

Dissertation



Die kardialen Auswirkungen einer SPRED2-Defizienz im Mausmodell

The cardiac effects of a SPRED2 deficiency in the mouse model

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Integrative Biologie

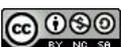
Vorgelegt von

Hannes Jan Häbich

aus

Schwäbisch Hall

Würzburg 2023



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. med. Stefan Störk

1. Betreuer: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Brenda Gerull

3. Betreuer: Univ.- Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Abstract

Deutsch

SPRED 2 wirkt inhibitorisch auf den Ras/ERK-MAPK-Signalweg. Im Knockout Mausmodell zeigen sich einige schwerwiegende phänotypische Eigenschaften, unter anderem zeigen sich ein genereller Minderwuchs, veränderte hormonelle Regelkreise, neurologische Auffälligkeiten, eine deutlich verringerte Lebenserwartung, sowie kardiale Veränderungen. Besonders schwerwiegende SPRED 2 KO typische Ausprägungen im Herzen sind hierbei eine myokardiale Fibrosierung, eine myokardiale Hypertrophie und Herzrhythmusstörungen.

In dieser Arbeit wurden insbesondere kardiale Veränderungen auf Zell- und Proteinebene untersucht. Zur Proteinanalyse der Kardiomyozyten wurden Western Blots und eine Schnittbildgebung angefertigt. Für eine funktionelle Untersuchung wurden isolierte vitale Kardiomyozyten mittels Fluoreszenzfarbstoffen untersucht und unter elektrischer Stimulation beobachtet. Desweiteren wurden isolierte Mitochondrien auf ihren Stoffwechsel und eventuelle Defekte hin analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass junge SPRED2 KO Mäuse keine wesentlichen hämodynamischen Einschränkungen aufweisen und eine gute Kompensationsfähigkeit gegenüber einer Nachlaststeigerung aufweisen. Auch gezeigt werden konnte, dass Veränderungen im Rahmen der Zellkontraktion beim Kalziumhaushalt und Membranpotential existieren und im Zusammenhang mit einer verminderten Expression von SERCA und $Ca_v1.2$ stehen. Bei der Untersuchung von Mitochondrien konnten keine wesentlichen Defizite der mitochondrialen Funktion der SPRED 2 KO Mäuse gefunden werden. In diesem Zusammenhang ist die bekannte Störung der Autophagie am ehesten Ursache für eine gesteigerte Fibrosierung, sowie der gesteigerten Apoptose der Kardiomyozyten. In Folge dessen könnten die oben beschriebenen Veränderungen des Kalziumhaushaltes der Kardiomyozyten stehen und letztendlich über maligne Herzrhythmusstörungen zum vorzeitigen Versterben führen.

English

SPRED 2 has an inhibitory effect on the Ras/ERK-MAPK signaling pathway. In the knockout mouse model, some severe phenotypic features are shown, among others a general short stature, altered hormonal regulatory circuits, neurological abnormalities, a significantly reduced life expectancy, and cardiac changes. Especially severe SPRED 2 KO typical manifestations in the heart are myocardial fibrosis, myocardial hypertrophy and cardiac arrhythmias.

In this work, cardiac changes at the cellular and protein levels were studied in particular. For protein analysis of the cardiomyocytes, Western blots and cross-sectional imaging were performed. For a functional study, isolated vital cardiomyocytes were examined by fluorescent dyes and observed under electrical stimulation. Furthermore, isolated mitochondria were analyzed for metabolism and possible defects. It was shown that young SPRED2 KO mice do not exhibit significant hemodynamic limitations and show a good ability to compensate for the increase in afterload. Moreover, it was shown that alterations in cell contraction exist in calcium balance and membrane potential and are associated with decreased expression of SERCA and $Ca_v1.2$. When mitochondria were examined, no significant deficits in mitochondrial function were found in SPRED 2 KO mice. In this context, the known disruption of autophagy is most likely the cause of increased fibrosis, as well as increased apoptosis of cardiomyocytes. As a consequence, the above calcium balance of the cardiomyocytes ultimately lead to premature death via malignant cardiac arrhythmias.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	4
Inhaltsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	9
1.1 Anatomie und Funktion des Herzens	9
1.2 Physiologie des Herzens	9
1.2.1 Zentrale Ionenkanäle des Herzens und deren Regulierungsmöglichkeiten	10
1.3 Elektrokardiogramm	12
1.4 Herzrhythmusstörungen	15
1.5 Plötzlicher Herztod.....	15
1.6 Elektrophysiologische und hämodynamische Untersuchung.....	16
1.7 Transverse aortic constriction	17
1.8 Mitochondrien	17
1.9 SPRED	18
1.10 Phänotypische Eigenschaften der SPRED2-KO Maus	20
1.11 Herkunft Mauslinie	20
1.12 Klinischer Bezug.....	21
1.13 Ziel der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 In Vivo Versuche	23
2.1.1 Transverse aortic constriction	23
2.1.1.1 Operationsfeld.....	23
2.1.1.2 Narkose, Intubation und chirurgische Vorbereitung.....	23
2.1.1.3 Der Eingriff	24
2.1.1.4 Dopplermessung zur Effektivitätsbestimmung der Operation.....	25
2.1.1.5 Postoperatives Vorgehen.....	26
2.1.2 Invasive Hämodynamik Untersuchung	26
2.2 In Vitro Versuche	29
2.2.1 Myozytenisolation zur Verwendung an der IonOptix mit dem „Calcium and Contractility System“	29
2.2.2 Einzelzell-Membranpotential-Messung mittels IonOptix.....	31
2.2.3 Einzelzell-Kalzium-/ und Kontraktionsmessung mittels IonOptix	37
2.2.4 Protein- und Kanalanalysen mittels Western Blot	42
2.2.4.1 Probengewinnung.....	43
2.2.4.2 Probenanalyse	44

2.2.4.2.1	Mildes „Stripping“	47
2.2.5	Immunohistochemie	47
2.2.6	Mitochondrienstoffwechsel und -membranpotential	49
2.2.6.1	Mitochondrienisolation	49
2.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
2.2.6.3	Atmungsmessungen und Membranpotential der Mitochondrien	51
2.2.6.4	Auswertung	56
2.2.7	Mitochondrien-Kalziumaufnahme-Messung mithilfe eines MPTP-Assay	58
2.2.8	Detektion defekter Mitochondrien mittels Cytochrom C-Assay	60
2.2.9	Auswahl der Tiere für die Zell- und Mitochondrienanalysen	60
2.2.10	Genotypisierung der SPRED2 Mäuse	62
2.3	Statistik und Datenanalyse	62
3	Ergebnisse	63
3.1	In Vivo Versuche	63
3.1.1	Flussgeschwindigkeitsmessung	63
3.1.1.1	Vor der TAC-OP	63
3.1.1.2	Unmittelbar nach der TAC-OP	64
3.1.1.3	Drei Wochen nach der TAC-OP	65
3.1.1.4	Druckgradient über der Aortenklappe	66
3.1.2	Invasive Hämodynamik Untersuchung unbehandelter Tiere	67
3.1.3	Invasive Hämodynamik Untersuchung drei Wochen nach der TAC-OP	68
3.1.3.1	Messungen im Aortenbogen	69
3.2	In Vitro Versuche	70
3.2.1	Kardiomyozyten Stimulationsmessungen	70
3.2.1.1	Membranpotential	70
3.2.1.2	Kalziummessungen	74
3.2.1.3	Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums	79
3.2.1.4	Kontraktionsmessungen	80
3.2.1.5	Lineare Regression Sarkomerlänge zu Kalziumgehalt	83
3.2.2	Western Blot und Schnittbildgebung	84
3.2.2.1	Connexin 43	85
3.2.2.2	Kalzium-Kanäle und Modulatoren	85
3.2.2.3	Natriumkanal Nav1.5	90
3.2.3	Mitochondrien	90
3.2.3.1	Bestimmung der mitochondrialen Atmung	91
3.2.3.2	Mitochondriales Membranpotential	93

3.2.3.3	Mitochondriale Kalziumaufnahme.....	95
3.2.3.4	Bestimmung des zytosolischen Cytochrom C-Gehalts	98
4	Diskussion	100
4.1	In vivo	101
4.2	In vitro	102
4.2.1	Kardiomyozyten Stimulationsmessungen	102
4.2.2	Proteinanalysen	105
4.2.3	Untersuchungen der Mitochondrien.....	106
4.2.4	Cytochrom C	107
4.3	Gesamtbewertung.....	107
4.4	Ausblick	109
5	Zusammenfassung	111
	Abbildungsverzeichnis.....	113
	Tabellenverzeichnis	115
	Abkürzungsverzeichnis	116
	Pufferverzeichnis	120
	Chemikalienverzeichnis	122
	Antikörperverzeichnis.....	129
	Geräte- und Materialverzeichnis.....	130
	Softwareverzeichnis	135
	Literaturverzeichnis	136
	Danksagung.....	143
	Lebenslauf.....	144
	Eidesstattliche Erklärung	148

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion des Herzens

Das Herz hat die Funktion Blut im Körper zu pumpen, um einen stetigen Blutfluss zu erzeugen und stabil aufrecht zu erhalten. Hierzu kontrahiert sich das Herz regelmäßig, stößt Blut in Richtung des Körpers und der Lunge aus und erschlafft anschließend wieder, um Blut passiv nachfließen lassen zu können. Damit der Blutfluss im Herz nur in eine Richtung stattfindet gibt es vier Herzklappen, welche als Rückschlagventil fungieren. Dem Blutstrom vom Körperkreislauf folgend fließt das Blut über die obere und untere Hohlvene in den rechten Vorhof, welcher durch die Trikuspidalklappe von der rechten Kammer getrennt ist. Anschließend fließt das Blut über die Pulmonalklappe in das arterielle Lungengefäßsystem und weiter über Lungenvenen in den linken Vorhof. Dort passiert das Blut die Mitralklappe am Übergang zur linken Kammer und wird weiter über die Aortenklappe in die Aorta gepumpt, von wo aus das Blut über den Körperkreislauf zurück zu den Hohlvenen fließt. Die jeweiligen Klappen sind abhängig vom Kontraktionszyklus des Herzens offen oder geschlossen, sodass das Blut jeweils nur in eine Richtung fließen kann. [1]

1.2 Physiologie des Herzens

Zur Kontraktion des Herzmuskels verfügt sowohl das menschliche als auch das murine Herz über ein ausgeklügeltes System, welches mit Hilfe von spannungsabhängigen Reizen und einer weiterführenden elektromechanischen Kopplung eine koordinierte und effektive Funktion als Blutpumpe möglich machen.

Menschliche und murine Herzmuskelzellen haben im Gegensatz zu vielen anderen Zellen im Körper die Eigenschaft ihr Membranpotential zu depolarisieren und über Zell-Zell Kontakte, sogenannte Gap-Junctions, elektrische Signale weiterleiten zu können, um dadurch eine sinnvoll koordinierte Herzaktivität zu erreichen. Spezialisierte Schrittmacherzellen können mithilfe sogenannter „Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated“ (HCN) - Kanäle spontan depolarisieren und einen elektrischen Reiz auslösen. [2, 3]

Schrittmacherzellen gibt es im Herzen in verschiedenen Bereichen. Je nachdem in welchem Bereich sich die Schrittmacherzellen befinden, depolarisieren sie spontan in verschiedenen Takt-Frequenzen. Daraus resultiert, dass jeweils nur die schnellste Zelle und damit auch das schnellste Schrittmacherzentrum den Takt im Herzen angibt. Physiologisch übernimmt diese

Aufgabe das übergeordnete primäre Schrittmacherzentrum im Sinusknotenareal, umgangssprachlich auch „Sinusknoten“ genannt. Dieses Zentrum, mit einer mittleren Erregungsfrequenz von 70 / min, liegt im rechten Vorhof in der Nähe der Mündung der Vena cava superior. Von dort aus wird die Erregung über das Vorhofmyokard bis zum Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) weitergeleitet.

Im AV-Knoten findet eine kurze Verzögerung durch eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit statt, damit das Blut Zeit hat weiter in die Ventrikel zu fließen, bevor diese ebenfalls kontrahieren. Zellen des AV-Knotens haben, wie Zellen des Sinusknotenareals, die Möglichkeit, spontan zu depolarisieren und können somit im Falle eines Ausfalls des primären Schrittmacherzentrums als sekundäres Schrittmacherzentrum einspringen, allerdings mit einer geringeren Frequenz von etwa 40-50 / min. Die Erregung wird nun weiter über das HIS'sche Bündel über den linken und rechten Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fasern bis in das Kammermyokard weitergeleitet. Auch im Kammermyokard finden sich häufig Zellen mit Neigung zur Spontandepolarisation. Allerdings mit noch geringerer Frequenz als im AV-Knoten mit etwa 20-30 / min, sodass man diese Zellen als tertiären Schrittmacher bezeichnet. [4]

1.2.1 Zentrale Ionenkanäle des Herzens und deren Regulierungsmöglichkeiten

Die Erregungsweiterleitung innerhalb der Zellen erfolgt über die Depolarisation von Natriumkanälen, vor allem dem $\text{Na}_v1.5$ -Kanal. Dieser wird durch eine induzierte Verringerung des Membranpotentials geöffnet und lässt somit Natriumionen nach intrazellulär einströmen. Das Membranpotential der Kardiomyozyten depolarisiert, stößt benachbarte Natriumkanäle ebenfalls zur Öffnung an und wird anschließend durch das intrazelluläre IFM-Motiv am Natriumkanal inaktiviert, eine hydrophobe Triade, bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin. [5] Durch einen folgenden Kalzium-Einstrom von extrazellulär durch den spannungsabhängigen Kalziumkanal $\text{Ca}_v1.2$ wird der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) aktiviert und geöffnet, wodurch es zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR kommt, was auch als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bezeichnet wird. [6] Dadurch erhöht sich der zyttoplasmatische Kalziumgehalt nochmals stark, da das sarkoplasmatische Retikulum einen großen intrazellulären Kalziumspeicher darstellt. Der intrazelluläre Kalzium-Anstieg triggert gleichzeitig die mechanische Kontraktion der Kardiomyozyten und stellt somit die Verknüpfung der elektromechanischen Kopplung dar. [7] Anschließend öffnen Kaliumkanäle und die Kardiomyozyten repola-

risieren durch den Kalium-Ausstrom nach extrazellulär. [8] Gleichzeitig findet ein Kalzium-Rückstrom in das sarkoplasmatische Retikulum über die SERCA (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) und nach extrazellulär über NCX (sodium-calcium exchanger) und PMCA (plasma membrane Ca²⁺ ATPase) statt. [9, 10] Dabei ist SERCA2a die vorherrschende Unterform in Kardiomyozyten. [11] Die SERCA wird physiologisch durch Phospholamban inaktiviert. Durch Phosphorylierung von Phospholamban kann die SERCA nicht mehr inaktiviert werden und Kalzium kann verstärkt in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert werden. [12] Die Kanäle NCX und PMCA sind die maßgebenden Kalziumkanäle zur Regulation des Ruhe-Kalziumgehaltes zwischen zwei Kontraktionen einer Herzmuskelzelle. [13] Durch die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase wird das Gleichgewicht von Natrium und Kalium wieder hergestellt. [14]

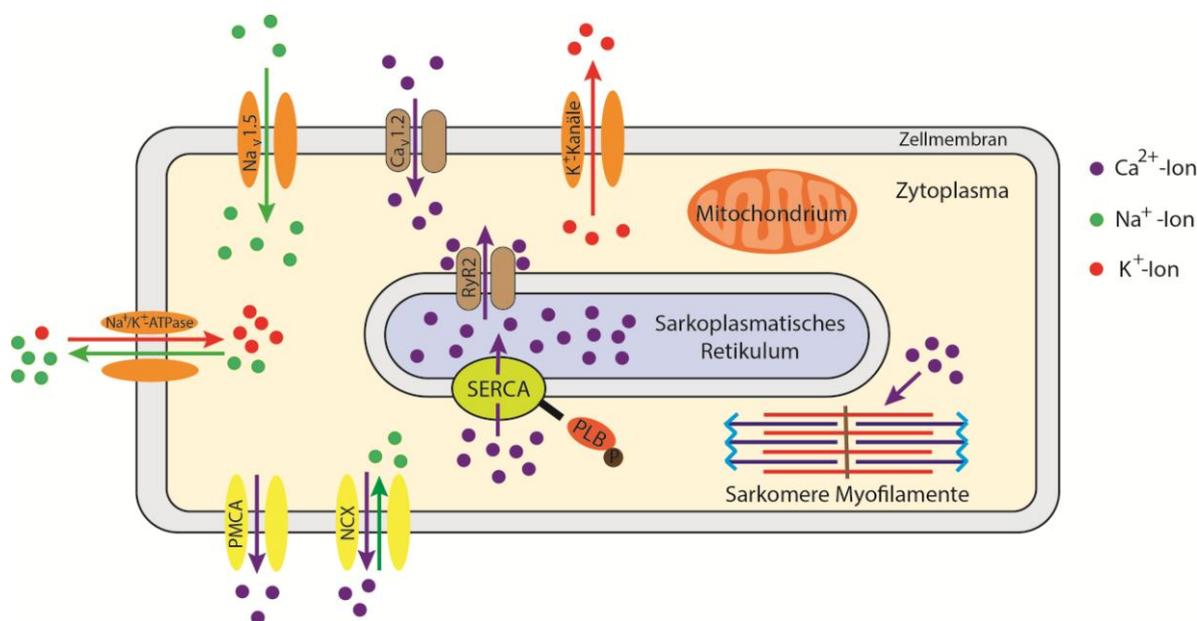


Abbildung 1, Zentrale kardiale Ionenkanäle zur Erregungsleitung und elektromechanischen Kopplung

Der spannungsabhängige Natriumkanal Na_v1.5 öffnet sich durch Depolarisation der Zellmembran, ausgelöst durch eine angrenzende depolarisierte Zelle. Einströmende Natriumionen lassen weitere Natriumkanäle sowie spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_v1.2) öffnen. Das einströmende Kalzium aktiviert den Ryanodinrezeptor 2 (RyR2), welcher den Ca²⁺-Einstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verstärkt. Durch das sich schließende IFM-Motiv der Natriumkanäle, den Rücktransport des Kalziums durch die Kanäle SERCA, NCX und PMCA in die ursprünglichen Kompartimente, sowie durch den Ausstrom von Kaliumionen durch verschiedene Kaliumkanäle, stellt sich nach einer Depolarisation rasch wieder das ursprüngliche Verhältnis der Ionen ein. Die Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) sorgt für einen stetigen Rücktransport der verschobenen Ionen. Das ATP wird von den Mitochondrien generiert und die mechanische Kopplung findet Ca²⁺-vermittelt an den sarkomeren Myofilamenten statt. Die Abbildung basiert auf. [5, 7-10, 12-14]

Von der Ca^{2+} - / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaM-Kinase II) weiß man, dass diese im aktivierten Zustand verschiedene weitere Proteine im Herzen aktiviert und damit lange Signalkaskaden in Gang bringen kann. Hierzu gehören Proteine, welche bei der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, Proteine der Apoptoseregulation und Proteine der Transkriptionsregulation im Rahmen einer Hypertrophie und auch bei Entzündungen. Bei übermäßiger Aktivität der CaM-Kinase II wurden vermehrt Herzinsuffizienzen und Herzrhythmusstörungen beobachtet. Da diese Regulationsmechanismen typischerweise auch bei SPRED2 KO Mäusen verändert sind wurde hiermit der mögliche Einfluss einer unterschiedlichen CaM-Kinase II Aktivität mittels Phosphorylierungsstatus untersucht. Die CaM-Kinase II liegt im phosphorylierten Zustand aktiviert vor und im dephosphorylierten Zustand deaktiviert. [15]

Gap-Junctions bilden Zell-Zell-Kontakte zum direkten Austausch von Ionen und kleinen Molekülen bis ca. 1 kDa aus. Sie bestehen aus zwei Connexonen (Halbkanälen), welche wiederum aus sechs Connexinen bestehen. Im Herzen gibt es drei zentrale Connexin-Typen, welche nach Ihrer Masse in kDa definiert sind (Connexin 40, 43, und 45). Connexin 40 findet man vor allem in den Vorhöfen, Connexin 43 hauptsächlich im Ventrikelmyokard und Connexin 45 in den Zellen des Reizleitungssystems. [16]

Eine der möglichen Ursachen für die veränderte Reizweiterleitung im Oberflächen-EKG ist eine Störung im Bereich der Reizüberleitung der Zell-Zell-Kontakte. Deshalb wurde in dieser Arbeit exemplarisch das Connexin 43 untersucht, da es vor allem im eigentlichen Ventrikelmyokard exprimiert wird und somit einen großen Anteil der Connexine repräsentiert.

