Calsequestrin mutations and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Pediatric Cardiology* 33:959-967.
- Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M (2014) Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448:1-7.
- Greensmith DJ, Galli GL, Trafford AW, Eisner DA (2014) Direct measurements of SR free Ca reveal the mechanism underlying the transient effects of RyR potentiation under physiological conditions. *Cardiovascular Research* 103:554-563.
- Guo T, Gillespie D, Fill M (2012) Ryanodine receptor current amplitude controls Ca²⁺ sparks in cardiac muscle. *Circulation Research* 111:28-36.
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S (2004) The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophysical Journal* 86:2121-2128.
- Heiner JD, Bullard-Berent JH, Inbar S (2011) Deadly proposal: a case of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Pediatric Emergency Care* 27:1065-1068.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 270:30787-30796.
- Kalyanasundaram A, Lacombe VA, Belevych AE, Brunello L, Carnes CA, Janssen PM, Knollmann BC, Periasamy M, Györke S (2013) Up-regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake leads to cardiac hypertrophy, contractile dysfunction and early mortality in mice deficient in CASQ2. *Cardiovascular Research* 98:297-306.

- Kalyanasundaram A, Viatchenko-Karpinski S, Belevych A, Lacombe V, Hwang HS, Knollmann BC, Gyorke S, Periasamy M (2011) Functional consequences of stably expressing a mutant Calsequestrin (CASQ2^{D307H}) in the CASQ2 null background. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 302:1-26.
- Karnabi E, Qu Y, Yue Y, Boutjdir M (2013) Calreticulin Negatively Regulates the Surface Expression of Cav1.3 L-Type Calcium Channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437:497-501.
- Kashimura T, Briston SJ, Trafford AW, Napolitano C, Priori SG, Eisner DA, Venetucci LA (2010) In the RyR2(R4496C) mouse model of CPVT, β -adrenergic stimulation induces Ca waves by increasing SR Ca content and not by decreasing the threshold for Ca waves. *Circulation Research* 107:1483-1489.
- Katz G, Shainberg A, Hochhauser E, Kurtzward-Josefson E, Issac A, El-Ani D, Aravot D, Afek A, Seidman JG, Seidman CE, Eldar M, Arad M (2013) The role of mutant protein level in autosomal recessive catecholamine dependent polymorphic ventricular tachycardia (CPVT2). *Biochemical Pharmacology* 86:1576-1583.
- King L, Morrison M (1976) The visualization of human erythrocyte membrane proteins and glycoproteins in SDS-polyacrylamide gels employing a single staining procedure. *Analytical Biochemistry* 71:223-230.
- Knollmann (2009) New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. *The Journal of Physiology* 587:3081-3087.
- Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BEC, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *The Journal of Clinical Investigation* 116:2510-2520.
- Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ, Chen SR (2008) Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *The Biochemical Journal* 414:441-452.
- Kontula K, Laitinen PJ, Lehtonen A, Toivonen L, Viitasalo M, Swan H (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: recent mechanistic insights. *Cardiovascular Research* 67:379-387.
- Kornyeyev D, Petrosky AD, Zepeda B, Ferreira M, Knollmann B, Ariel L, Escobar AL (2012) Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca²⁺ release and reduces rate-dependent Ca²⁺-alternans in intact mouse hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52:21-31.
- Kozlovski J, Ingles J, Connell V, Hunt L, McGaughan J, Turner C, Davis A, Sy R, Semsarian C (2014) Delay to diagnosis amongst patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *International Journal of Cardiology* 176:1402-1404.
- Kurtzward-Josefson E, Hochhauser E, Bogachenko K, Harun-Khun S, Katz G, Aravot D, Seidman JG, Seidman CE, Eldar M, Shainberg A, Arad M (2014) Alpha blockade potentiates CPVT therapy in calsequestrin-mutant mice. *The Journal of Heart Rhythm* 11:1471-1479.

Langendorff O (1898) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflügers Archiv 61:291-332.

Lanner JT (2012) Ryanodine receptor physiology and its role in disease. Advances in Experimental Medicine and Biology 740:217-234.