1.3 Elektrokardiogramm

Die elektrophysiologischen Vorgänge am Herzen lassen sich mittels Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) als Kurve darstellen. Die Ionenverschiebungen im Herzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unterschiedlichen Orten lassen an der Körperoberfläche regelmäßige Spannungsunterschiede von über einem Millivolt entstehen. Mit einem entsprechenden Verstärker, bei zeitlich guter Auflösung, lässt sich somit eine kontinuierliche Kurve erstellen, welche eine charakteristische Form zeigt und die verschiedenen Kanal-Ströme auf unterschiedliche Teile des Herzens indirekt widerspiegelt.

Je nachdem zwischen welchen Punkten am Körper man eine Potentialdifferenz bestimmt, erhält man unterschiedliche Kurven, in Analogie zum entsprechend vorherrschenden elektrischen Vektor. Die am häufigsten für reine Rhythmusanalysen verwendete Ableitung ist die Ableitung „Einthoven II“. Diese erhält man bei Erstellung einer Potentialdifferenzmessung zwischen dem distalen rechten Unterarm und dem distalen linken Unterschenkel. Weitere Standard-Ableitungen nach Einthoven, Goldberger oder Wilson sind möglich und werden auch an anderen Körperstellen bestimmt.

Ein exemplarischer EKG-Zyklus in der Ableitung Einthoven II enthält folgende Abschnitte: Die P-Welle, den QRS-Komplex, die T-Welle und die Strecken dazwischen. Dabei steht die P-Welle für die Erregung der Vorhöfe und kann je nach Form, Dauer und Amplitude Hinweise auf Vorhoferkrankungen liefern. Der QRS-Komplex stellt die Erregungsausbreitung der Kammern dar und kann wie die P-Welle ebenfalls mithilfe der Form, Dauer und Amplitude Hinweise auf Erkrankungen der Ventrikel liefern. Die T-Welle ist Ausdruck für die Repolarisation der Ventrikel, wenn der Kalium-Ausstrom stattfindet. Bei irregulärem Aussehen der T-Welle können verschiedene Pathologien im Bereich der Ventrikel vorliegen. Die PQ-Strecke ist definiert als der Abschnitt zwischen dem Beginn der P-Welle und dem Beginn des QRS-Komplexes. Aus ihr kann man unter anderem Hinweise auf Reizleitungsstörungen erhalten. Die ST-Strecke beschreibt den Abschnitt zwischen Ende des QRS-Komplexes und Beginn der T-Welle. Hier können zum Beispiel Hinweise auf eine Myokard-Ischämie oder Elektrolytverschiebungen vorliegen. Die QT-Zeit beschreibt die Zeit zwischen dem Beginn des QRS-Komplexes und dem Ende der T-Welle. Sie muss anhand von Tabellen auf die aktuelle Herzfrequenz korrigiert werden. Bei übermäßiger Dauer besteht ein Defizit der Repolarisation des Kammermyokards und es können maligne Herzrhythmusstörungen eintreten. [17]

Das murine Elektrokardiogramm unterscheidet sich in einigen Details deutlich von dem eines menschlichen EKGs. Vor allem die Größenunterschiede machen sich in einigen Parametern deutlich bemerkbar. So haben Mäuse eine spontane Ruheherzfrequenz von 400-600 Schlägen pro Minute. Diese ist allerdings während der Messung durch die parasympathische Wirkung der Narkotika etwas herabgesetzt. Desweiteren macht sich die schnelle Herzfrequenz vor allem in einer Verschmälerung, sowie einer verringerten Amplitude des QRS-Komplexes bemerkbar, welcher durchschnittlich nur etwa 20 ms dauert. Auffällig ist zudem der Übergang von QRS-Komplex in die T-Welle. Hierbei geht die S-Zacke des QRS-Komplexes direkt in die T-Welle über, wobei man den Umschlagpunkt auch J-Punkt nennt. Somit liegt im Gegensatz zum menschlichen EKG keine isoelektrische ST-Strecke vor. Die T-Welle ist im murinen

EKG deutlich amplitudenschwächer und meist negativ ausgeprägt. Das murine EKG ähnelt somit prinzipiell im Aufbau dem menschlichen, auch wenn es signifikante Unterschiede aufzeigt. [18-21]

Humanes Beispiel-EKG

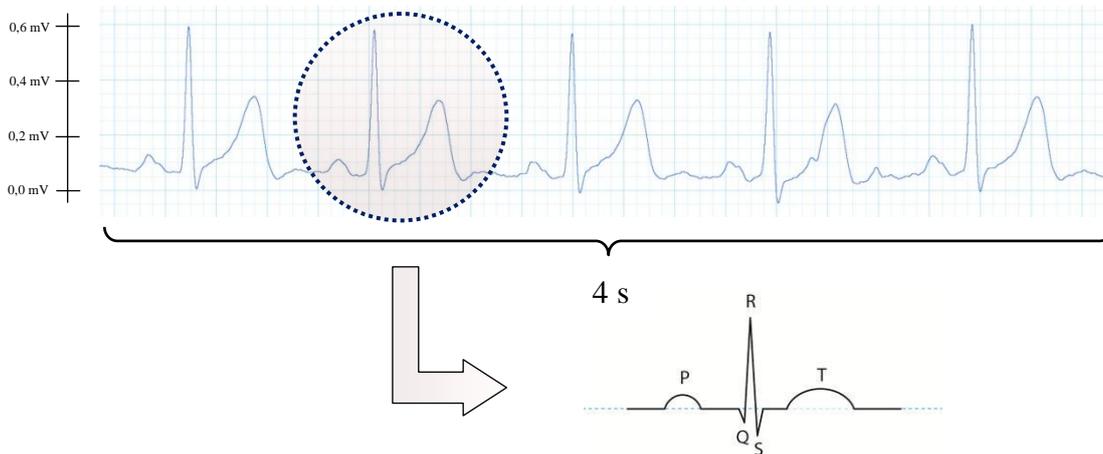


Abbildung 2, Beispiel EKG des Menschen in der Ableitung Einthoven II

Während der 4 Sekunden finden sich 5 Kammerkomplexe als Ausdruck einer Herzfrequenz von 75 Schlägen pro Minute. In der Ableitung Einthoven II lassen sich in der schematischen Vergrößerung eines Zyklus die nacheinander folgenden Abschnitte von P-Welle, QRS-Komplex und positiver T-Welle erkennen.

Murines Beispiel-EKG

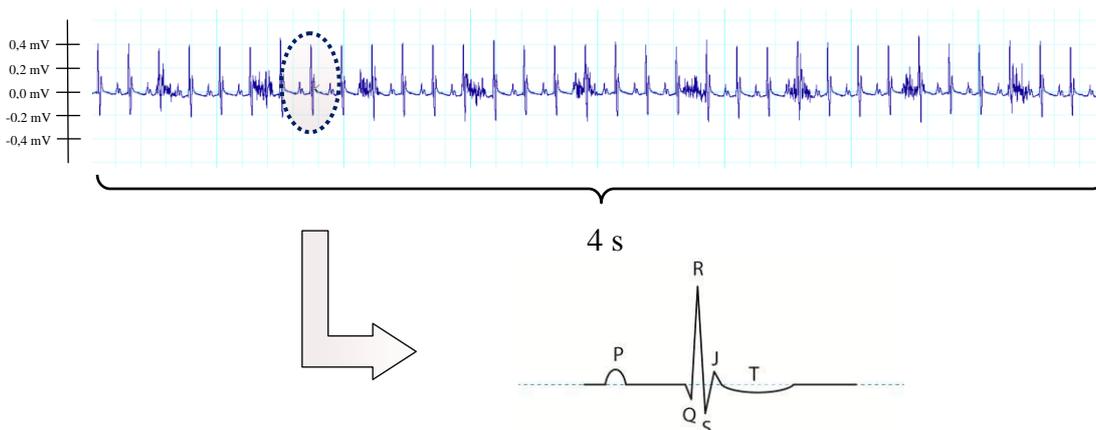


Abbildung 3, Beispiel EKG der Maus in der Ableitung Einthoven II

Dargestellt sind 34 Kammerkomplexe eines Maus-EKG, was einer Herzfrequenz von etwa 510 Schlägen pro Minute entspricht. In der Vergrößerung ist ein Zyklus schematisch dargestellt. Man erkennt im Vergleich zum humanen EKG vor allem einen direkten Übergang des QRS-Komplexes in die negative T-Welle.

1.4 Herzrhythmusstörungen

Ein normaler Herzrhythmus ist durch eine regelmäßige Abfolge der elektrischen Erregung mit nachfolgender Myokardkontraktion, beginnend vom Sinusknotenareal über die Vorhöfe, den AV-Knoten, das weitere Reizleitungssystem, der Kammermyokardkontraktion und letztendlich einer Repolarisation aller beteiligten Zellen gekennzeichnet. Im Elektrokardiogramm stellt sich dies als regelmäßige P-Welle mit nachfolgendem QRS-Komplex und abschließender T-Welle dar. Eine gewisse Frequenzvariation ist physiologisch und atemabhängig. Bei Abweichen der normalen Frequenz oberhalb von 100 Schlägen / min oder unterhalb von 60 Schlägen / min spricht man von tachykarden oder bradykarden Herzrhythmusstörungen. Bei unregelmäßigen Erregungen im Bereich zwischen 60 und 100 Schlägen / min spricht man von normofrequenten Herzrhythmusstörungen. [22, 23]

1.5 Plötzlicher Herztod

Ein Todesereignis, bis eine Stunde nach Beginn der ersten Symptome, welches durch plötzlich aufgetretene Herzrhythmusstörungen verursacht wurde, bezeichnet man als plötzlichen Herztod. [24-26] Retrospektiv lässt sich häufig nicht beurteilen, ob eine primäre Rhythmusstörung für den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht werden kann oder ob andere Gründe für einen Herz-Kreislauf-Stillstand vorlagen. [27] Häufig liegen auch mehrere Faktoren vor, die letztendlich in einer malignen Herzrhythmusstörung enden und somit zum plötzlichen Herztod führen. [28] Zu diesen Faktoren zählen nachweislich unter anderem die Herzinsuffizienz, die Koronare Herzkrankheit, akute oder ältere Ischämien, angeborene Ursachen wie z.B. das Long-QT-Syndrom und andere Ionenkanaldefekte. [26]

1.6 Elektrophysiologische und hämodynamische Untersuchung

Sowohl bei Tieren, hauptsächlich zu Forschungszwecken, als auch in der Humanmedizin für Untersuchungs- und Interventionszwecke werden heutzutage regelmäßige herzkathetergestützte elektrophysiologische und hämodynamische Untersuchungen des Herzens vorgenommen. Hierzu kann man entweder eine Rechtsherzkatheter- oder eine Linksherzkatheteruntersuchung durchführen.

Bei einer Rechtsherzkatheteruntersuchung führt man über einen venösen Zugang, zum Beispiel über die Vena jugularis interna, einen speziellen und für die Fragestellung ausgewählten Katheter über die Vena cava superior bis in das rechte Herz ein. Hier können nun verschiedene Parameter, wie ein intrakardiales EKG oder Drücke, gemessen werden. Ebenfalls können elektrische Stimulationen abgegeben werden und so das elektrophysiologische Verhalten des Herzens untersucht werden. Spezielle Kathetersysteme kann man weiter bis in die Pulmonalarterien einführen und dort für bestimmte Fragestellungen, mit Hilfe eines kleinen Ballons, den Verschlussdruck messen, welcher auch Wedge-Druck genannt wird. [29]

Das zweite Verfahren der Herzkatheteruntersuchung ist die Linksherzkatheteruntersuchung. Bei der Linksherzkatheteruntersuchung führt man über einen arteriellen Zugang, meist über die Arteria radialis oder die Arteria femoralis, ebenfalls einen speziellen und für die Fragestellung ausgewählten Katheter über die Aorta bis zum linken Herzen ein. Auch bei der Linksherzkatheteruntersuchung können ein intrakardiales EKG sowie Drücke gemessen werden. Beim Menschen wird diese Untersuchung häufig bei Verdacht auf eine Koronare Herzerkrankung durchgeführt und speziell die Herzkranzarterien sondiert, welche mit Hilfe von Kontrastmittel und radiologischer Bildgebung dargestellt und je nach Interventionsbedarf aufgedehnt oder zum Beispiel mit Stents versorgt werden können. [30]

Bei der murinen Herzkatheteruntersuchung, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, waren vor allem die links-kardialen Drücke und Volumina das Ziel der Untersuchungen. Die Bestimmung des Herz-Zeit-Volumens folgt bei Mäusen und Menschen einem unterschiedlichen Prinzip. Beim Menschen wird das Herz-Zeit-Volumen bei Intensivpatienten meist mittels der bewährten aber invasiven Thermodilutionsmethode in Kombination mit einer arteriellen Puls-konturanalyse, beispielsweise mittels PiCCO-Katheter, bestimmt. Hierfür wird über einen venösen Katheter eine definierte Menge gekühlte Kochsalzlösung appliziert und im arteriellen System die Temperaturveränderung über die Zeit bestimmt. Anhand der Temperaturkurve der Temperatursonde und weiteren patientenspezifischen Daten kann man das Herzzeitvolumen

mittels einer Formel berechnen. Eine ungenauere aber einfacher verfügbare Methode ist die Echokardiografie, alternativ kann man das Herz-Zeit-Volumen auch nach dem Prinzip von Adolf Fick aus den Sauerstoffsättigungswerten aus arteriellem und gemischt venösem Blut, sowie der Sauerstoffaufnahme mittels Spirometrie berechnen. Weitere, vor allem auch nicht invasive Methoden, stehen heutzutage immer mehr zur Verfügung. [31-33] Bei Mäusen sind die Methoden noch relativ beschränkt. Nichtinvasive Methoden mittels Ultraschall sind zwar verfügbar aber nicht so genau wie die invasiven Methoden. Der Goldstandard bei Mäusen ist weiterhin die invasive Volumenbestimmung mittels Leitfähigkeitsmessung im Ventrikel, mit dem Vorteil direkt zusätzlich die zeitabhängigen Ventrikelvolumina zu erhalten und eine Druck-Volumen-Kurve erstellen zu können. [34, 35]

1.7 Transverse aortic constriction

Durch eine künstlich erzeugte Nachlaststeigerung sollen die Adaptionseffekte der SPRED2 defizienten Mäuse untersucht werden und generelle genetisch bedingte Auswirkungen auf das Kammermyokard stärker hervortreten.

Die „Transverse aortic constriction“ (TAC) im Mausmodell ist eine experimentelle und operative Methode zur Induktion einer Nachlaststeigerung und dadurch bedingter Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Operativ wird eine künstliche Konstriktur der Aorta transversa zwischen den Abgängen der rechten und linken Halsgefäße geschaffen. Anfangs führt die gesteigerte Nachlast im Experiment zu einer gesteigerten Kontraktilität und somit zu einer kompensierten Herzhypertrophie. Im Verlauf dilatieren die Ventrikel weiter und es kommt in der Regel zu einer Dekompensation mit manifester Herzinsuffizienz. [36]

1.8 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen in fast allen Zellen des menschlichen Körpers. Sie haben viele verschiedene Funktionen, unter anderem stellen sie das Reaktionskompartiment des Citratzyklus und der Betaoxidation zur Verfügung, haben eine starke Rolle bei der Regulierung des zytoplasmatischen Kalziums, sind beteiligt bei der Synthese von Membranlipiden sowie Eisen-Schwefel-Clustern und regulieren unter anderem die Apoptose und die Produktion von

„Reactive oxygen species“ (ROS). Eine weitere wichtige und zentrale Funktion ist die Atmungskette, welche in dieser Arbeit mit untersucht wurde. Mit der Atmungskette nutzen die Mitochondrien die aus $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 gelieferte Energie zur Generierung von ATP.

Die Atmungskette setzt sich zusammen aus den Komplexen I, II, III und IV, sowie aus der ATP-Synthase. Komplex I bis IV nehmen in Summe energiereiche Elektronen sowie Protonen von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 auf und bilden im letzten Schritt zusammen mit Sauerstoff letztendlich H_2O -Moleküle. Die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen in den Intermembranraum der Mitochondrien zu befördern und somit einen Gradienten aufzubauen. Dieser energiereiche Ionengradient wird nun von der ATP-Synthase wiederum zur Gewinnung von ATP aus ADP und freiem Phosphat (Pi) genutzt. [37]

Die Atmungskette kann physiologisch oder medikamentös entkoppelt werden, was dazu führt, dass der Protonengradient im Intermembranraum unter Umgehung der ATP-Synthase abgebaut wird und somit zwar Wärme frei wird, aber kein nutzbares ATP erzeugt werden kann. Physiologisch findet dieser Vorgang bei Neugeborenen und Säuglingen im braunen Fettgewebe statt, da Kinder in diesem Alter ohne diesen Mechanismus keinen genügend großen Stoffwechsel für die notwendige Wärmegewinnung besitzen. [38] Zur Untersuchung der Maximalkapazität von Komplex I, II, III und IV kann die Atmungskette auch mittels Dinitrophenol künstlich entkoppelt werden. [39]

1.9 SPRED

„Sprouty-related proteins with EVH-1 domain“ (SPREDs) sind membranständige Inhibitoren der wachstumsfaktorassoziierten ERK-Aktivierung. SPRED-Proteine inhibieren durch die regulatorische Aktivität im Ras/Raf/MAPK-Signalweg, welcher eine wichtige Rolle für Wachstum und Differenzierung spielt, indirekt verschiedene extrazellulär bindende Faktoren. Dazu zählen unter anderem Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF, VEGF), Zytokine und Chemokine. Am ehesten findet die regulatorische Funktion zwischen den Proteinen Ras und Raf oder noch einen Schritt vorher zwischen der Aktivierung durch die Rezeptorthyrosinkinasen (RTK) und Ras statt. SPRED1 und auch SPRED2 binden an Neurofibromin, welches ebenfalls inhibitorisch auf die Ras-Aktivierung wirkt, und scheinen dieses zu stabilisieren. [40, 41]

SPRED-Proteine bestehen aus drei Domänen, einer N-terminalen EVH1-Domäne, einer zentral gelegenen c-Kit-bindenden Domäne und einer Sprouty-assoziierten Domäne am C-terminalen Ende. Es gibt aktuell insgesamt drei verschiedene beschriebene SPRED-Proteine im Säugetier (SPRED1, SPRED2 und SPRED3). [41, 42] Bei Funktionsverlust konnte in SPRED2-defizienten Mäusen unter anderem Minderwuchs, auffälliges Verhalten, sowie eine Fibrosierung und eine Hypertrophie des Ventrikelmyokards gezeigt werden. [42, 43] In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Protein SPRED2 untersucht.

Wachstumsfaktoren sowie weitere Liganden binden am extrazellulären Teil der Rezeptorthyrosinkinase und bringen diese durch Dimerisierung zur intrazellulären Autophosphorylierung. Durch die Phosphorylierung lagern sich die Adaptermoleküle Shc und Grb2 an die RTK an und ermöglichen die Bindung des Austauschfaktors Sos. Infolge dessen wird die GTPase Ras aktiviert, welche in einem weiteren Schritt die Proteinkinase Raf phosphoryliert und somit eine Phosphorylierungskaskade über MEK 1/2, ERK 1/2 auslöst, welche im aktivierten Zustand in den Zellkern translozieren kann. Im Zellkern werden durch ERK 1/2 verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFs) phosphoryliert, welche wiederum die Transkription entsprechender Gene regulieren und anpassen. [44-48]

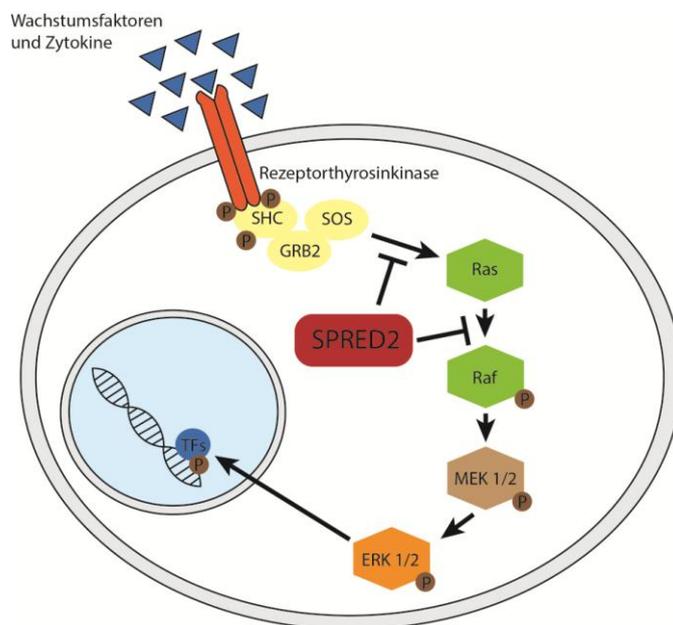


Abbildung 4, Signalkaskade des Raf / Ras / MAP-Kinase Signalweges und Bindungsstellen von SPRED2

Die membranständige Rezeptorthyrosinkinase wird durch extrazelluläre Bindung von Wachstumsfaktoren aktiviert, dimerisiert und intrazellulär autophosphoryliert. Die Adaptermoleküle Shc und Grb2 können sich dadurch anlagern und es bindet der Austauschfaktor Sos. In einer folgenden Kaskade werden Ras, Raf, MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert, letztere migriert in den Zellkern und reguliert dort verschiedene Transkriptionsfaktoren (TFs) in ihrer Aktivität durch Phosphorylierung. SPRED2 wirkt hemmend auf die Aktivierung von Ras und Raf. Die Abbildung basiert auf [49].

1.10 Phänotypische Eigenschaften der SPRED2-KO Maus

SPRED2-KO Mäuse oder auch SPRED2^{-/-}-Mäuse genannt, zeigen einige phänotypische Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtypmäusen, SPRED-WT-Mäuse oder auch SPRED2^{+/+}-Mäuse genannt.

Vor allem kardiale und neuronale Veränderungen sind besonders auffällig, außerdem fallen ein genereller Minderwuchs, veränderte hormonelle Regelkreise und weitere Organmanifestationen in allen Organen auf, in denen SPRED2 eine zentrale Rolle spielt. [49, 50] Nachweisen konnte man die Existenz von SPRED2 bisher vor allem in den Geweben von Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Haut und im Gastrointestinaltrakt, in geringer Menge kommt SPRED2 nach bisheriger Kenntnis aber in allen Geweben von Mäusen vor. [51]

Der Funktionsverlust des murinen SPRED2-Gens führt im Herzen zu einer kompensierten Hypertrophie, welche ohne Reaktion des Blutdrucks einhergeht. Gleichzeitig finden im Myokard Fibrosierungsvorgänge statt. Desweiteren ist die kardiale Reizleitungsgeschwindigkeit vermindert und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen mit durchschnittlich früherem Sterbealter erhöht. [42]

1.11 Herkunft Mauslinie

Zur Untersuchung menschlicher Proteine und damit verknüpfter Krankheiten benötigt man ein möglichst ähnliches genetisches Modell, welches in Anatomie, Physiologie, Verhalten und auch Erkrankungen dem Menschen ähnelt. Relativ nahe kommen diesem Modell Mäuse, da sie wie der Mensch zu den Säugetieren gehören und durch ihre Größe und kurze Reproduktionszeit zudem deutlich einfacher zu halten und zu erforschen sind als andere Säugetiere. [52]

Die in dieser Arbeit erforschten homozygoten SPRED2-Knockout Mäuse wurden aus heterozygoten Mäusen gekreuzt. Der embryonalen Stammzellklon XB228 (BayGenomics RRID:CVCL_PG99) wurde ursprünglich mithilfe der „Gene-trap“-Methode erzeugt. Mithilfe der embryonalen Stammzellen wurden chimere Mäuse erzeugt und mit der Wildtyp-Mauslinie C57Bl/6 J zu heterozygoten Tieren gekreuzt. Zur weiteren Kreuzung zu homozygoten Knockout-Mäusen wurden die Stämme 129/Ola und C57Bl/6 verwendet.

Primär bei der Generierung der ursprünglichen Stammzelle wurde ein zusätzliches „ β -geo-“ Gen, sowie eine anschließende SV40-Polyadenylierungssequenz einmal zwischen Exon 4 und Exon 5 des SPRED2-Gens inseriert. Dieser zusätzliche Gen-Abschnitt codiert für das Fusionsgen β -Galaktosidase und eine Neomycinresistenz und steht durch die Inserierung in das SPRED2-Gen unter dem Einfluss des SPRED2-Promotors, die SV40-Polyadenylierungssequenz stoppt die Transkription des Gens. Das Protein β -Galaktosidase und die Neomycinresistenz können zur Selektion der Zellen und zur Anfärbung des Promotor-Gen-Produktes im Gewebe verwendet werden. Die SV40-Polyadenylatsequenz ist dafür verantwortlich, dass das funktionelle Ende des SPRED2 Gens mit Exon 5 und Exon 6 nicht transkribiert und somit ausgeschaltet wird. [49, 53]

Sowohl die Tierhaltung als auch die Versuche mit den Tieren wurden nach europäischen Richtlinien (2010/63/EU), nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken und mit der Tierversuchsnummer „AZ 55.2 2532-2-390“ durchgeführt.

1.12 Klinischer Bezug

Von SPRED1 und auch SPRED2 ist schon länger bekannt, dass sie eine relevante Rolle bei der Entstehung und Metastasierung eines hepatozellulären Karzinomes (HCC) spielen und hierbei im Falle einer Funktionsminderung als prognostisch ungünstiger Parameter gelten. [54] Einflüsse auf die Entstehung weiterer Tumorentitäten und die Invasivität werden vermutet. [55-58]

Die unter dem Namen „Legius-Syndrom“ bekannte Krankheit wird durch eine „loss-of-function“ Keimbahnmutation im SPRED1 Gen hervorgerufen. Hierbei zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei der bekannten „Neurofibromatose Typ 1“, ebenfalls eine Rasopathie. Das Legius Syndrom geht typischerweise mit multiplen Café-au-lait Flecken und teilweise mit zusätzlichen sommersprossenartigen Flecken in der Achselhöhle oder Leiste einher. Es können auch eine Makrozephalie und kognitive Einschränkungen mit dem Syndrom einhergehen. [59]

Weitere verwandte Rasopathien mit zerebralen und kardialen Defiziten sind beispielsweise das Noonan-Syndrom und das Costello-Syndrom. Diese ähneln eher dem Phänotyp des murinen SPRED2-Knockouts. [60, 61]

Erst seit kurzem sind die ersten Menschen mit homozygotem SPRED2-Defekt bekannt. Dabei wurden erstmals vier Personen aus drei Familien mit jeweils unterschiedlich veränderten Gen-Varianten beschrieben. Es scheint hierbei einen großen Unterschied zu machen, an welcher Stelle und mit welcher Qualität eine Mutation im SPRED2-Gen vorhanden ist. Alle vier untersuchten Personen zeigen folgende gemeinsame Auffälligkeiten: Entwicklungsverzögerung, geistige Retardierung, myokardiale Veränderungen wie eine hypertrophe Kardiomyopathie, Kleinwuchs, Skelettanomalien und eine typische aber vom Legius-Syndrom abweichende Gesichtsform. [53]

1.13 Ziel der Arbeit

Von Ullrich et al. und Anne Marie Augustin [42, 62] wurden unter anderem EKG-Veränderungen und Herzrhythmusstörungen der SPRED2 KO Mäuse beschrieben und klassifiziert. Bislang unklar sind die Ursache für die Störungen und der Mechanismus auf Proteinebene. Hierzu wurden in dieser Arbeit verschiedene Ionenkanäle im Ventrikelmyokard und weitere in Frage kommenden Proteine mit zentralen Aufgaben im Reizleitungssystem des Herzens untersucht.

Es wurden primär funktionelle Untersuchungen des Kalziumhaushalts und Membranpotentials, sowie des Kontraktionsverhaltens von stimulierten Kardiomyozyten mit Hilfe der IonOptix-Apparatur durchgeführt. Desweiteren wurden Western Blots und Histoimmunfärbungen der zu untersuchenden Proteine angefertigt. In einem weiteren Schritt wurde auch die Funktion der Mitochondrien untersucht. Im speziellen wurden die Funktion der Atmungskette mittels des Membranpotentials und des Sauerstoffverbrauchs untersucht, sowie die Kalziumkapazität mittels MPTP-Assay und zytosolisches Cytochrom C bestimmt.

Parallel zu den Versuchen in vitro wurden auch hämodynamische Messungen in Kombination mit einer „Transverse aortic constriction“ Operation durchgeführt. Die Gesamtheit der Versuche soll zu einem ganzheitlichen Verständnis der kardialen Funktionsveränderungen der SPRED2 KO Mäuse führen.

2 Material und Methoden

2.1 In Vivo Versuche

Zur Untersuchung der Auswirkung des SPRED2 KO Genotyps auf die kardiale Funktion in vivo wurden hämodynamische Messungen mittels Ultraschall- und Linksherzkathetersonde durchgeführt. Einige Tiere wurden im Rahmen dieser Messungen auch mit einer „Transverse aortic constriction“ Operation behandelt und im festen Intervall von 21 Tagen nach dem Eingriff invasiv mittels Linksherzkathetersonde untersucht.

2.1.1 Transverse aortic constriction

2.1.1.1 Operationsfeld

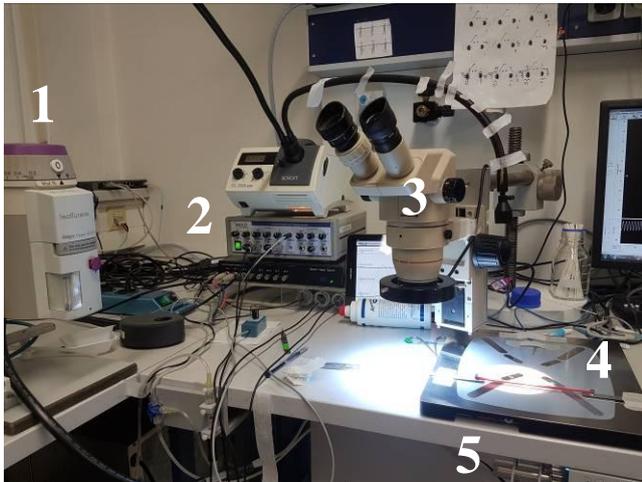
Im Vorfeld wurde das chirurgische Besteck, bestehend aus einer stumpfen Schere, gebogener Pinzette, spitzer Pinzette, gebogener Federpinzette, vier Haken mit Gummizügeln, einer 27G Kanüle und einem Nadelhalter sterilisiert. Sterile Tupfer, medizinisches Klebeband, ein dünnes Gummiband sowie Nahtmaterial wurden ebenfalls bereitgestellt.

Das Operationsfeld wurde unmittelbar vor dem Eingriff zuerst mit 70 % Ethanol gereinigt und desinfiziert und die Heizplatte auf eine Temperatur von 39 °C (± 1 °C) eingestellt. [36]

2.1.1.2 Narkose, Intubation und chirurgische Vorbereitung

Zur Analgesie wurden primär noch vor Narkoseeinleitung 0,1 mg / kg Körpergewicht Buprenorphin subcutan verabreicht. Die Mäuse wurden mit 2 % Isofluran und 0,5-1,0 L / min 100 % O₂ in einer Kammer anästhesiert. Anschließend wurden die Mäuse mit medizinischem Klebeband an allen vier Extremitäten mit dem Rücken auf der Heizplatte fixiert. Für die Intubation wurde der Oberkiefer mit einem dünnen Gummiband rekliniert, sodass man den Atemweg besser einsehen konnte. Mit der einen Hand und einer gebogenen Klemme wurde nun die Zunge zur Seite gehalten und mit der anderen Hand der Tubus endotracheal eingeführt. Die Beatmung wurde auf 125-150 Atemzüge / min mit einem Tidalvolumen von 7 μ l / g Körpergewicht eingestellt. Das Gasgemisch wurde während der Operation auf 2,5 % Isofluran mit 0,5-1,0 L / min 100 % O₂ erhöht. Die Narkosetiefe wurde mit ausgeübtem Druck auf das Nagelbett geprüft, dem sogenannten „toe-pinch-Reflex“. Anschließend wurde eine schützende Augensalbe aufgetragen und das Fell im Operationsgebiet rasiert und dieses im An-

schluss dreimalig mit Cutasept F desinfiziert. Zuletzt wurde eine passende sterile Abdeckung verwendet. [36]



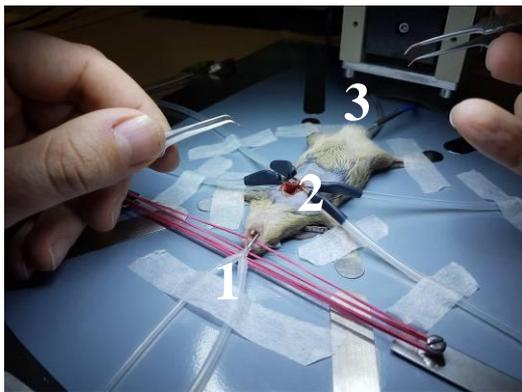
1. Narkosegas – Vaporisator
2. Messverstärker mit Ultraschallsonden
3. Binokulares Mikroskop
4. Operationsfeld mit EKG-Ableitung und Heizplatte
5. Beatmungsgerät für Kleinsäuger

Abbildung 5, Operations- und Untersuchungsaufbau für die TAC-OPs und hämodynamischen Messungen

Arbeitsplatz für die TAC-Operationen, hämodynamischen Untersuchungen und Dopplermessungen. Links im Bild (1) steht der Narkosegas-Vaporisator, welcher das Gas mit einem definierten Anteil an Sauerstoff und Raumluft an das Beatmungsgerät weiterleitet, welches sich rechts unten im Bild befindet (5). Im Hintergrund stehen die Messverstärker für die verschiedenen zu messenden Parameter, sowie das Ultraschallgerät mit den Sonden (2). Außerdem befindet sich oben darauf eine Leuchte, welche zusätzlich zum Mikroskop (3) den beheizten Operationstisch (4) beleuchtet.

2.1.1.3 Der Eingriff

Um zur Aorta zu gelangen musste nach dem Hautschnitt eine Teil-Thorakotomie bis zur dritten Rippe rechts parasternal vorgenommen werden. Dazu wurde mit einem chirurgischen Mikroskop und vier kleinen Haken gearbeitet. Mit einer feinen gebogenen Pinzette wurden vorsichtig die Thymuslappen und das Fettgewebe von der Aorta abpräpariert und die Haken so eingehängt und zur Seite gezogen, dass Thymus und Pleura unverletzt blieben. Nach Identifikation und Präparation der richtigen Stelle an der Aorta transversa zwischen Truncus brachiocephalicus und der Arteria carotis communis sinistra wurde ein schmales Stück eines 6/0 Seidenfadens mithilfe der 27 Gauge Kanüle um die Aorta transversa gebunden. Dazu wurden zwei lose Knoten vorgelegt und die Kanüle in den Knoten als Abstandshalter parallel eingeführt. Die Knoten wurden festgezogen und die Kanüle zügig entfernt, sodass eine Restöffnung von etwa 0,4 mm Durchmesser entstand. Die Haken konnten nun wieder entfernt werden und die Rippen sowie die Pektoralismuskeln wurden mit Prolene-Naht 6/0 mit Einzelknöpfen vernäht. Die Haut wurde ebenfalls mit Prolene-Naht 6/0 in fortlaufender Naht vernäht.



1. Beatmungstubus
2. vier Haken mit Gummizügeln zur Offenhaltung des Thorax mit freigelegter Aorta
3. Rektale Temperatursonde

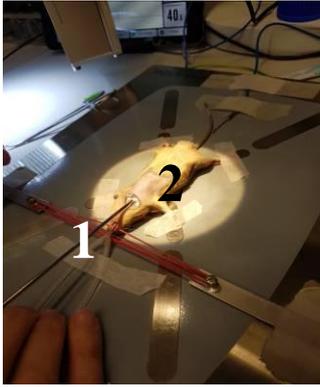
Abbildung 6, Operationsfeld während der TAC-Operation

Während der TAC-Operation befindet sich die narkotisierte Maus auf der beheizten Grundplatte, über welche auch ein kontinuierliches EKG abgeleitet wird. Die Maus wird zusätzlich über eine rektale Temperatursonde (3) überwacht, um ein Auskühlen zu verhindern. Im Maul befindet sich der endotracheal eingebrachte Beatmungstubus (1). Der Thorax der Maus wurde rasiert, thorakotomiert und die Aorta freigelegt. Zur besseren Darstellbarkeit wurden 4 sterile Haken mit Gummizügeln eingebracht (2).