Lee D, Michalak M (2010) Membrane associated Ca²⁺ buffers in the heart. BMB reports 43:151-157.

Lieve KV, Wilde AA, van der Werf C (2015) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; possible diagnosis in cases of syncope and sudden death of family members. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 159:A8205.

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

Liu N, Ruan Y, Denegri M, Bachetti T, Li Y, Colombi B, Napolitano C, Coetzee WA, Priori SG (2011) Calmodulin kinase II inhibition prevents arrhythmias in RyR2(R4496C+/-) mice with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 50:214-222.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265-275.

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994) Targeted ablation of the Phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of β -agonist stimulation. Circulation Research 75:401-409.

Marai I, Boulos M, Khoury A (2015) Left Cardiac Sympathetic Denervation in Patients with CASQ2-Associated Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. Israel Medical Association Journal 17:538-540.

Marks AR (2013) Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. The Journal of Clinical Investigation 123:46-52.

Martinho-Dias D, Leite-Moreira A, Castro-Chaves P (2016) Calreticulin in the Heart: From Embryological Development to Cardiac Pathology. Current Molecular Medicine 16:12-22.

Michaëlsson K, Melhus H, Lemming EW, Wolk A, Byberg L (2013) Long term calcium intake and rates of all cause and cardiovascular mortality: community based prospective longitudinal cohort study. British Medical Journal 346:228-229.

Murphy RM, Larkins NT, Mollica JP, Beard NA, Lamb GD (2009) Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. The Journal of Physiology 587:443-460.

Murphy RM, Mollica JP, Beard NA, Knollmann BC, Lamb GD (2010) Quantification of calsequestrin 2 (CSQ2) in sheep cardiac muscle and Ca²⁺-binding protein changes in CSQ2 knockout mice. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 300:595-604.

- Myers J (1996) A method for enhancing the sensitivity and stability of stains-all for phosphoproteins separated in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 240:300-3002.
- Paolini C, Quarta M, D'Onofrio L, Reggiani C, Protasi F (2011) Differential Effect of Calsequestrin Ablation on Structure and Function of Fast and Slow Skeletal Muscle Fibers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:1-10.
- Paolini C, Quarta M, Nori A, Boncompagni S, Canato M, Volpe P, Allen PD, Reggiani C, Protasi F (2007) Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *The Journal of Physiology* 583:767-784.
- Phillips MF, Quinlivan R (2008) Calcium antagonists for Duchenne muscular dystrophy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 4:4571.
- Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Bloma N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ (2015) 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 36:2793–2867.
- Priori SG, Chen SR (2011) Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling and arrhythmogenesis. *Circulation Research* 108:871-883.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimone L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A (2002) Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 106:69-74.
- Protasi F, Paolini C, Canato M, Reggiani C, Quarta M (2011) Lessons from calsequestrin-1 ablation in vivo: much more than a Ca^{2+} buffer after all. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 32:257-270.
- Rajagopalan A, Pollanen MS (2015) Sudden death during struggle in the setting of heterozygosity for a mutation in calsequestrin 2. *Forensic Science, Medicine and Pathology* Dec. 2015.
- Rossmann EI, Petre RE, Chaudhary KW, Piacentino V 3rd, Janssen PM, Gaughan JP, Houser SR, Margulies KB (2004) Abnormal frequency-dependent responses represent the pathophysiologic signature of contractile failure in human myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36:33-42.
- Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JH, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie ZJ (2015) Na^+/Ca^{2+} exchange and Na^+/K^+ -ATPase in the heart. *The Journal of Physiology* 593:1361-1382.
- Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, Berul CI, Eldar M, Seidman CE, Seidman JG (2007) Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *The Journal of Clinical Investigation* 117:1814-1823.

Tania N, Keener JP (2010) Calsequestrin mediates changes in spontaneous calcium release profiles. *Journal of Theoretical Biology* 265:359-376.

Valle G, Boncompagni S, Sacchetto R, Protasi F, Volpe P (2014) Post-natal heart adaptation in a knock-in mouse model of calsequestrin 2-linked recessive catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Experimental Cell Research* 321:178-189.