2.1.1.4 Dopplermessung zur Effektivitätsbestimmung der Operation

Direkt nach dem Eingriff wurde die Narkosegaskonzentration auf 1,5 % Isofluran reduziert. Mit einer 20 MHz Dopplersonde wurden im 20 °-Winkel im Bereich des rechten und linken Nackens die Flussgeschwindigkeiten der jeweiligen Anteile der Halsgefäße (Arteria carotis communis dextra und Arteria carotis communis sinistra) bestimmt. Bei jedem Tier wurde aus den unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten je ein Quotient aus rechter Arteria carotis communis zu linker Arteria carotis communis berechnet.

Zusätzlich wurde mit einer 10 MHz-Sonde die Flussgeschwindigkeit im Bereich des Aortenbogens mit einem Dopplerwinkel von 0 ° bestimmt.



1. 10 MHz-Ultraschall-Sonde
2. rasierte, desinfizierte und in Narkose versetzte Maus vor der TAC-Operation

Abbildung 7, Dopplermessung der Aorta vor der TAC-Operation

Die Maus wurde für die TAC-Operation rasiert und in Narkose versetzt (2). Hierfür wurde sie beatmet und die Vitalfunktionen überwacht. Bevor die eigentliche Operation begann wurden mittels Ultraschallsonde (1) die Flussgeschwindigkeiten in Aorta und den Halsgefäßen gemessen.

2.1.1.5 Postoperatives Vorgehen

Im Frischgasflow der Beatmung wurde das Narkosegas abgedreht und die Mäuse wachten langsam auf der Heizplatte auf. Entsprechend der Eigenatmung und der Vigilanz wurden sie extubiert und zurück in ihren Käfig gelegt. [36]

In den zwei darauffolgenden Tagen wurden zur postoperativen Analgesie jeweils zwei Mal täglich weitere 0,1 mg / kg Körpergewicht Buprenorphin subcutan verabreicht.

2.1.2 Invasive Hämodynamik Untersuchung

Die hämodynamischen Messungen fanden sowohl an TAC-operierten Tieren, als auch an nicht operierten Tieren statt. Die TAC-Tiere wurden genau drei Wochen nach der TAC-Operation mittels invasiver hämodynamischer Messung untersucht.

Die Materialien und das chirurgische Besteck waren dieselben wie bei der TAC-Operation.

Zur hämodynamischen Messung des Volumens und der Drücke des linken Ventrikels wurden die Versuchstiere zunächst wie bei der TAC-Operation in Narkose versetzt und intubiert beatmet. Anschließend wurde die Narkose mit 1,5 % Isofluran für die Messungen aufrecht erhalten. Zusätzlich wurden 5 µg Pancuroniumbromid als Muskelrelaxans intraperitoneal verabreicht.

Bevor die invasive Diagnostik mittels Linksherzkatheter durchgeführt werden konnte, wurde, wie schon im Anschluss an die TAC-Operation, analog eine Doppleruntersuchung mittels Ultraschall der Arteria carotis communis dextra, der Arteria carotis communis sinistra und der Aorta durchgeführt.

Für die hämodynamische Messung musste ein spezieller Messkatheter in die Aorta und anschließend in den linken Ventrikel eingebracht werden. Hierzu wurden die narkotisierten Mäuse am rechten Halsbereich rasiert und mit Cutasept F desinfiziert. Anschließend wurde die Haut parallel zur Arteria carotis communis dextra eröffnet und die Arterie freipräpariert. Nun wurden insgesamt drei 8/0 Seidenfäden hinter der Arterie durchgeführt und der kraniale Faden bis zum Verschluss des Arterienlumens zugeknotet. Der kaudale Faden wurde leicht unter Zug genommen, bis die Arterie nicht mehr pulsierte. Der dritte Faden diente in Schlaufenform als Sicherheitsfaden. Kaudal des kranialen Fadens wurde die Arterie nun im 45°-Winkel auf einem Drittel des Außendurchmessers inzidiert und der Katheter mithilfe einer feinen Pinzette in das Lumen nach kaudal eingeführt. Sobald der Katheter am kaudalen Faden angekommen war, wurde die Arterie mit dem Sicherheitsfaden kranial des letzten Messrings des Katheters, also weiterhin kaudal des kranialen Fadens, leicht zugezogen, sodass bei einem weiteren Vorschub des Katheters in Richtung Aorta und linkem Herzen keine Leckage und somit Blutung entstehen konnte.

Die hämodynamischen Messungen wurden zuerst in der Aorta und im Anschluss im linken Ventrikel vorgenommen. Die korrekte Lage der Aorta ist gekennzeichnet durch einen konstanten Wechsel von systolischem und diastolischem Druck. Im linken Ventrikel hingegen fällt der diastolische Druck praktisch auf Null, gleichzeitig wird die Volumenamplitude im linken Ventrikel maximal.

Nach den invasiven Messungen musste das bestimmte Ventrikelvolumen noch mit Hilfe einer Messkammer kalibriert werden. Hierzu benötigt man etwa 600 µl Blut des Tieres. Um dabei den Katheter nicht zu beschädigen wurde dieser zuerst entfernt und dabei auf ein consequentes Abbinden der Arteria carotis communis dextra geachtet. Anschließend wurde das Abdomen mit Cutasept F desinfiziert und subdiaphragmal quer eröffnet. Durch einen kleinen Schnitt im Bereich des linken Diaphragmas erhält man Zugang zur Herzspitze, welche man nun mit einer 1 ml Spritze linksventrikulär punktieren und somit Blut gewinnen konnte. Nun wurde die temperierte Kalibrationsküvette mit dem entnommenen Blut befüllt und die Kalibrationswerte ermittelt. [63]

Es wurden insgesamt 14 Tiere mit SPRED2 WT und 12 Tiere mit SPRED2 KO für die hämodynamischen Messungen und die TAC-Operationen verwendet.

Für jedes Tier wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Flussgeschwindigkeit mittels Doppler-Messungen für die Arteria carotis communis dextra, für die Arteria carotis communis sinistra und den Aortenbogen, jeweils vor der TAC-Operation, direkt nach der TAC-Operation und drei Wochen später direkt vor der Messung mittels Linksherzkatheter.
2. Bei der Linksherzkathetermessung in der Aorta wurden Druckkurven erstellt und daraus die durchschnittliche Herzfrequenz, der maximale Blutdruck, der minimale Blutdruck, der durchschnittliche Blutdruck zwischen maximalem und minimalem Blutdruck, die Blutdruckamplitude und ein angenäherter mittlerer arterieller Blutdruck mit der Hilfsformel von $1/3$ -fach systolischen Blutdruck und $2/3$ -fach diastolischem Blutdruck, angenähert an das Durchschnittsintegral der Blutdruckkurve, berechnet. [64]
3. Bei der Linksherzkathetermessung im linken Ventrikel wurden ebenfalls Druckkurven erstellt, allerdings zusätzlich mit kalibrierten Volumenkurven, sodass man eine Druck-Volumen-Beziehung herstellen konnte. Dadurch konnten maximale, minimale, endsystolische und enddiastolische Drücke und Volumina bestimmt und weitere Parameter berechnet werden. Somit ließen sich auch das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen, die Ejektionsfraktion und die Änderungsgeschwindigkeiten berechnen.

2.2 In Vitro Versuche

2.2.1 Myozytenisolation zur Verwendung an der IonOptix mit dem „Calcium and Contractility System“

Zur Messung an der IonOptix mussten zuvor einzelne Myozyten isoliert werden. Hierfür wurde prinzipiell nach dem AfCS-Protokoll (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02) gearbeitet. Verwendete Lösungen sind im Pufferverzeichnis detailliert beschrieben.

Um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten, sowie eine Gerinnung des Blutes im Herzen während der Organentnahme zu verhindern, wurden etwa 10 Minuten vor dem Beginn der Maßnahme dem jeweiligen Versuchstier 200µl (2,4µg) Buprenorphin und 30µl Heparin (15 I.E., 1:10 verdünnt) s.c. verabreicht. Zur Narkoseeinleitung wurden primär 5 % und nach Narkoseeinleitung 1,5 % Isofluran mit reinem Sauerstoff verwendet. Nach erloschenem Zwischenzehenreflex wurden Abdomen und Thorax dreifach mit Cutasept F desinfiziert. Anschließend wurde der Thorax mit einem V-förmigen Schnitt vom Bauchnabel aus in Richtung Axillen gehend aufgeschnitten und das Zwerchfell eröffnet. Nachdem das Sternum nach oben geklappt war wurde das Herz sichtbar und konnte nun knapp unterhalb des Aortenbogens vom großen Kreislauf getrennt werden. Die restlichen Gefäße (Arteria und Venae Pulmonalis, sowie die Venae cavae) wurden nun ebenfalls durchtrennt und das Herz entnommen.

Zur Isolation der Myozyten wurde der Perfusionspuffer (siehe Pufferverzeichnis) verwendet. Die Stopppuffer 1, 2 sowie der Liberasepuffer wurden anschließend aus dem Perfusionspuffer angesetzt. Die entnommenen Herzen wurden nach der Entnahme jeweils direkt bei Raumtemperatur in 10 ml Perfusionspuffer gegeben und mit Hilfe einer feinen Pinzette von groben Blutresten gewaschen. Im Anschluss wurden die Herzen an die Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen. Diese wurde hierfür zuerst reichlich mit destilliertem Wasser gespült und anschließend wurde einer der Schenkel luftblasenfrei mit Liberasepuffer und der andere Schenkel mit Perfusionspuffer befüllt. Zum Anschluss an die Perfusionsanlage wurden die Herzen mit einer speziellen Metallkanüle an der Aortenwurzel so kanüliert, dass die Koronargefäße ebenfalls perfundiert werden konnten und die Kanüle nicht zu tief oder gar im linken Ventrikel lag. Die Kanüle wurde anschließend mit einem 5/0 Polyesterfaden festgeknotet. Das Prozedere wurde mittels Auflichtmikroskop durchgeführt und alles nicht notwendige Gewebe, welches sich jeweils noch am Herzen befand, wurde vorsichtig abpräpariert.

Die kanülierten Herzen konnten anschließend an die Perfusionsanlage angeschlossen und für 4 Minuten mit Perfusionspuffer gespült werden. Die Laufrate wurde dabei auf 2 ml / min und 37 °C eingestellt. Der anschließende Verdau der Zell-Zell-Kontakte mittels Liberasepuffer erfolgte ebenfalls bei 37 °C und 2 ml / min, allerdings für etwa 8 Minuten, so lange bis man eine morphologische Veränderung mit Schwellung und schlaff fahlem Aussehen der Herzen erkennen konnte.

Nun wurden die Ventrikel mit einer Schere von den Vorhöfen abgeschnitten und in 5 ml Perfusionspuffer überführt. Im Anschluss wurde das Gewebe mit einer Schere vier Mal eingeschnitten und in ein neues Gefäß mit 5 ml Perfusionspuffer und 5 ml Stopppuffer 1 gebracht. Fünf Minuten wurde die Lösung zur Durchführung der gewünschten Zelltrennung vorsichtig geschwenkt und anschließend anhand eines Tropfens am Durchlichtmikroskop die Ausbeute kontrolliert. Das Qualitätsindiz war vor allem das Aussehen der Kardiomyozyten, sie sollten eine sichtbare Querstreifung aufweisen und stabförmig erscheinen. War die Ausbeute in Anzahl und Qualität ausreichend konnte das restliche Herz verworfen werden. Die Zellen wurden zusammen mit der Lösung in ein 10 ml Falcon™-Röhrchen gegeben, sodass sie sich am Boden absetzen konnten. Nach etwa 10 Minuten waren die meisten Zellen zu einem Pellet am Boden gesunken und die restlichen Zellen wurden mit dem abgenommenen Überstand mit einer Zentrifuge für eine Minute bei 800 U / min vollends zu einem zweiten Pellet vereint. Beide Pellets wurden mit je 5 ml Stopppuffer 2 resuspendiert und zusammengeführt, in Summe also 10 ml der Lösung. Die Zellen mussten, um eine physiologische Funktionsweise zu zeigen, nun auch wieder einen physiologischen Kalziumhaushalt erreichen. Hierzu musste ein schrittweiser Kalziumaufbau durchgeführt werden, wobei nach jedem Schritt 4 Minuten gewartet wurde.

Schritt 1: Hinzufügen von 50 µl CaCl₂-Lösung 10 mM, das entspricht einer Kalziumendkonzentration von 62 µM.

Schritt 2: Hinzufügen von 50 µl CaCl₂-Lösung 10 mM, das entspricht einer Kalziumendkonzentration von 112 µM.

Schritt 3: Hinzufügen von 100 µl CaCl₂-Lösung 10 mM, das entspricht einer Kalziumendkonzentration von 212 µM.

Schritt 4: Hinzufügen von 30 µl CaCl₂-Lösung 100 mM, das entspricht einer Kalziumendkonzentration von 500 µM.

Schritt 5: Hinzufügen von 50 µl CaCl₂-Lösung 100 mM, das entspricht einer Kalziumendkonzentration von 1 mM.

Nach erneuten acht Minuten Inkubation und Sedimentation wurde der Überstand für eine Minute bei 800 U / min zentrifugiert und beide Pellets zusammen mit 25 ml der folgenden Lösung bei 37 °C resuspendiert:

Perfusionspuffer mit:

- 5 % FCS
- 1 % Penicillin und Streptomycin
- 1 % HEPES (kurz zuvor erst hinzugefügt)

Die Lösung wurde mit den Zellen im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Verwendung aufbewahrt. [65]

2.2.2 Einzelzell-Membranpotential-Messung mittels IonOptix

Zur Messung des Membranpotentials wurde ein Farbstoff namens „di-8-butyl-amino-naphthyl-ethylene-pyridinium-propyl-sulfonate“ (di-8-ANEPPS) verwendet, welcher sich in der Zellmembran in vitro lebender Kardiomyozyten anlagert und in Abhängigkeit des Membranpotentials sein Absorptionsverhalten ändert.

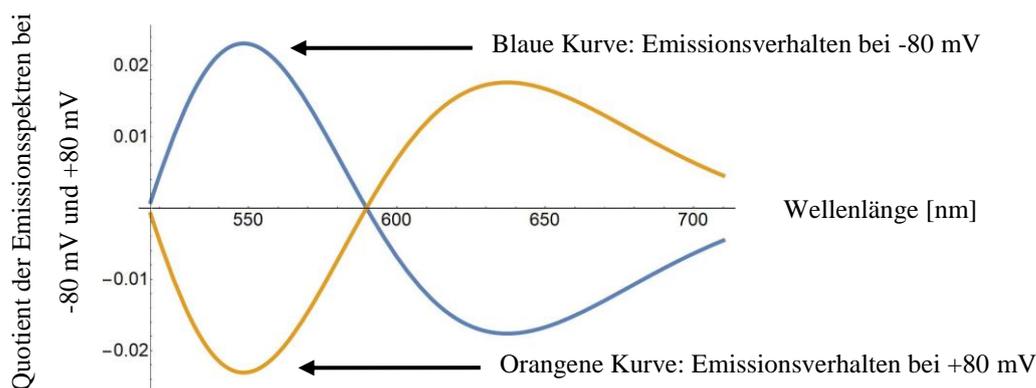


Abbildung 8, Emissionsverhalten von di-8-ANEPPS

Das abhängige Verhalten des Farbstoffs di-8-ANEPPS vom Membranpotential ist die Grundlage für dessen Messung. Bei niedrigem inneren Zellmembranpotential überwiegt die Emission bei 560 nm (blaue Kurve) und bei hohem inneren Zellmembranpotential die Emission bei 630 nm (orangene Kurve). Dargestellt ist die relative Emission als Quotient der beiden Emissionsspektren bei +80 mV und -80 mV. Die Abbildung wurde basierend auf [66] erstellt.

Besonders bei dem Fluoreszenz-Farbstoff di-8-ANEPPS ist das zweigipflige Emissionsverhalten in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 460 Nanometern und die Emissionsmaxima sind jeweils bei etwa 560 Nanometern und 630 Nanometern.

Bei niedrigem inneren Zellmembranpotential (z.B. -80 mV) ist die Emission bei 560 Nanometern deutlich gesteigert gegenüber der Emission bei 630 Nanometern. Umgekehrt verhält es sich bei hohen inneren Zellmembranpotentialen (z.B. +80 mV), hier ist die Emission vor allem bei 630 Nanometern ausgeprägt und bei 560 Nanometern minimiert [66].

Der Farbstoff lagert sich an der Zellmembran an und verändert seine Eigenschaften fließend in Abhängigkeit des Membranpotentials, sodass auch kleine Potentialunterschiede detektiert werden können ohne ein Alles-oder-Nichts Prinzip.

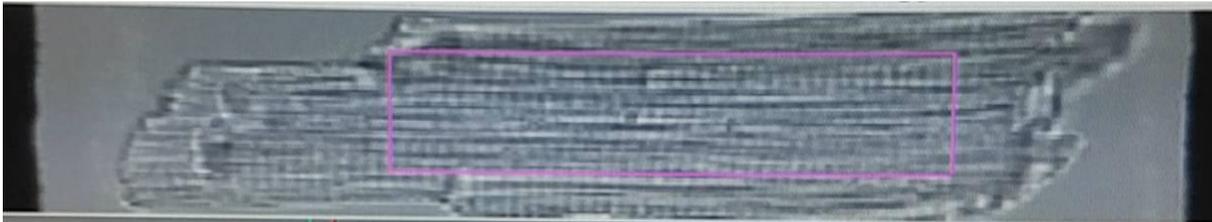


Abbildung 9, Ausschnitt einer fokussierten Kardiomyozyte im Aufnahme Fenster

Dargestellt ist das Aufnahme Fenster mit einer einzelnen Kardiomyozyte. Zu sehen ist das gesamte Fenster, welches auch für die Fluoreszenzaufnahmen und -analysen verwendet wird, sowie das pink umrandete Rechteck, welches den Bereich für die Sarkomerlängenmessung definiert. Die einzelnen Sarkomere lassen sich durch das Streifenmuster erkennen.

Detektiert wird mit zwei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig (Anregungsfilter: 340 ± 6 nm, Aufnahmefilter 1: 525/30 nm, Aufnahmefilter 2: 605/55 nm). Dadurch ergibt sich ein ratiomerisches Prinzip, welches erlaubt mit demselben großen Aufnahme Fenster verschieden große Zellen zu messen, da nur das Verhältnis der beiden Emissionsmaxima ausgewertet wird und nicht, wie bei einer Mono-Emission, der jeweilige Absolutwert herangezogen wird.