Walweel K, Li J1, Molenaar P, Imtiaz MS, Quail A, dos Remedios CG, Beard NA, Dulhunty AF, van Helden DF, Laver DR (2014) Differences in the regulation of RyR2 from human, sheep, and rat by Ca^{2+} and Mg^{2+} in the cytoplasm and in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *The Journal of General Physiology* 144:263-271.

Wang L, Zhang SJ, Li L, Lan C, Zhang R, Liu ZH (2014) Abnormal calcium re-uptake in myocardium sarcoplasmic reticulum in rabbits with heart failure and the influencing factors. *Sheng Li Xue Bao* 66:483-488.

Wang X, Weinberg SH, Hao Y, Sobie EA, Smith GD (2015) Calcium homeostasis in a local/global whole cell model of permeabilized ventricular myocytes with a Langevin description of stochastic calcium release. *American Journal of Physiology* 308:H510-523.

Wang Y, Xu L, Duan H, Pasek DA, Eu JP, Meissner G (2006) Knocking Down Type 2 but Not Type 1 Calsequestrin Reduces Calcium Sequestration and Release in C2C12 Skeletal Muscle Myotubes. *The Journal of Biological Chemistry* 281:15572-15581.

Xu L, Chen J, Li XY, Ren S, Huang CX, Wu G, Li XY, Jiang XJ (2012) Analysis of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) function and current in murine cardiac myocytes during heart failure. *Molecular Biology Reports* 39:3847-3852.

Zhang J, Chen B, Zhong X, Mi T, Guo A, Zhou Q, Tan Z, Wu G, Chen AW, Fill M, Song LS, Chen SR (2014) The cardiac ryanodine receptor luminal Ca^{2+} sensor governs Ca^{2+} waves, ventricular tachyarrhythmias and cardiac hypertrophy in calsequestrin-null mice. *Biochemical Journal* 461:99-106.

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 23389–23397.

Zhao F, Fu L, Yang W, Dong Y, Yang J, Sun S, Hou Y (2015) Cardioprotective effects of baicalein on heart failure via modulation of Ca^{2+} handling proteins in vivo and in vitro. *Life Sciences* S0024-3205:30129-30136.

Zhao YT, Valdivia CR, Gurrola GB, Hernández JJ, Valdivia HH (2015) Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. *Science China Life Science* 58:54-58.

Zot AS, Potter JD (1987) Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure Chemistry* 16:535-559.

8. Thesen

- 1.) Das Targeting-Konstrukt des CSQ2 Gens hatte keinen Einfluss auf die CSQ1-Expression.
- 2.) Die Herzen der CSQ2 -/- Tiere zeigten weder makroskopischen noch morphologische Veränderungen, sowie keine echokardiografischen Veränderungen.
- 3.) Es zeigte sich ein unverändertes relatives Herz- und Lebergewicht der CSQ2 -/- Mäuse, wohingegen das relative Lungengewicht erhöht war.
- 4.) Es zeigte sich eine Erhöhung der basalen Kontraktionskraft in der Knock-out Gruppe, verglichen mit den Wildtyp-Herzen.
- 5.) Die Kontraktionskraft der CSQ2 -/- Ventrikel konnte durch die β -adrenerge sympathomimetische Wirkung des Isoprenalins nicht erhöht werden.
- 6.) Der Coffein-Effekt war in allen CSQ2 -/- Präparationen vermindert, verglichen mit denen der CSQ2 +/+, was für einen geringeren Ca^{2+} -Gehalt des SR in CSQ2 -/- spricht.
- 7.) Arrhythmische Herzaktionen, sowohl unter basalen als auch erregten Bedingungen konnten in CSQ2 -/-, CSQ2 +/-, nicht aber CSQ2 +/+ Ventrikeln beobachtet werden.
- 8.) Die SERCA-Expression war in Herzen von CSQ2 Knock-out Mäusen erhöht, Phospholamban war in allen Gruppen gleich stark nachweisbar.
- 9.) Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte keine strukturellen Abnormalitäten der Knock-out Herzen.
- 10.) CSQ2 spielt eine zentrale Rolle im Ventrikel für die Generierung der basalen Kontraktionskraft, nicht nur für die Ca^{2+} -Homöostase.

9. Anhang

Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im bestmöglichen, kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

9.1. Tierexperimentelle Versuche

9.1.1. Narkose vor Langendorff Stammlösung: Pentobarbital 0,5g/10ml
physiologische Kochsalzlösung
Heparin 1000 IE intraperitoneal

9.1.2. Narkose bei Echo 2 Vol.-% Isofluran, Sauerstoff Fluss 1,5l/min

9.1.3. Tyrode

NaCl	119,90	mmol/l
KCl	5,40	mmol/l
MgCl ₂	1,10	mmol/l
NaHCO ₃	22,60	mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0,42	mmol/l
CaCl ₂	1,80	mmol/l
Glucose	5,05	mmol/l
Ascorbinsäure	0,28	mmol/l
Na ₂ -EDTA	0,05	mmol/l
pH	7,4	

9.2. Biochemische Untersuchungen

9.2.1. Genotypisierung

TE/SDS	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	100 mM
	SDS	0,5%
	pH	8,0
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	0,25 mM
	pH	8,0
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat	3 M
	pH	6,0
DEPC-Wasser	DEPC	0,1% (V/V)
Agarosegel	Agarose	1%
	TAE-Puffer	
	Ethidiumbromid	0,01%

TAE-Puffer	Tris-Base	1,99 M
	EDTA	59,5 mM
	Eisessig	0,99 M
	<i>gelöst in Aqua destillata</i>	
Ladepuffer	TAE-Puffer	50%
	Glycerol	50%
	Bromphenolblau	

9.2.2. Homogenisierung

NaHCO ₃ /SDS	NaHCO ₃ 10 mM SDS 20%
pH	7,4

9.2.3. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Stamm A	Na ₂ CO ₃ 2% in NaOH 0,1
Stamm B	K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat 1%
Stamm C	CuSO ₄ 0,5%
Lösung D	Stamm A 99%
	Stamm B 0,5%
	Stamm C 0,5%
Lösung E	Folin-Ciocalteus (1:2)
Proteinstandard	1mg Rinderserum-Albumin/1 ml Aqua destillata

Der Proteinstandard wurde vor Gebrauch 1:100 verdünnt.

9.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Probenpuffer	Tris-Base	0,125 M
	SDS	4%
	Glycerol	20%
	Bromphenolblau	0,002%
	pH	6,8
Lysispuffer	NaHCO ₃	10 mM
	SDS	20%
	pH	7,4

Die Proben wurden entsprechend ihres spezifischen Proteingehaltes und der gewünschten Endkonzentration, mit Probenpuffer und NaHCO₃/SDS aufgearbeitet.

Trenngel 10%	Porziopuffer	47,39%
	Acrylamid 30%	31,6%
	Glycerol	7,9%
	H ₂ O	12,64%
	TEMED	0,08%
	APS	0,38%
Sammelgel 4%	Sammelgelpuffer	24,73%
	Acrylamid 30%	13,16%
	H ₂ O	61,05%
	TEMED	0,06%
	APS	1%

Porziopuffer (2x)	Tris-Base	0,2 M
	Glycin	0,6 M
	EDTA	0,12 mM
	SDS	0,2%
	Glycin	10%
	Polyacrylamid	0,4%
	pH	8,8

Sammelgelpuffer (4x)	Tris-Base	0,5 M
	SDS	0,4%
	pH	8

APS (10%)
Ammoniumpersulfat *gelöst in Aqua destillata*

Elektrophoresepuffer (10x)	Tris-Base	0,4 M
	Glycin	1,2 M
	SDS	0,4%
	pH	8,8
	<i>gelöst in 1l Aqua destillata</i>	

Der Elektrophoresepuffer wurde in einer 1:10 Verdünnung verwendet.