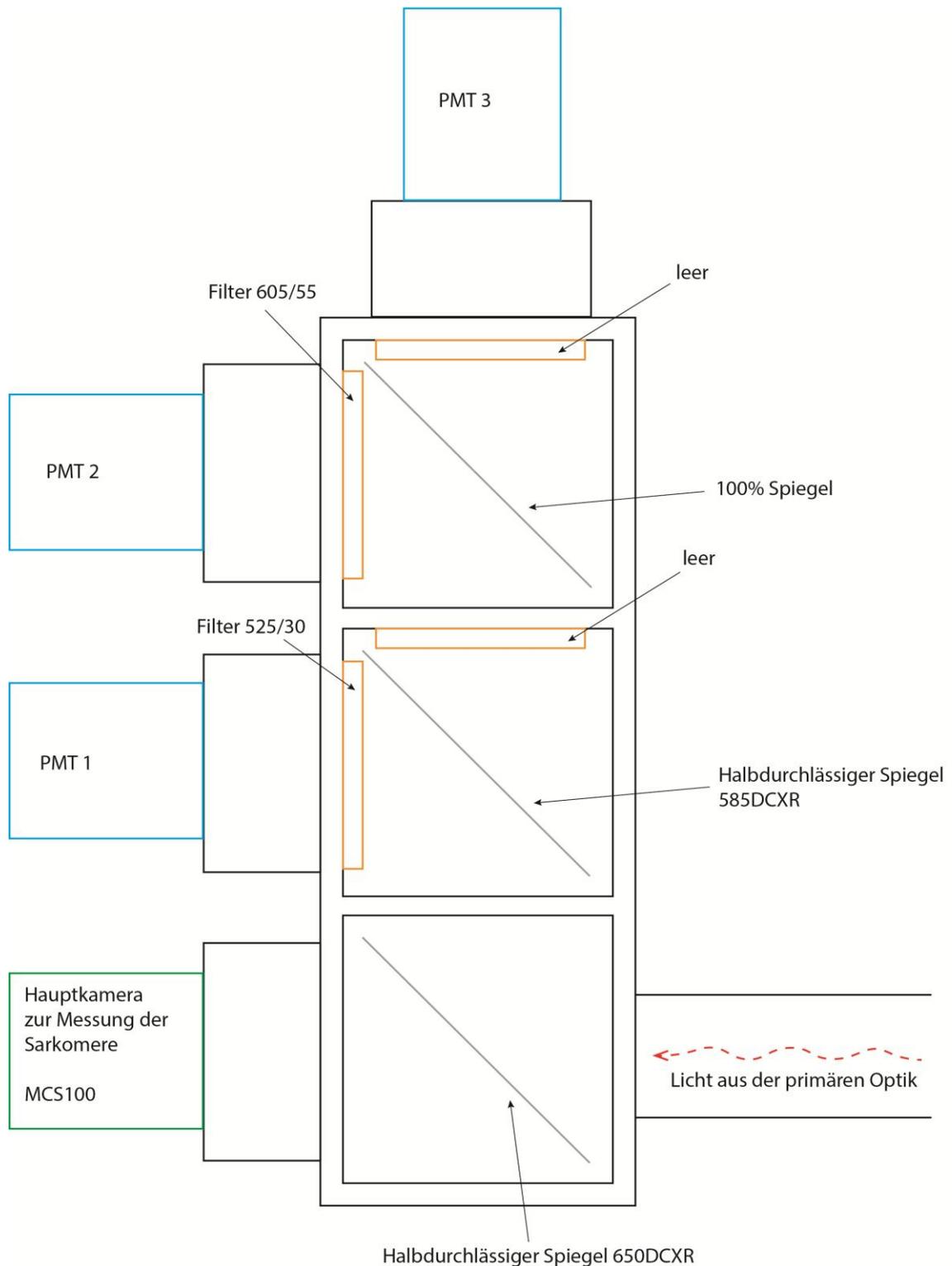


Abbildung 10, Anordnung der Filter und Spiegel in der IonOptix für die Messungen mit di-8-ANEPPS

Rechts unten im Bild ist der Eingang in das optische Aufnahmesystem dargestellt. Dort kommt das Licht von der primären Aufnahmeoptik und wurde bereits durch eine Blende im Bildfeld begrenzt. Das Licht wird durch mehrere halbdurchlässige Spiegel und Filter anhand der Wellenlänge auf die verschiedenen Kameras aufgeteilt. Dabei wurden für die Emission durch den Farbstoff di-8-ANEPPS zwei PMTs (Photomultiplier) benutzt und mit der Hauptkamera die Kontraktion während der Stimulationen überwacht.

Um die Zellen mit dem Farbstoff zu beladen und zur Messung vorzubereiten, wurden diese für fünf Minuten in einem 10 ml Falcon™-Röhrchen zur Sedimentation stehen gelassen. Nachdem die Kardiomyozyten zu Boden gesunken waren wurde das überstehende Medium abgenommen. Anschließend wurde 1 ml Tyrode mit 6 μM des Farbstoffs di-8-ANEPPS dazugegeben und für 20 Minuten flach hingelegt, um die freie Zelloberfläche zu vergrößern. Nach der eigentlichen Färbung wurde das Falcon™-Röhrchen erneut für fünf Minuten aufgestellt und anschließend der Überstand abgenommen und mit 1ml Tyrode resuspendiert. Nach jedem Schritt, sowie am Ende, wurden die Zellen in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gestellt und bis zur Messung aufbewahrt.

Aus jeder Zellisolation ließen sich zwischen zwei und vier getrennte Zellportionen färben. Aus jeder Färbung konnte man etwa drei Messzyklen mit je etwa drei bis vier Zellen durchführen, sodass je nach Qualität der Zellisolation und Zeitdauer des Versuchs bis zu 30 Zellen pro Isolation, und damit pro Tier, gemessen werden konnten.

Zur Messung wurde ein Deckglas mit Laminin beschichtet und mit einem Tropfen der Zellsuspension benetzt. Dieses wurde für etwa 10 Minuten im Dunkeln abgestellt, um den Zellen Zeit zum Anheften zu geben. Anschließend wurde das jeweilige Deckglas in die Messkammer der IonOptix Apparatur eingespannt und durch eine Heizapparatur auf 37 °C gebracht. Ebenso wurde die Nährlösung (Tyrode), mit welcher die Zellen kontinuierlich während der Messung unter langsamem Fluss versorgt wurden, auf 37 °C vorgeheizt. Um die Zellen elektrisch anzuregen wurden parallel zur Messkammer zwei stabförmige Elektroden angebracht, die im Medium der Tyrode zu liegen kamen und damit eine gute elektrische Verbindung hatten. Stimuliert wurde jeweils mit 40 V als Dual-Puls mit jeweils 5 ms Dauer.

Nach etwa zwei Minuten Adaption wurde mit dem Messprotokoll begonnen. Hierfür wurde eine lebende Zelle nach visuellen Kriterien ausgewählt. Nur Zellen, welche eine eindeutige Form einer Kardiomyozyte mit sichtbaren Sarkomeren und klar abgrenzbaren Zellgrenzen hatten, wurden als solche gewertet. Die jeweils ausgewählte Zelle wurde mit Hilfe von Positionsschrauben und einer Achsdrehung der Kamera in das Kamera- und Aufnahme Fenster bewegt, scharfgestellt und die Blende so eingestellt, dass alle Ränder der Zelle noch sichtbar im Fenster lagen.

Begonnen wurde mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz für etwa 30 Sekunden, danach mit 1,0 Hz für weitere 30 Sekunden und dann im Anschluss direkt für jeweils 20 Sekunden mit 2 Hz, 3 Hz, 4 Hz, 6 Hz und 8 Hz. Zusätzlich wurde am Ende einer jeden Zellmessung ein

Bereich auf dem Deckglas ausgewählt und für 20 Sekunden aufgenommen, der keinerlei Zellen oder Verunreinigungen erkennen ließ, um damit die Hintergrundfluoreszenz aufnehmen und herausfiltern zu können.

Nach Abschluss des Protokolls wurde eine neue Zelle ausgewählt und das genannte Protokoll wiederholt.

Bei etwa jeder vierten Zelle wurde am Ende des Protokolls 5 μM „Carbonyl-cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon“ (FCCP) und 10 μM Oligomycin hinzugefügt. FCCP macht die innere Mitochondrienmembran permeabel für Protonen und baut so den Gradienten ab, welcher zur ATP-Synthese benötigt wird. [67] Oligomycin hemmt die ATP-Synthase direkt und trägt damit zusammen mit FCCP zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials bei. [68] Nach etwa 60 Sekunden stellt sich im Emissionsspektrum des Farbstoffes di-8-ANEPPS ein gleichbleibendes Niveau ein, welches mit einem Zusammenbruch des Membranpotentials gleichzusetzen ist.

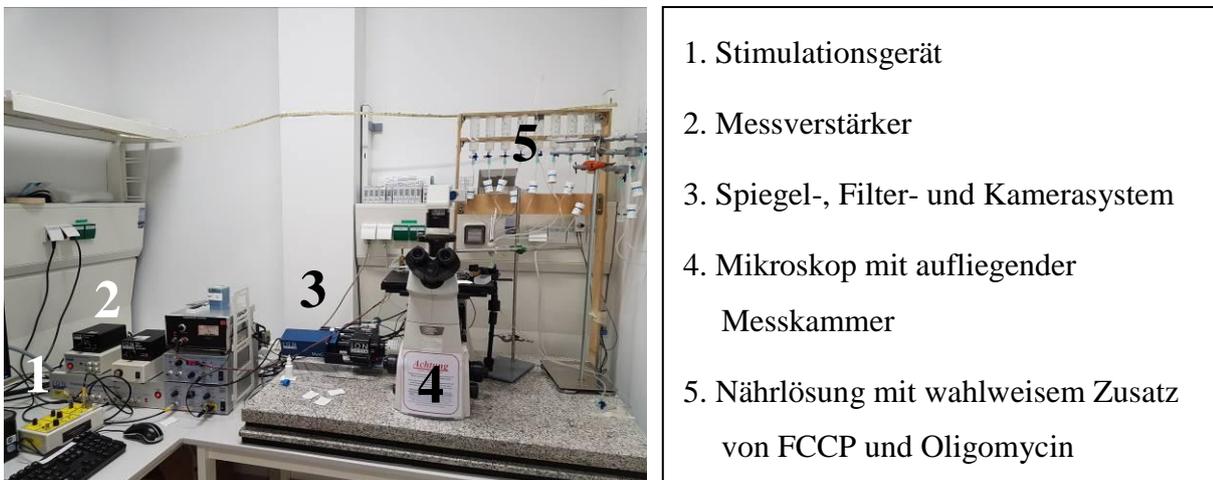
Beim Vergleich zwischen dem zusammengebrochenen Membranpotential und den nicht erregten Zellen in der Plateauphase bei 0,5 Hz Anregungsfrequenz kann man direkte Rückschlüsse auf das relative Ruhemembranpotential der Kardiomyozyten ziehen. Entsprechende Differenzwerte aus der Plateauphase bei 0,5 Hz Stimulationsfrequenz, abzüglich der Werte des gemessenen zusammengebrochenen Membranpotentials, wurden zur statistischen Analyse herangezogen.

Gemessen wurden in dieser Versuchsreihe Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Zeit für beide Emissionsmaxima, markiert mit den zeitlichen Stimuli der Anregungsapparatur. Mit der Auswertungssoftware IonWizard wurde zuerst die Hintergrundfluoreszenz mathematisch als Hintergrundsignal vom eigentlichen Messergebnis abgezogen. Die Software berechnete anschließend von selbst einen zeitabhängigen Quotienten zwischen den beiden Wellenlängen, welchen man zur eigentlichen Auswertung heranzog. Von Hand wurden anschließend, einzeln für jede Stimulationsfrequenz, alle Stimuli ausgewählt, bei welchen die Frequenzen exakt eingehalten wurden, außerdem mussten mindestens drei Stimuli Abstand zur nächst niedrigeren oder höheren Frequenz eingehalten sein und sie mussten frei von Artefakten und Störeinflüssen sein. Diese wurden von der Software mathematisch gemittelt und eine durchschnittliche Kurve für jede Stimulationsfrequenz berechnet. Der gemittelte Zyklus wurde in Kurvenform, abhängig vom Signalquotienten aus der di-8-ANEPPS Aufnahme und der Zeit, dargestellt und konnte nach einem in der Software hinterlegten Makro ausgewertet werden.

Dabei wurden folgende Parameter bestimmt:

- Höhe der Amplitude des Membranpotentials
- Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude des Membranpotentials
- Zeit bis zum Wiedererreichen der 50 % Membranpotentialdifferenz nach Stimulation
- Zeit bis zum Wiedererreichen der 90 % Membranpotentialdifferenz nach Stimulation

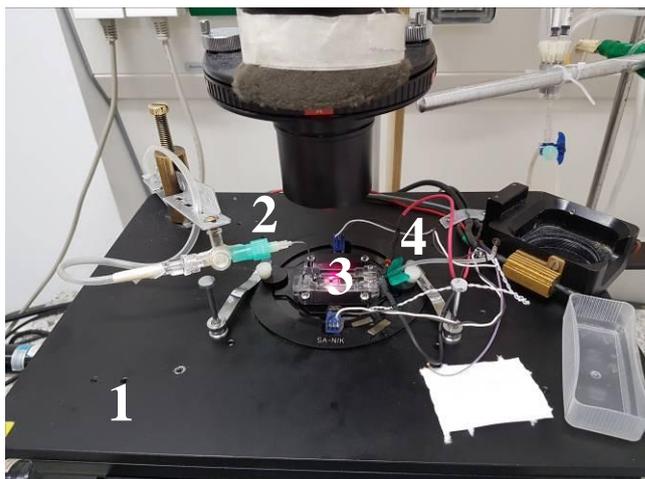
Die jeweiligen Werte wurden in Form einer Tabelle dargestellt und in Excel übernommen. In Excel wurde nun die weitere Auswertung vorgenommen. Dabei wurden für jede Stimulationsfrequenz einzeln die WT und KO Zellen verglichen, Mittelwerte, Abweichungen und Signifikanzen bestimmt. Da nicht jede Zelle auf alle Stimulationsfrequenzen anspricht, ergaben sich frequenzabhängige Fallzahlen.



1. Stimulationsgerät
2. Messverstärker
3. Spiegel-, Filter- und Kamerasystem
4. Mikroskop mit aufliegender Messkammer
5. Nährlösung mit wahlweisem Zusatz von FCCP und Oligomycin

Abbildung 11, Aufbau der IonOptix Apparatur

Die gesamte Apparatur der IonOptix umfasst unter anderem das Mikroskop (4) mit der aufliegenden Messkammer, welche mit unterschiedlichen Nährlösungen aus dem Spritzenhalter (5) beschickt werden kann. Das Aufnahmesystem (3) mit Spiegeln, Filtern und Kameras befindet sich in der Mitte des Bildes und gehört auch zur Apparatur. Links sind die Messverstärker (2) und das Stimulationsgerät (1) zu sehen, welche ebenfalls notwendig sind.



1. Objektisch des Mikroskops mit optischem Anschluss an die IonOptix Messapparatur
2. Absaugung der Nährlösung
3. Messkammer mit Stimulationselektroden
4. Zugabe der Nährlösung mit temperaturgeregeltem Heizelement (messingfarben rechts daneben)

Abbildung 12, Messkammer der IonOptix Apparatur

Die Messkammer befindet sich auf dem beheizten Objektisch des Mikroskops der IonOptix Apparatur (1). Diese besteht im Zentrum aus einem Laminin-beschichteten Objektträger, auf welchem die Kardiomyozyten haften (3). Dieser wird von zwei Elektroden eingerahmt, welche die elektrischen Impulse an die Nährlösung und folglich die Kardiomyozyten übertragen. Rechts neben der Messkammer befindet sich der Zufluss der Nährlösung mit geregelter Durchflussheizung (4), links davon befindet sich die Absaugung (2).

2.2.3 Einzelzell-Kalzium- und Kontraktionsmessung mittels IonOptix

Zur Messung des Membranpotentials wurde der Farbstoff namens Indo-1 verwendet, welcher sich im Zytosol in vitro lebender Kardiomyozyten anlagert und in Abhängigkeit des freien intrazellulären Kalziumgehaltes sein Absorptionsverhalten ändert.

Besonders bei Indo-1 ist ebenfalls wie schon bei dem Farbstoff di-8-ANEPPS das zweigipflige Emissionsverhalten in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 350 Nanometern und die Emissionsmaxima sind jeweils bei etwa 400 Nanometern und 475 Nanometern. [69]

Bei hohem freiem intrazellulärem Kalziumgehalt ist die Emission bei 404 Nanometern deutlich gesteigert gegenüber der Emission bei 475 Nanometern. Umgekehrt verhält es sich bei niedrigem freiem intrazellulärem Kalziumgehalt, hier ist die Emission vor allem bei 475 Nanometern ausgeprägt und bei 404 Nanometern minimiert.

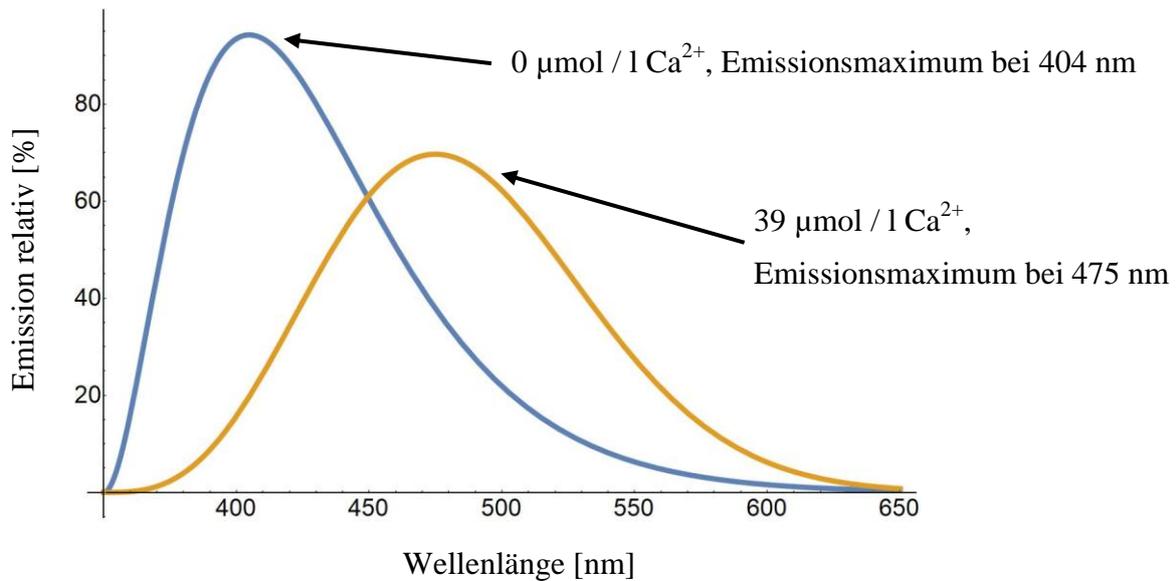


Abbildung 13, Indo Emissionsspektrum bei freier Ca^{2+} Konzentration von 0 (blau) und $39 \mu\text{mol/l}$ (orange)

In blau ist das relative Emissionsspektrum von Indo bei niedrigem freiem intrazellulärem Kalziumgehalt mit einem Maximum bei 404 nm dargestellt ($0 \mu\text{mol/l}$) und in gelb das Emissionsspektrum von Indo bei hohem Kalziumgehalt mit einem Maximum bei 475 nm ($39 \mu\text{mol/l}$). Die Abbildung basiert auf [70].

Der Farbstoff lagert sich im Zytosol der Zellen an und verändert seine fluoreszierenden Eigenschaften fließend in Abhängigkeit des freien intrazellulären Kalziumgehaltes, sodass auch kleine Kalziumunterschiede detektiert werden können.

Detektiert wurde mit zwei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig (Anregungsfilter: $340 \pm 12,5 \text{ nm}$, Aufnahmefilter 1: $405/30 \text{ nm}$, Aufnahmefilter 2: $485/30 \text{ nm}$). Dadurch ergibt sich ebenfalls ein ratiomerisches Prinzip welches erlaubt mit demselben großen Aufnahme Fenster verschieden große Zellen zu messen, da nur das Verhältnis der beiden Emissionsmaxima ausgewertet wird und nicht, wie bei einer Mono-Emission, der jeweilige Absolutwert.