Transferpuffer	Na ₂ HPO ₄	40 mM
	NaH ₂ PO ₄	7,9 mM
	pH	8
	<i>gelöst in 5l Aqua destillata</i>	

Ponceau-Rot	Ponceau S	0,2%
	Trichloressigsäure	2%

9.2.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen

TBST	Tris-Base	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1% (V/V)
	pH	7,4

Milchpulver-Blockierungspuffer gelöst Magermilchpulver (5% W/V) in TBST

BSA-Blockierungspuffer gelöst Rinderserum-Albumin (2% W/V) in TBST

AP-Puffer	Triethanolamin	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	pH	9,4

ECF-Substrat-Lösung ECF-Substrat 36 mg in
ECF dilution buffer 60 ml gelöst

NBT	NBT Dimethylformamid	50 mg/ml
BCIP	Toluidin-Salz Dimethylformamid	50 mg/ml

9.2.6. Stains All-Lösung

Tris-Base	67,5%
Formamid (V/V)	7,5%
Isopropanol (V/V)	25%
Stains All (W/V)	0,025%
pH	8,8

9.3. Primer, PCR-Programm, Antikörper

Primer

Forward:	6116-P9, Biomers.net GmbH, Ulm 5'- aaa tag atc act tcc c-3'
Reverse:	6116-P11, Biomers.net GmbH, Ulm 5'- gcc ctg ctc cat aaa g-3'

PCR-Programm

Tabelle 5: PCR-Programm

Dargestellt sind die verschiedenen Schritte während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem PCR Gerät Eppendorf Mastercycler gradient.

Denaturierung	94°	2 Min.	1 Zyklus
Denaturierung	94°	30 Sek.	29 Zyklen
Annealing	55°	30 Sek.	
Elongation	72°	1 Min. 30 Sek.	
Elongation	72°	5 Min.	1 Zyklus
Lagerung		4°	

Antikörper

Anti-SERCA: L.R. Jones, Krannert Institute of Cardiology, Indianapolis, IN, USA

Anti-CSQ: Acris GmbH, SP5340P

Anti-PLB A1: Badrilla A010-14

Anti-Mouse Polyvalent Immunglobulins (G/A/M), Alkaline Phosphatase, A0162-5ML:
Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

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

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Medium 1.Antikörper	Verdünnung 1.Antikörper	Medium 2.Antikörper	Verdünnung 2.Antikörper
anti-SERCA	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:3000	anti-mouse IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-CSQ	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-PLB	2% (W/V) BSA in TBST	1:1000	anti-mouse IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000

Tabelle 7: Größenbereiche für Proteinnachweise im Western Blot

Protein	Größenbereich kDa
SERCA	96
Calsequestrin	ca. 55
Phospholamban (nicht erhitzt/erhitzt auf 95°C)	19-25/<12

9.4. Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L (+) - Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	MBI Fermentas, Heidelberg
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coffein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dibutyryl-cAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
ECF dilution buffer	GE Healthcare, Berlin
ECF Substrat	GE Healthcare, Berlin
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
GR 125487	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isofluran	Linde, München
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
CuSO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt

NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT)	MBI Fermentas, Heidelberg
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserum-Albumin	Merck, Darmstadt
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Fluka AG, Buch
Tween 20	Merck, Darmstadt
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

9.5. Geräte und Bezugsquellen

AlphaDigiDoc RT 312nm/254nm;	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bandelin Sonopuls;	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Biophotometer;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600;	Hofer, San Francisco, USA
Echokardiographie System: Vevo 2100;	VisualSonics, Toronto, Canada
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58;	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Langendorff: Datenerfassung PowerLab;	ADInstruments, Oxford, UK
Mikrodismembrator S;	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
PCR Gerät: Mastercycler gradient;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
pH-Meter;	WTW GmbH, STH 600, Weilheim
Prism 5;	GraphPad Software, San Diego, USA
Transfer-Einheit TE 62;	Hofer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mark Imager;	Amersham Biosciences, Freiburg
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Waage Typ AT261 DeltaRange;	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Zentrifuge Modell 5415 C;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Fahrion
Vorname: Carola Marie
Geburtsdatum/-ort: 20. Juli 1990 in Rodewisch/Vogtland
Familienstand: ledig
Geschwister: Schwester, Larissa Fahrion (21), Auszubildende
Eltern: Heiko Fahrion (46), Informatiker
Katja Fahrion (44), geb. Beier, Heilerziehungspflegerin
Anschrift: Humboldtstraße 25, 06114 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1996 - 2000 Grundschole August-Bebel, Klingenthal
2000 - 2008 Gymnasium Klingenthal
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2008 – 2014 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Ärztin