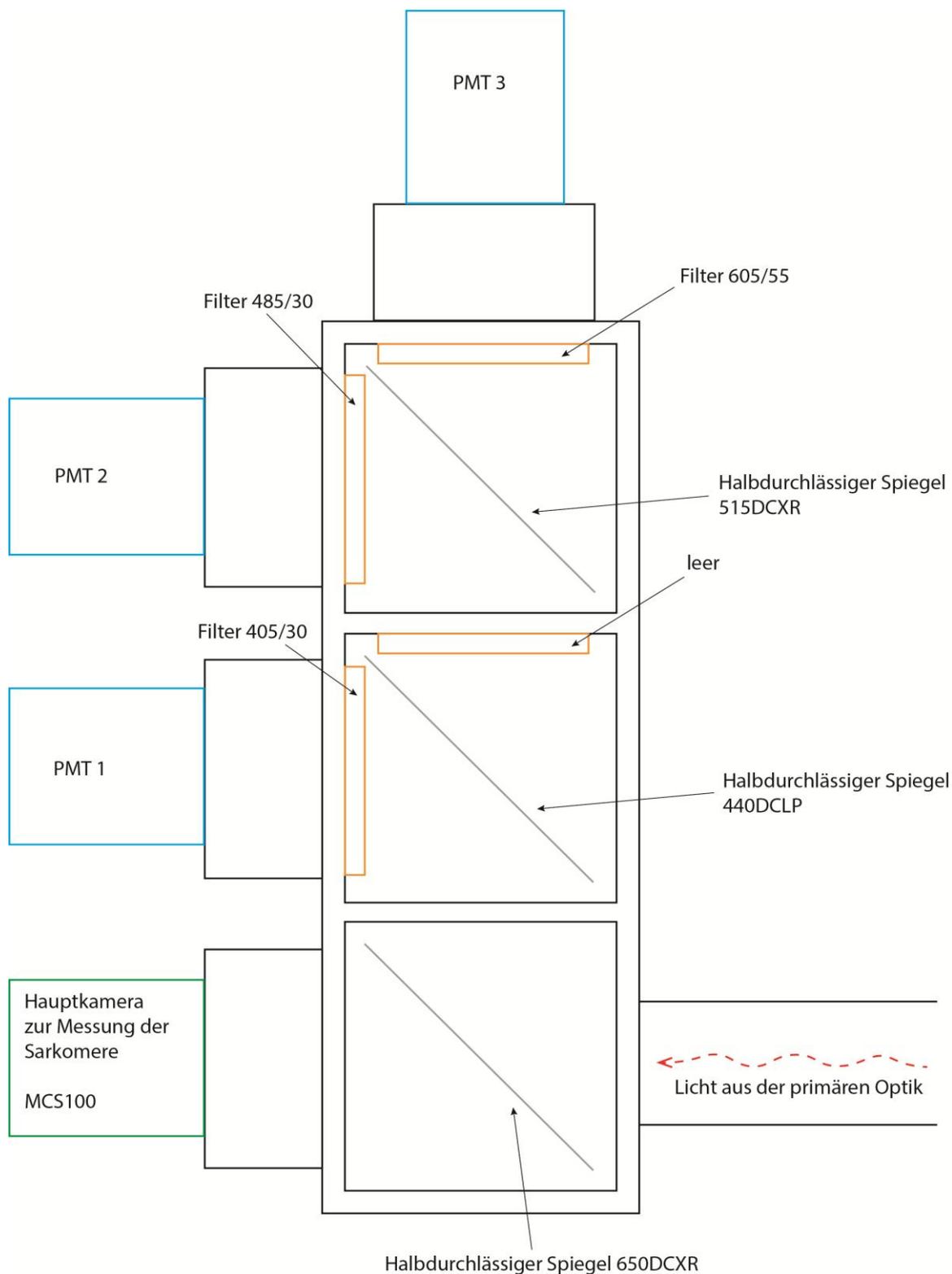


Abbildung 14, Anordnung der Filter und Spiegel in der IonOptix für die Messungen mit Indo

Rechts unten im Bild ist auch beim Farbstoff Indo der Eingang in das optische Aufnahmesystem dargestellt. Dort kommt das Licht von der primären Aufnahmeoptik und wurde bereits durch eine Blende im Bildfeld begrenzt. Das Licht wird durch mehrere halbdurchlässige Spiegel und Filter anhand der Wellenlänge auf die verschiedenen Kameras aufgeteilt. Dabei wurden für die Emission durch den Farbstoff Indo ebenfalls zwei PMTs (Photomultiplier) benutzt und mit der Hauptkamera die Kontraktion während der Stimulationen überwacht und gemessen.

Um die Zellen mit dem Farbstoff zu beladen und zur Messung vorzubereiten, wurden diese für fünf Minuten in einem 10 ml Falcon™-Röhrchen zur Sedimentation stehen gelassen. Nachdem die Kardiomyozyten zu Boden gesunken waren, wurde das überstehende Medium abgenommen. Anschließend wurde 1 ml Tyrode mit 1 μM des Farbstoffs Indo dazugegeben und für 15 Minuten flach hingelegt, um die freie Zelloberfläche zu vergrößern. Nach der eigentlichen Färbung wurde das Falcon™-Röhrchen erneut für fünf Minuten aufgestellt und anschließend der Überstand abgenommen und mit 1 ml Tyrode resuspendiert. Nach jedem Schritt, sowie am Ende, wurden die Zellen in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gestellt und bis zur Messung aufbewahrt.

Aus jeder Zellisolation ließen sich zwischen zwei und vier getrennte Zellportionen färben. Aus jeder Färbung konnte man etwa drei Messzyklen mit je etwa drei bis vier Zellen durchführen, sodass je nach Qualität der Zellisolation und Zeitdauer des Versuchs auch hier bis zu 30 Zellen pro Isolation gemessen werden konnten.

Zur Messung wurde, wie auch bei der Messung der Membranpotentiale, ein Deckglas mit 4 μl Laminin beschichtet und mit einem Tropfen der gefärbten Zellsuspension benetzt. Dieser wurde für etwa 10 Minuten im Dunkeln abgestellt, um den Zellen Zeit zum Anheften zu geben. Anschließend wurde das jeweilige Deckglas in die Messkammer der IonOptix Apparatur eingespannt und durch eine Heizapparatur auf 37 °C gebracht. Ebenso wurde die Nährlösung (Tyrode), mit welcher die Zellen kontinuierlich während der Messung unter langsamem Fluss versorgt wurden auf 37 °C vorgeheizt. Um die Zellen elektrisch anzuregen wurden parallel zur Messkammer zwei stabförmige Elektroden angebracht, die im Medium der Tyrode zu liegen kamen und damit eine gute elektrische Verbindung hatten. Stimuliert wurde jeweils mit 40 V als Dual-Puls mit jeweils 5 ms Dauer.

Nach etwa zwei Minuten Adaption wurde mit dem Messprotokoll begonnen. Hierfür wurde eine lebende Zelle nach visuellen Kriterien ausgewählt. Nur Zellen, welche eine eindeutige Form eines Kardiomyozyten mit sichtbaren Sarkomeren und klar abgrenzbaren Zellgrenzen hatten, wurden als solche gewertet. Die ausgewählte Zelle wurde mit Hilfe von Positionsschrauben und einer Achsdrehung der Kamera in das Kamera- und Aufnahme Fenster bewegt, scharfgestellt und eine Blende so eingestellt, dass alle Ränder der Zelle noch sichtbar im Fenster lagen.

Begonnen wurde mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz für etwa 30 Sekunden, danach mit 1,0 Hz für weitere 30 Sekunden und dann im Anschluss direkt für jeweils 20 Sekunden

mit 2 Hz, 3 Hz, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz und im Anschluss wieder mit 0,5 Hz, bis sich wieder eine gleichförmige Kontraktion einstellte. Sobald die Zellen eine gleichmäßige Kontraktion zeigten wurde die Stimulation erst für 10 Sekunden und dann erneut für 30 Sekunden unterbrochen. Mit diesem Schritt wurde gemessen, ob die Zellen von alleine kontrahieren und somit als autonomer Schrittmacher infrage kommen.

Zusätzlich wurde auch hier am Ende einer jeden Zellmessung ein Bereich auf dem Deckglas ausgewählt und für 20 Sekunden aufgenommen, der keinerlei Zellen oder Verunreinigungen erkennen ließ, um damit die Hintergrundfluoreszenz aufzunehmen.

Nach Abschluss des Protokolls wurde eine neue Zelle ausgewählt und das genannte Protokoll wiederholt, bis maximal vier Zellen gemessen werden konnten. Danach wurde ein neues Deckglas mit neuen Zellen eingespannt.

Die Auswertung des Kalzium-Signals des Farbstoffes Indo-1 erfolgte analog zur Auswertung des Membranpotentials mit dem Farbstoff di-8-ANEPPS in „Ion Wizard“. Die Sarkomerlänge wurde vom Programm selbst durch die grafische Darstellung der Z-Scheiben-Abstände der Myozyte ermittelt und auch in Abhängigkeit der Zeit als Kurve aufgezeichnet. Diese Kurve wurde ebenfalls durch ein internes Makro, wie bei der Auswertung der Membranpotentiale, verarbeitet und frequenzspezifisch gemittelt. Zusätzlich wurden die unterbrechungsfreien Intervalle in der 10 und 30 Sekundenpause ausgezählt und in ein Verhältnis zueinander gesetzt.

Bei diesem Versuch wurden für die Kalziummessung folgende Parameter bestimmt:

- Höhe des maximalen relativen freien intrazellulären Kalziumgehalts
- Zeit bis zum Erreichen des maximalen freien intrazellulären Kalziumgehalts
- Zeit bis zum Wiedererreichen von 50 % des minimalen freien intrazellulären Kalziumgehalts nach Stimulation
- Zeit bis zum Wiedererreichen von 90 % des minimalen freien intrazellulären Kalziumgehalts nach Stimulation

Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Sarkomerlängen folgende Parameter gemessen:

- Länge der Sarkomere bei maximaler und minimaler Kontraktion
- Zeit bis zum Erreichen der kürzesten Sarkomerlänge
- Zeit bis zum Entspannen der Sarkomere bis auf 50 % der Differenz zwischen Ausgangswert und maximaler Kontraktion
- Zeit bis zum Entspannen der Sarkomere bis auf 90 % der Differenz zwischen Ausgangswert und maximaler Kontraktion

Die jeweiligen Werte wurden in Form einer Tabelle dargestellt und in Excel übernommen. In Excel wurden dabei für jede Stimulationsfrequenz einzeln WT und KO Zellen verglichen und Mittelwerte, Abweichungen und Signifikanzen bestimmt. Da nicht jede Zelle auf alle Stimulationsfrequenzen ansprach, ergaben sich frequenzabhängige Zellzahlen.

2.2.4 Protein- und Kanalanalysen mittels Western Blot

Die quantitative Proteinanalyse mittels Western Blot ist ein bewährtes und anerkanntes Verfahren zur Untersuchung von Proteingemischen, zum Beispiel in Gewebelysaten. Hierzu wird das Proteingemisch in ein SDS-Gel gefüllt und mittels Spannungsfeld je nach Größe unterschiedlich schnell im Gel bewegt, sodass eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe entsteht. Zur Sichtbarmachung müssen die Proteine in einem zweiten Schritt auf eine zweidimensionale Membran übertragen werden. Dies geschieht erneut mittels Spannungsfeld. Anschließend kann die Membran mit allen aufgetragenen Proteinen mit einem Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, inkubiert werden. Der primäre Antikörper bindet nun an das gesuchte Protein und kann in einem zweiten Schritt selbst durch einen sekundären Antikörper gebunden werden, welcher zuvor mit Meerrettichperoxidase verknüpft wurde. Die Meerrettichperoxidase hat die Eigenschaft die Reduktion verschiedener Peroxide zu katalysieren, welche durch die Katalyse Energie in Form von Licht freisetzen. Dieser Mechanismus erlaubt nun die quantitative Detektion genau der Stellen auf der Membran, an welcher sich das gesuchte Protein befindet. Wenn man das Signal des Zielproteins in das Verhältnis zu einem Protein setzt, welches ubiquitär in annähernd gleicher Konzentration vorhanden ist,

kann man die Verhältniskonzentrationen bestimmen und somit quantitative Aussagen treffen. Diese Eigenschaft trifft auf β -actin, β -tubulin und GAPDH zu, wobei in dieser Arbeit nur GAPDH verwendet wurde. [71]

2.2.4.1 Probengewinnung

Für die Organpräparate und Proben der Protein-Analysen wurden ausschließlich SPRED2 WT und SPRED2 KO Mäuse verwendet, die heterozygoten Tiere wurden nicht untersucht.

Getötet wurden die Tiere mit Kohlenstoffdioxid, anschließend wurde direkt mittels Thorakotomie eine Organentnahme der Herzen durchgeführt. Die Herzen wurden im Eigenrhythmus noch wenige Schläge in PBS-Puffer schlagen gelassen und nochmals vorsichtig gespült. Anschließend wurden die Vorhöfe vorsichtig abpräpariert. Das übrige und gereinigte Ventrikelmyokard wurde gewogen und mit der 10-fachen Menge an RIPA-Puffer (versetzt mit Phosphatase-Inhibitor und Protease-Inhibitor) auf Eis vorsichtig mit dem Homogenisator gemahlen.

Das Lysat wurde anschließend für 10 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert und der zellkern- und mitochondrienfreie Überstand weiterverwendet. Anschließend wurde die Protein-Konzentration des Lysats mittels „Biuret-Reaktion“ (Vergleiche Kapitel 2.2.6.2) photometrisch gemessen (gesättigte Lösung mit etwa 10 μ g Protein / μ l) und mit Lämmli-Puffer auf 3 μ g Protein / μ l eingestellt. Pro Tasche im Western-Blot Gel wurden 15 μ l Probe verwendet, sodass jeweils knapp 50 μ g Protein mittels Elektrophorese getrennt wurden. Die Gewinnung der Proben der zytosolischen Zellfraktion für die Messung des Cytochrom C Gehaltes wird in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben.

2.2.4.2 Probenanalyse

Für die Gel-Elektrophorese wurden alle Gele in einer mit ddH₂O und 70 % Ethanol gereinigten Glaskammer gegossen. Die Kammer wurde mit Kunststoffeinlagen und Agarose abgedichtet. Das Sammel-Gel wurde jeweils gleich erstellt und der Kamm mit 21 Kammern so eingebracht, dass jede Probe etwa 5 Millimeter im Sammel-Gel läuft, bevor sie in das Trenn-Gel übertritt. Als Trenn-Gel wurden Gele mit 8 %, 12 % und 15 %, sowie eine Komposition aus zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet, die genaue Zusammensetzung findet sich in folgender Tabelle 1:

Zusammensetzung der Western Blot Gele

Gel-Variante	ddH ₂ O	30 % Acrylamid mix	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.0 M Tris (pH 6.8)	10 % SDS	10 % APS	TEMED
8 %	4,6	2,7	2,5	-	0,1	0,1	0,006
10 %	4,0	3,3	2,5	-	0,1	0,1	0,004
12 %	3,3	4,0	2,5	-	0,1	0,1	0,004
15 %	2,3	5,0	2,5	-	0,1	0,1	0,004
Sammel-Gel	3,4	0,83	-	0,63	0,05	0,05	0,005

Tabelle 1, Western Blot Gelzusammensetzung [72]

Gelzusammensetzung in Millilitern des jeweiligen Stoffes in Abhängigkeit der Gel-Variante.

Abhängig vom zu untersuchenden Protein wurde die Dichte des Gels ausgewählt. Folgende Tabelle 2 stellt den Zusammenhang zwischen Protein, Größe, Dichte und Laufdauer des Gels bei 110 V dar:

Proteinabhängige Gelparameter (Größe des Proteins auf 1 kDa gerundet)

Protein	Größe des Proteins	Dichte des Gels	Laufdauer bei 110V	Besonderheiten
GAPDH	36 kDa [73]	8 %, 12 %, 15 %	90-105 Minuten	
Connexin 43	43 kDa [74]	12 %	90 Minuten	
Phospholamban	5-25 kDa [75]	15 %	105 Minuten	
P-Phospholamban	5-25 kDa [75]	15 %	90 Minuten	
CaM-Kinase II	55 kDa [76]	12 %	90 Minuten	
P-CaM-Kinase II	50-60 kDa [76]	12 %	90 Minuten	
Na _v 1.5	220 kDa [77]	8 % und 12 %	90 Minuten	Mehrschichtiges Gel
CaV1.2	250 kDa [78]	12 %	90 Minuten	
NCX-1	120 kDa [79]	12 %	90 Minuten	
PMCA4b	130 kDa [80]	12 %	90 Minuten	
SERCA2	110 kDa [81]	8 % und 12 %	90 Minuten	Mehrschichtiges Gel
Cytochrom C	13 kDa [82]	15 %	105 Minuten	

Tabelle 2, Proteinabhängige Gelparameter

Darstellung der untersuchten Proteine in Bezug zu Größe, Gel-Typ und Laufdauer.

Bei Proben, die nicht alle 21 Kammern des Gels ausgefüllt hatten, wurde an den Rändern zu gleichen Teilen „Lämmli“-Puffer eingefüllt, welcher auch als Laufpuffer zu den Protein-Proben gegeben wurde. Jeweils links wurden Proben von Wildtypen eingefüllt, rechts Knock-out-Proben und davon wiederum rechts jeweils 10 µl Protein-Ladder zur Markierung eingebracht.

Daraufhin wurden alle Gele bei 110 V für eine in Tabelle 2 genannte Zeitspanne vertikal in SDS-Puffer getrennt. Im Anschluss wurden die Proteinbanden der Gele auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) mittels Blotting übertragen. Es wurden jeweils zwei Gele gleichzeitig bei

220 mA in 60 Minuten auf PVDF-Membranen übertragen. Als Laufpuffer wurde SDS-Puffer mit 20 % Methanol verwendet. Um die PVDF-Membranen für den Laufpuffer zugänglich machen zu können, wurden diese für 5 Sekunden in 100 % Methanol getaucht.

Im Anschluss an das Blotting wurden die Membranen zugeschnitten und für 60 Minuten in einer 5 %igen Milcheiweiß-Lösung in PBS-Puffer geschwenkt, um unspezifische Protein-Bindungsstellen zu besetzen. Die eigentliche Reaktion mit Antikörpern wurde in verschiedenen Konzentrationen in 5 % Milcheiweiß-Lösung in PBS-Puffer über Nacht im 4 °C warmen Kühlraum durchgeführt, ebenso alle weiteren Antikörper-Reaktionen. Die genauen Schemata, welche Proben mit welchen Antikörpern und Konzentrationen inkubiert wurden, sind in folgender Tabelle 3 aufgelistet:

<i>Proben</i>	<i>Prim. AK 1</i>	<i>Sek. AK 1</i>	<i>Prim. AK 2</i>	<i>Sek. AK 2</i>	<i>Besonderheit</i>
Zytosol Herz (6WT, 8KO)	Cytochrom C, 1:50	Protein A, HRP-linked, 1:1000 und Protein G, HRP-linked, 1:1000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Zytosol Gehirn (6WT, 9KO)	Cytochrom C, 1:100	Protein A, HRP-linked, 1:1000 und Protein G, HRP-linked, 1:1000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Zytosol Skelettmuskel (6WT, 8KO)	Cytochrom C, 1:100	Protein A, HRP-linked, 1:1000 und Protein G, HRP-linked, 1:1000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	NCX-1, 1:200	Goat anti Mouse, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	3. AK: CaM-Kinase II 1:2000 und Sek. AK Goat anti Mouse, 1:5000
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	P-CaM-Kinase II, 1:200	Goat anti Rabbit, 1:5000	CaM-Kinase II, 1:2000	Goat anti Rabbit, 1:5000	Mildes-Stripping zwischen 1. und 2. AK
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	P-Phospholamban, 1:1000	Goat anti Rabbit, 1:5000	Phospholamban, 1:1000	Goat anti Rabbit, 1:5000	Mildes-Stripping zwischen 1. und 2. AK
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	SERCA, 1:1000	Goat anti Rabbit, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	Nav1.5, 1:1000	Goat anti Rabbit, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (8WT, 8KO)	Connexin 43, 1:1000	Goat anti Mouse, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	Connexin 43, 1:1000	Goat anti Mouse, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (8WT, 8KO)	Cav1.2, 1:20	Goat anti Rabbit, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (9WT, 9KO)	Cav1.2, 1:20	Goat anti Rabbit, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	
Herz-Lysate (8WT, 8KO)	PMCA4b, 1:20	Goat anti Rabbit, 1:5000	GAPDH, 1:3000	Goat anti Rabbit, 1:5000	

Tabelle 3, Western Blot Antikörper Schemata

Darstellung der Inkubationsschritte der einzelnen Proteine, inklusive Antikörpern und deren Konzentrationen. Prim. AK → Primärer Antikörper, Sek. AK → Sekundärer Antikörper

Nach jeder Inkubation mit einem Antikörper wurden die Membranen jeweils drei Mal für fünf Minuten mit PBS-T 0,05 %-Puffer auf einer Wippe gewaschen.

Ebenfalls nach jeder Inkubation mit einem sekundären Antikörper wurden die Membranen mit einem Milliliter des hochaktiven Chemolumineszenz Substrats beschichtet und ohne Zeitverzögerung mithilfe des FluorchemSP aufgenommen.

Anschließend wurde das Integral der Banden mit ImageJ vermessen und der Wert in Excel überführt. Um eine Aussage über die Proteinkonzentration des gesuchten Proteins treffen zu können wurden hier je nach Fragestellung meist Verhältnisse zu GAPDH gebildet und mittels TTEST in Excel die Signifikanz bestimmt. Ausnahme hiervon bildet nur die Cytochrom-C-Bestimmung der zytosolischen Zellfraktionen. Hier konnte kein GAPDH detektiert werden und aufgrund dessen wurde als Referenz die gemessene Proteinkonzentration verwendet. Zur grafischen Darstellung wurden die Werte in Prism überführt.

2.2.4.2.1 Mildes „Stripping“

Um eine Interaktion verschiedener primärer Antikörper zu verhindern ist man je nach Herkunftsspezies der Antikörper gezwungen schon gebundene Antikörper wieder von der Membran zu lösen. Welche Proben mittels „mild Stripping“ behandelt wurden ist in Tabelle 3, Western Blot Antikörper Schemata, gekennzeichnet.

Hierzu wurden die PVDF-Membranen zweimal für 10 Minuten mit Stripping-Puffer inkubiert, anschließend zweimal fünf Minuten mit PBS-Puffer und zweimal fünf Minuten mit PBS-T 0,05 %-Puffer gewaschen. Bevor nun eine erneute Antikörper-Inkubation durchgeführt werden konnte wurden die Membranen nochmals für 60 Minuten mit 5 % Milcheiweiß-Lösung in PBS-Puffer auf einer Wippe belassen.

2.2.5 Immunohistochemie

Immunohistochemische Färbungen wurden mit $Ca_v1.2$ Antikörpern an Maus-Herzen der WT und KO Tiere durchgeführt.

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit CO_2 getötet und die Herzen anschließend direkt mittels Thorakotomie entnommen. Nach der Entnahme wurden die Herzen im Eigenrhythmus noch wenige Schläge in PBS-Puffer schlagen gelassen und nochmals vorsichtig gespült. Die

Vorhöfe wurden abpräpariert und die gesäuberten Ventrikel wurden mit Zellstoff abgetrocknet und in Isopropanol gebettet in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

Aus den nun tiefgefrorenen Ventrikeln wurden Kryoschnitte gefertigt. Dazu wurden die Ventrikel an der Herzbasis mit Tissue-Tek[®] im Kryotom, bei -20 °C Objektträgertemperatur und -30 °C Kammertemperatur, eingespannt. Mit groben Schnitten von 100 µm wurde nun solange von der Herzspitze aus geschnitten bis beide Ventrikelhohlräume sichtbar wurden. Die verwendeten Schnitte wurden mit 10 µm Dicke geschnitten und auf SuperFrost[®] Plus Gold Objektträgern mit einem feinen Pinsel gelegt.

Zur Färbung mit Antikörpern wurden die einzelnen Schnitte der Herzen mit einem Fettstift umrandet und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurde mit PBS-Puffer erst für eine Minute und dann nochmals für 10 Minuten gewaschen. Um die Präparate permeabel zu machen wurde nun für 20 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 in PBS-Puffer inkubiert. Der folgende Wasch-Schritt wurde wieder mit PBS-Puffer erst für eine Minute und dann nochmals für 10 Minuten durchgeführt. Um vor der Antikörperzugabe alle unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen wurde für 90 Minuten 5 % Ziegen-Serum in PBS-Puffer aufgetragen. Anschließend konnte die eigentliche Antikörper-Inkubation stattfinden. Hierzu wurde eine Antikörperkonzentration von 1:20 aufgetragen und über Nacht bei 4 °C auf den Präparaten belassen.

Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde zweimal für eine Minute und nochmals fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, bevor ein fluoreszierender sekundärer Antikörper (AlexaFluor 594) mit 1:500 für drei Stunden in PBS-Puffer hinzugegeben wurde. Danach wurde nochmals zweimal für fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellkerne mit DAPI 1:1000 in PBS-Puffer für 15 min inkubiert. Abschließend wurde erneut zweimal für fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und zuletzt mit Mowiol inklusive DABCO eingedeckelt und über Nacht trocknen gelassen.

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM6FS). Angeregt wurde mit 365, 470, 580 und 635 Nanometer. Für DAPI wurde der Filter DAP und für AlexaFluor 594 der Filter Y3 verwendet. Zur Aufnahme wurde ein 63x Objektiv mit Immersionsöl verwendet. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass die Aufnahmen ein optimales Sättigungsverhalten aufwiesen.

2.2.6 Mitochondrienstoffwechsel und -membranpotential

Die Mitochondrienfunktion der WT und KO Tiere wurde in drei Organsystemen untersucht (Herz, Gehirn und Skelettmuskel). Dazu wurde die Atmung der Mitochondrien sowohl mit Kohlenhydraten als auch mit Fettsäuren als Substrat gemessen und gleichzeitig auch das Mitochondrien-Membranpotential im Verlauf der Zeit registriert.

2.2.6.1 Mitochondrienisolation

Alle Mäuse wurden zur Mitochondrien-Isolation mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurde die Bauch- und Brusthaut mit Cutasept F angefeuchtet und der Brustkorb mit einer Thorakotomie eröffnet. Danach wurde das Gehirn ebenfalls durch eine mediane Kraniotomie entnommen. Der Skelettmuskel wurde am Oberschenkel, ebenfalls nach Anfeuchtung mit Cutasept F, entnommen und makroskopisch von Fett und Bindegewebe befreit. Alle Isolationschritte fanden auf Eis gekühlt bei 0 °C statt.

Herz: Die Herzen wurden mit Pinzette und Schere entnommen und die Vorhöfe sowie alle großen Gefäße entfernt. Im Anschluss wurden die Herzen halbiert und in IS-Puffer gespült und alle Blutreste entfernt. Nachdem nur noch das Ventrikelmyokard der Herzen übrig war, wurden diese in 500 µl BSA, mit einer Konzentration von 4 mg / ml, und Proteinase, mit einer Konzentration von 0,16 mg / ml, überführt und mit einer spitzen Schere sehr klein geschnitten. Danach wurden die Herzen in Pottergefäße überführt. Dort wurden sie mit einem Potterstab auf Eis homogenisiert. Dann wurde nochmals 500 µl BSA, mit einer Konzentration von 4 mg / ml, und Proteinase, mit einer Konzentration von 0,16 mg / ml, dazu gegeben, bevor sie erneut für sieben Minuten vorsichtig homogenisiert wurden.

Das Homogenisat wurde für fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert. Dabei entstand ein Pellet, das mit Überresten der Zellmembranen und Bindegewebsresten verworfen wurde, sowie der Überstand, welcher aus Zytosol und Mitochondrien bestand. Der Überstand wurde nun nochmals bei 7.700 g für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei entstanden wieder zwei Fraktionen, das Pellet mit den Mitochondrien und der Überstand mit dem Zytosol, welches bei -80 °C für weitere Versuche gelagert wurde. Das Pellet wurde nun erneut zweifach mit 1400 µl MSS-Puffer resuspendiert und bei 7.700 g für 10 Minuten, um nicht-mitochondriale Reste zu entfernen, zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurden 150 µl MSS-Puffer zum Pellet hinzugegeben und die nun aufbereiteten Mitochondrien bis zur Messung auf Eis gelagert.

Gehirn: Zur weiteren Verarbeitung der Gehirne wurde jeweils immer nur eine Hälfte verwendet. Je eine Hälfte wurde in einen Milliliter BSA, mit einer Konzentration von 4 mg / ml, und Proteinase, mit einer Konzentration von 0,16 mg / ml, gegeben und über ein zweistufiges Verfahren (erst grob und dann fein) vorsichtig mit wenigen Zyklen (10-20) so wie das Herz im Pottergefäß bearbeitet und klein gemahlen, bis eine homogene Masse entstand.

Das Homogenisat zweimal für drei Minuten bei 2.000 g und zentrifugiert. Dabei bildete sich je ein Pellet und Überstand, wobei der Überstand jeweils die Mitochondrien enthielt und abgenommen wurde. Das Pellet wurde nach der ersten Zentrifugation erneut mit einem Milliliter BSA mit 10 % Proteinase aufgelöst und erst nach der zweiten Zentrifugation verworfen. Die abgenommene Mitochondrien-Fraktion wurde für acht Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde als zytosolische Fraktion aufbewahrt und das Pellet mit den isolierten Mitochondrien mit 100 µl MSS-Puffer aufgelöst und auf Eis bis zur Messung aufbewahrt.

Skelettmuskel: Der von Fett und Bindegewebe befreite Skelettmuskel wurde auf eine Menge von etwa 250 mg abgewogen und mit 500 µl HM-Puffer und 1 µl Subtilisin A vermengt und mit einer spitzen Schere wie auch die Herzen sehr klein geschnitten.

Danach wurden die Skelettmuskelstücke ebenfalls in Pottergefäße überführt. Dort wurden sie auch auf Eis gekühlt für sieben Minuten vorsichtig zermahlen. Dann wurde nochmals 1000 µl gekühlter HM-Puffer dazu gegeben, bevor sie erneut für sieben Minuten vorsichtig homogenisiert wurden.

Das nun sehr fein gemahlene Gewebe wurde für 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Dabei entstand ein Pellet, das mit Überresten der Zellmembranen und Bindegewebsresten verworfen wurde, und der Überstand, welcher aus Zytosol und Mitochondrien bestand. Der Überstand wurde nun nochmals bei 12.000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Dabei entstanden wieder zwei Fraktionen, das Pellet mit den Mitochondrien und der Überstand mit dem Zytosol, welches bei -80 °C für weitere Versuche gelagert wurde. Das Pellet mit der Mitochondrien-Fraktion wurde nun mit 220 µl BM-Puffer aufgelöst und bis zur Messung auf Eis gelagert.

[83]

2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur nivellierten Messung der Atmung sind gleiche Mitochondrien-Konzentrationen in der Messkammer obligat. Hierfür wurde die Annahme gemacht, dass in der Isolierten Mitochondrien-Fraktion keine wesentlichen Verunreinigungen vorhanden sind und jegliche Proteine mitochondrialen Ursprungs sind. Daher wurde die Proteinkonzentration mittels „Biuret-Reaktion“ ermittelt und anhand dessen die Proteinmengen für die Messungen berechnet. [84]

Jede Mitochondrien-Fraktion wurde drei Mal gemessen und daraus der Mittelwert bestimmt. Dazu wurden je 18 µl ddH₂O mit 2 µl resuspendierter Mitochondrien-Fraktion gemischt, sowie 100 µl des Reagenz A als auch 800 µl des Reagenz B hinzugefügt und mittels Vortexer durchmischt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Extinktion photometrisch bei 750 nm Wellenlänge mit dem Fluoreszenzplattenreader Tecan M200 gegen einen Leerwert (Mitochondrien ersetzt durch ddH₂O) gemessen und die drei Einzelmessungen je Probe gemittelt. Anhand einer vorab erstellten Kalibrierungskurve, welche mit Hilfe einer Reihe unterschiedlicher Konzentrationen von BSA erstellt wurde, konnte anschließend die Konzentration der Proteine in der gemessenen Mitochondrienfraktion berechnet werden.

Für die Mitochondrien-Messungen der Organe Herz und Skelettmuskel wurden je Versuchsreihe 400 µg Protein hinzugefügt, bei der Messung der Gehirn-Proben 800 µg pro Versuchsreihe.

2.2.6.3 Atmungsmessungen und Membranpotential der Mitochondrien

Die Atmungsmessungen der Mitochondrien wurden mit dem Oroboros, einem speziellen Kombinationsgerät, durchgeführt, das gleichzeitig den Sauerstoffverbrauch und das mitochondriale Membranpotential messen kann. Der Sauerstoffgehalt der verschlossenen Messkammer wird mit dem Oxygraph O2k des Oroboros gemessen. Das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) und einem festen Anregungs- und Filtersystem registriert, der in lebenden Mitochondrien akkumuliert, diese aber nicht schädigt. [85, 86] Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde das Gerät mit reinem Atmungspuffer befüllt und bei 37 °C kalibriert. Im Anschluss konnten die eigentlichen Messungen folgen. Dabei wurden zwei verschiedene Protokolle für jedes Organsystem bei jeder Maus durchgeführt.

Beim ersten Protokoll wurde als Substrat der Kohlenhydratstoffwechsel angesprochen und Pyruvat hinzugegeben. Aus Pyruvat wird in den Mitochondrien mittels der Pyruvat-Dehydrogenase das Molekül Acetyl-CoA erzeugt, welches direkt im Citrat-Zyklus verstoffwechselt werden kann. Im Citrat-Zyklus wird aus der Energie der Acetyl-Gruppen und aus Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) das energiereiche $\text{NADH}+\text{H}^+$ erzeugt. Die Energie des $\text{NADH}+\text{H}^+$ wird in der Atmungskette der Mitochondrien zur Generierung von Adenosintri-phosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) verwendet. Im Zwischenschritt wird ein Protonengradient entlang der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut, welcher durch die Aktivität der ATP-Synthase oder durch Entkopplung wieder abgebaut wird. Die Protonen werden dabei mit Sauerstoff zu Wasser verbunden, wodurch der Sauerstoff verbraucht wird. Durch diese Verkettung lässt sich anhand des Sauerstoffgehalts in der abgeschlossenen Messkammer des Oroboros die gesamte Funktionalität der Mitochondrien in ihrer Funktion als Zellkraftwerk beurteilen. [87]

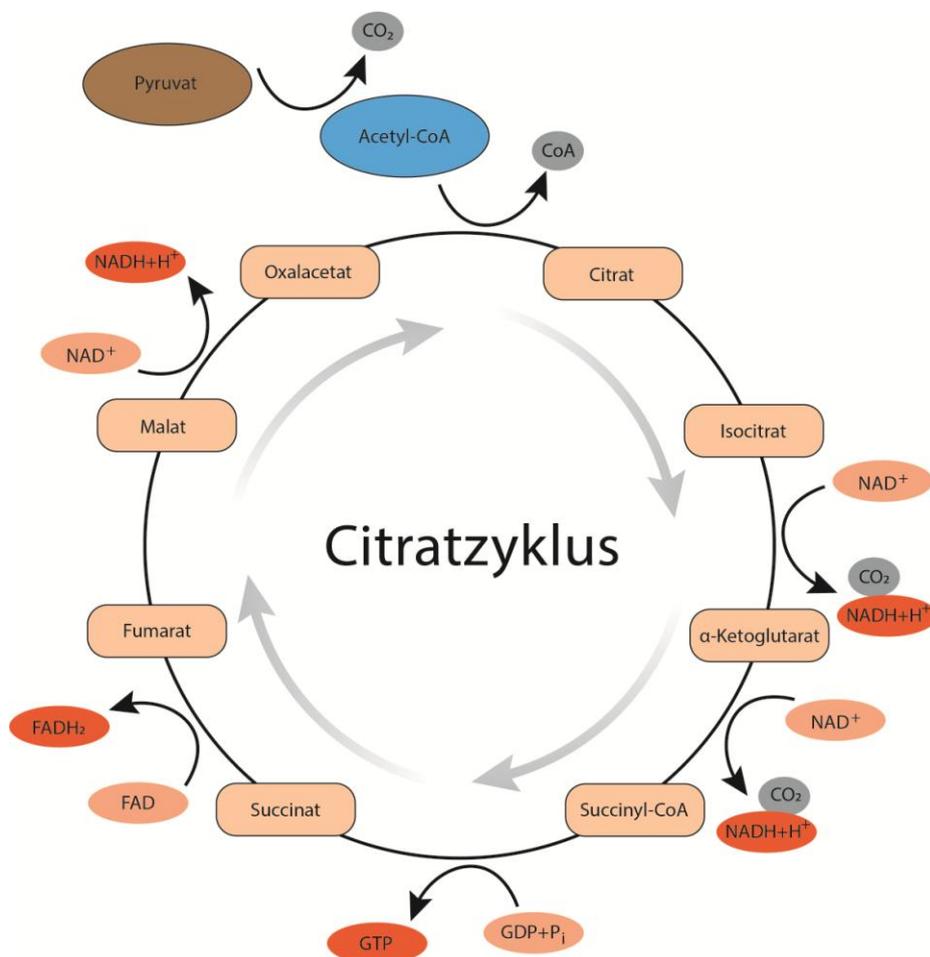


Abbildung 15, Citratzyklus und die Substrate Pyruvat und Malat

Der Citratzyklus hat die Aufgabe durch insgesamt acht Reaktionsschritte energiereiche Zwischenprodukte aus verschiedenen Quellen zu gewinnen, pro Zyklus sind dies drei $\text{NADH}+\text{H}^+$, ein FADH_2 und ein GTP . Als Substrate hierfür können unter anderem Aminosäuren oder Acetyl-CoA dienen. Diese werden an unterschiedlichen Stellen in den Zyklus eingeschleust. Zur Aufrechterhaltung der Reaktionskette muss immer mindestens eines der Zwischenprodukte in ausreichendem Maße vorhanden sein. Alle dargestellten Reaktionen finden im Inneren von Mitochondrien statt. Dargestellt ist nur eine vereinfachte Version des Citratzyklus, da hier nur mit Pyruvat und Malat als Substrate gearbeitet wurde. Die Abbildung basiert auf [87].