Praktisches Jahr

08/13 – 12/13 Bergmannstrost Halle (Saale); Chirurgie
12/13 – 03/14 Universitätsklinik Halle (Saale); Wahlterial Anästhesie
03/14 – 07/14 Bergmannstrost Halle (Saale); Innere Medizin

Berufliche Tätigkeit

Seit 02/15 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und Notfallmedizin; Bergmannstrost Halle (Saale)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Carola Marie Fahrion, die eingereichte Dissertation zum Thema:

Untersuchungen zur ventrikulären Funktion an Mäusen mit herzspezifischer Deletion von Calsequestrin

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

selbstständig und ohne fremde Hilfe, angefertigt habe. Ich habe keine anderen Hilfsmittel verwendet, als die hier angegebenen. Fremdes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht und Quellen ordnungsgemäß zitiert. Die Dissertation wurde von mir selbst geschrieben. Dritte haben nicht zur Erstellung der Arbeit geholfen.

Ich versichere, keine Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen zu haben. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 26.07.2016

Carola Marie Fahrion

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, Carola Marie Fahrion, dass dies meine erste Dissertation ist. Ich habe nie, weder im Inland noch im Ausland eine Dissertation eingereicht, erstellt oder daran gearbeitet. Die vorliegende Arbeit wird erstmalig und nur an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, eingereicht.

Halle (Saale), den 26.07.2016

Carola Marie Fahrion

Danksagung

Als Erstes möchte ich natürlich Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann danken, der mir dieses sehr interessante Thema überlassen hat und mir in all den Jahren immer tatkräftig zur Seite stand. Seine Unterstützung und Förderung ermöglichte es mir, zügig den experimentellen Teil durchzuführen und die Arbeit nieder zu schreiben. Mit viel Geduld trat er mir gegenüber und hatte immer ein offenes Ohr, wenn es Probleme gab. Seine Ausdauer, sowie seine fachliche Kompetenz, habe ich immer sehr zu schätzen gewusst. Ich hätte keine bessere Betreuung, als durch ihn, haben können. Ich bin sehr froh, dass er mir die Möglichkeit gab, in seinem Institut, die Dissertation verwirklichen zu dürfen.

Dr. rer. nat. Ulrich Gergs war immer eine große Stütze für mich, sowohl in guten, als auch in weniger guten Zeiten. Mit viel Fürsorge begleitete er mich und half mir vor allem während der experimentellen Arbeiten, weiter. Immer gut gelaunt rettete er mich auch aus der größten Misere. Besonders dankbar bin ich ihm für die Hilfe bei der Erstellung des Abstracts, des Posters und ganz besonders dieser Arbeit. Ohne ihn würde ich vermutlich noch immer verzweifelt im Labor stehen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch den Mitarbeiterinnen des Institutes Pia Wilmy, Jenny Wehde und Sonja Reber, aussprechen. Sie führten mich in die praktische Arbeit ein und konnten bei missglückten Experimenten, eine adäquate Fehleranalyse bieten. Alle investierten sehr viel Zeit in mich und meine Arbeit. Ich konnte viel von ihnen lernen und war für ihre Ratschläge immer sehr dankbar.

Meine Familie war für mich immer ein starker Anker. Meine Eltern, Katja und Heiko als auch meine Schwester, Larissa, haben in den 6 Jahren Studium und den 5 Jahren, die ich für die Doktorarbeit benötigte, viel mit mir durchmachen müssen, brachten mich aber immer auf den rechten Weg zurück. Für ihre Liebe und Zuversicht bin ich ihnen unendlich dankbar! Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Alexandra Gey für ihre Motivation, bei meinem guten Freund Carsten Pietzsch, für seine Unterstützung in Computer-Fragen und bei Friederike Köhler, die das Warten auf die Gelelektrophorese sehr amüsant gestaltete.