Der Energieträger Pyruvat wird durch eine Bindung an Coenzym-A (CoA) in den Citratzyklus eingeschleust und über mehrere Zwischenschritte unter Bildung von drei energiereichen $\text{NADH}+\text{H}^+$, sowie einem FADH_2 und einem GTP verstoffwechselt. Hierzu braucht es grundsätzlich eine Basis-Verfügbarkeit eines der Stoffe im Citrat-Zyklus, damit die Reaktionen nicht zum Erliegen kommen. Dies wird im Versuch durch die Zugabe von Malat sichergestellt.

Beim zweiten Protokoll wurde der Fettsäurestoffwechsel angesprochen und mit Oleoyl-L-Carnitin, stellvertretend für weitere langkettige Acyl-Carnitine, sowie Palmitoyl-CoA zusammen mit Carnitin als zweites Substrat für die β -Oxidation zugegeben. Durch den Ablauf

der β -Oxidation im Inneren der Mitochondrien wird ebenfalls Acetyl-CoA erzeugt, welches wiederum im Citrat-Zyklus weiter verstoffwechselt wird und auf gleichem Wege die Atmungskette antreibt. [87]

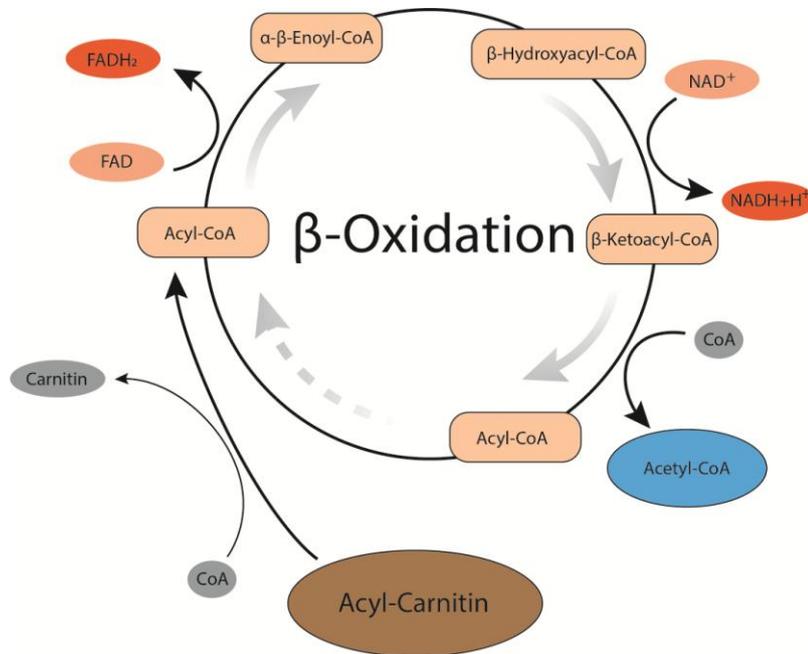


Abbildung 16, Die β -Oxidation

Die β -Oxidation beschreibt einen Reaktionszyklus im Mitochondrium in welchem langkettiges Acyl-CoA sukzessive je Zyklus um zwei C-Atome unter Bildung von Acetyl-CoA gekürzt wird, bis dieses vollständig abgebaut ist. Das Acetyl-CoA geht anschließend zur weiteren Verstoffwechslung in den Citratzyklus ein. Zur Einschleusung in das Mitochondrium benötigt es eine Verknüpfung der jeweiligen Fettsäure an Carnitin, sodass diese den Carnitin-Shuttle nutzen kann. Im Mitochondrium wird das Carnitin gegen Coenzym-A getauscht. Pro Zyklus werden zusätzlich ein $\text{NADH}+\text{H}^+$, sowie ein FADH_2 gewonnen. Die Abbildung basiert auf [87].

Acyl-Carnitin wird über den Carnitin-Shuttle in die Mitochondrien eingebracht. Im Versuch wurde stellvertretend für alle Acyl-Carnitine das Oleoyl-L-Carnitin verwendet. Das zweite Substrat Palmitoyl-CoA muss über das Carnitin-Acyltransferase-System zuerst an Carnitin geknüpft werden, bevor es in das Mitochondrium transportiert werden kann. Im Mitochondrium wird Carnitin abgespalten und die Fettsäure im Tausch an Coenzym-A geknüpft, welches als Acyl-CoA in die β -Oxidation eingeht. Über mehrere Zwischenschritte wird eine Acetylgruppe abgespalten und zusätzlich Energie in Form von einem FADH_2 und einem $\text{NADH}+\text{H}^+$ gewonnen. Das Acetyl-CoA geht anschließend als Energieträger in den Citrat-Zyklus ein. Übrig bleibt ein um ein zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA. Dieses wird solange weiter abgebaut, bis es vollständig verstoffwechselt wurde oder in andere Stoffwechselwege überführt wurde. [87]

Protokoll 1 (Kohlenhydrate / Pyruvat):

Die Messkammer wurde zu Beginn jeder Messung mit 20 μl TMRM (100 μM), dem berechneten Volumen für die entsprechende Proteinmenge der Mitochondrien-Fraktion und mit Atmungspuffer auf 2100 μl aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Kammer licht- und luftdicht verschlossen. Nach etwa fünf Minuten stellte sich in der Kammer ein Gleichgewicht ein und der Sauerstoffgehalt blieb stetig gleich. Nun konnte das Substrat für die Reaktionskette zugegeben werden. Dies beinhaltete Pyruvat (20 μl mit einer Konzentration von 500 mM) als Energieträger und Malat (20 μl mit einer Konzentration von 500 mM) als Substrat für den Citrat-Zyklus, dies entsprach einer Kammerendkonzentration von jeweils 5 mM. Nach weiteren drei Minuten wurde Adenosindiphosphat (ADP) mit aufsteigender Konzentration hinzugefügt.

Als erstes wurden 10 μl ADP mit 6 mM hinzugefügt und so lange gemessen, bis das ADP vermeintlich verbraucht war. Dies konnte man an der zuerst steigenden und dann wieder fallenden Sauerstoffverbrauchskurve ablesen. Sobald das Maximum überschritten wurde und das ADP verbraucht war, wurden die nächst höheren Dosen von je 10 μl mit zuerst 14 mM, dann 40 mM und zuletzt 140 mM ADP in die Messkammer hinzugefügt. Bei Unterschreitung einer Sauerstoffkonzentration von 50 $\mu\text{mol} / \text{l}$ wurde die Kammer reoxygeniert. Nach Erreichen eines maximalen Plateaus wurde die Reaktion mit 10 μl Oligomycin, mit einer Ausgangskonzentration von 240 μM , unterbrochen. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase der Atmungskette und stoppt somit die Übertragung der Energie an ADP. [68] Durch die gleichzeitige Messung des Membranpotentials der Mitochondrien lässt sich durch diesen Schritt feststellen, ob der elektrische Gradient, den die Protonen des $\text{NADH} + \text{H}^+$ aufbauen, ein adäquates Niveau erreicht, oder ob die Mitochondrienmembran durchlässig für Protonen ist und der Gradient nicht (maximal) aufgebaut werden kann. Für diese Messung wurden drei Minuten verwendet, bis die Atmungskette durch 10 μl Dinitrophenol, mit einer Ausgangskonzentration von 2,4 mM, kurzgeschlossen wurde. Dinitrophenol ist ein Protonenionophor, welches Protonen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Innere der Mitochondrien zurückbringt. Hierdurch bricht der elektrische Gradient zusammen, die ATP-Synthase wird nicht mehr angetrieben und die Mitochondrien verbrauchen ein Maximum an Energie und Sauerstoff, wodurch Wärme frei wird. [88] Dieses Maximum an Verbrauch wurde wieder durch die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer registriert. Nach weiteren drei Minuten war der Sauerstoff verbraucht und die Messung konnte beendet werden.

Protokoll 2 (Fettsäurestoffwechsel / L-Carnitin und Palmitoyl-CoA):

Die Messkammer wurde zu Beginn jeder Messung mit 20 μl TMRM, dem berechneten Volumen für die entsprechende Proteinmenge der Mitochondrien-Fraktion, mit Carnitin (Kammerkonzentration von 1 mmol / l), Malat (Kammerkonzentration von 3 mmol / l) und mit Atmungspuffer auf 2100 μl aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Kammer licht- und luftdicht verschlossen. Nach 90 Sekunden wurde Palmitoyl-CoA als erstes Substrat der β -Oxidation in die Kammer hinzugefügt (Kammerkonzentration von 6,25 μmol / l). Nach ebenfalls weiteren 90 Sekunden wurde Oleoyl-L-Carnitin als zweites Substrat in die Kammer hinzugefügt (Kammerkonzentration von 10 μmol / l). Nun war ausreichend Substrat für die Reaktionskette zugegeben worden und nach weiteren 90 Sekunden wurde die Messreihe exakt gleich wie bei der Messung mit Pyruvat als Substrat mit der ADP-Reihe, sowie der Zugabe von Oligomycin und Dinitrophenol fortgesetzt.

2.2.6.4 Auswertung

Mitochondriale Atmung und mitochondriales Membranpotential:

Die Mitochondriale Atmung wurde anhand der Sauerstoffkonzentrationsänderung in Abhängigkeit der Zeit abgeleitet. Dazu wurde für jeden Abschnitt jeder einzelnen Messung ein Intervall definiert und aus diesem die Änderung der Sauerstoffkonzentration entnommen und in einer Excel-Tabelle aufgelistet. Die Bestimmung von Mittelwerten, Abweichungen und Signifikanzen wurde in Prism durchgeführt. Folgende Abschnitte (State 1-3u) wurden nach Chance und Williams definiert [89]:

- State 1: Plateauphase zu Beginn der Messung **ohne** Substrat
- State 2: Plateauphase zu Beginn der Messung **mit** Substrat
- State 3: Plateauphase des maximalen Sauerstoffverbrauchs nach ADP-Zugabe
(jeweils vier mal)
- State 4: Plateauphase nach Zugabe von Oligomycin
- State 3u: Plateauphase des maximalen Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von Dinitrophenol

Jede Plateauphase wurde von Hand in der Herstellersoftware DatLab markiert. Durch exakte Kalibration vor Beginn der Messung konnte die Änderung des Sauerstoffverbrauchs markiert und daraus der Sauerstoffverbrauch im Format **nmolO₂ / (mg Protein * min)** kalkuliert werden.

Das mitochondriale Membranpotential wurde mittels Excel ausgewertet. Die Rohdaten wurden als zweidimensionale Matrix in Excel exportiert. In Excel wurden die oben genannten Abschnitte (State 1 bis State 3u) markiert und deren Integrale sowie die Dauer der einzelnen Abschnitte berechnet. Mit Prism wurden die Signifikanzen bestimmt und ein two-way ANOVA mit Bonferroni posttest durchgeführt. Dargestellt wurden die Daten als Relation zum jeweils vorherigen Quotienten aus Integral und Dauer des jeweiligen Abschnittes mit Graph-Pad Prism.

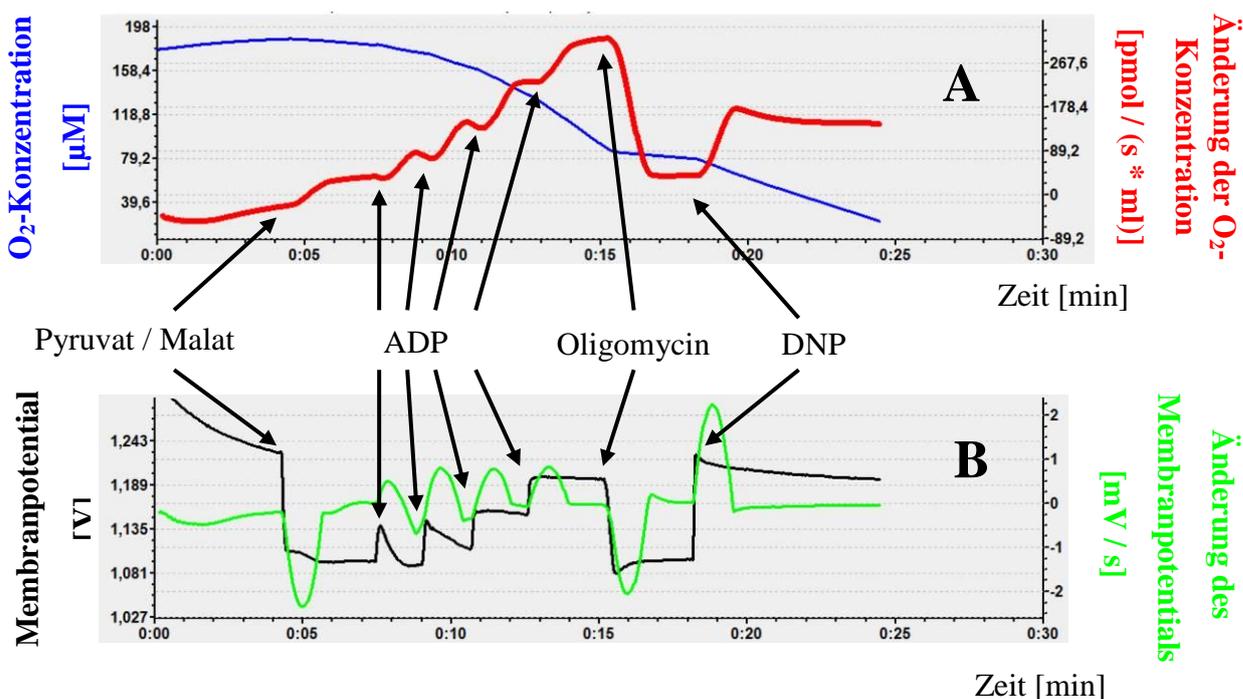


Abbildung 17, A und B, Exemplarische Darstellung des Sauerstoffgehaltes und des mitochondrialen Membranpotentials in der Messkammer während des Versuchs mit Pyruvat und Malat als Substrate

Abbildung A beschreibt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer (blau) und deren Änderungsrate (rot) im zeitlichen Verlauf. Abbildung B beschreibt das mitochondriale Membranpotential (schwarz) und dessen Änderungsrate (grün) ebenso im zeitlichen Verlauf. Als Substrate dienen in dieser Versuchsreihe Pyruvat und Malat. Die markierten Stellen kennzeichnen die Zeitpunkte an denen der jeweilige Stoff hinzugegeben wurde. ADP wurde insgesamt vier Mal in aufsteigender Konzentration je Messreihe hinzugegeben. Angaben zu den Konzentrationen finden sich im Protokoll. Etwa 4-5 Minuten nach Zugabe von Dinitrophenol (DNP) wurde die Messung beendet.

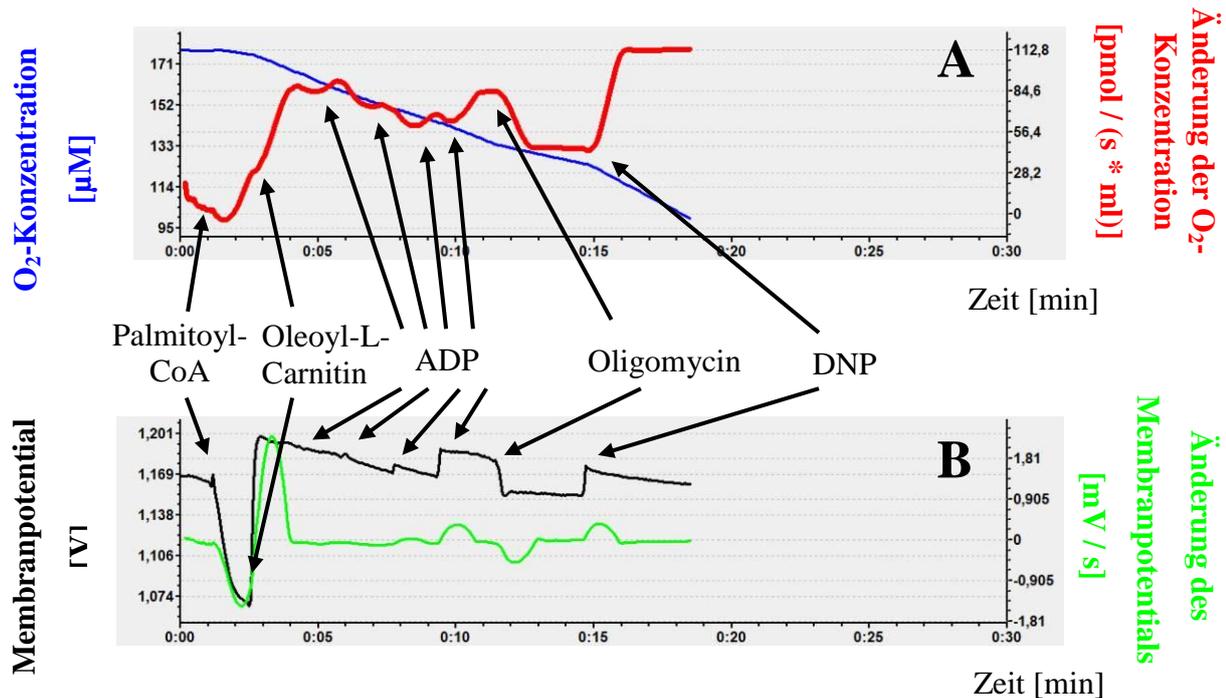


Abbildung 18, A und B, Exemplarische Darstellung des Sauerstoffgehaltes und des mitochondrialen Membranpotentials in der Messkammer während des Versuchs mit Fettsäuren als Substrat

Abbildung A beschreibt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer (blau) und deren Änderungsrate (rot) im zeitlichen Verlauf. Abbildung B beschreibt das mitochondriale Membranpotential (schwarz) und dessen Änderungsrate (grün) ebenso im zeitlichen Verlauf. Als Substrat dienen in dieser Versuchsreihe Fettsäuren. Die markierten Stellen kennzeichnen die Zeitpunkte an denen der jeweilige Stoff hinzugegeben wurde. ADP wurde insgesamt vier Mal in aufsteigender Konzentration je Messreihe hinzugegeben. Etwa 4-5 Minuten nach Zugabe von Dinitrophenol (DNP) wurde die Messung beendet.

2.2.7 Mitochondrien-Kalziumaufnahme-Messung mithilfe eines MPTP-Assay

Die Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP) ist ein Protein-Komplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht und bis heute noch nicht vollständig erforscht ist. Bekannt ist, dass die MPTP bei zellulärem Stress, wie zum Beispiel vermehrt vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies oder hohem Kalziumspiegel, eine sogenannte Mega-Pore (durchlässig für Moleküle bis 1,5 kDa) zwischen der inneren und der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden kann und so zum Verlust der Kompartimentgrenzen führt [90]. Der Verlust dieser Grenzen bedeutet gleichzeitig auch einen Ausgleich der Ionenkonzentrationen von mitochondrialem und zytosolischem Kompartiment.

Bevor bei erhöhten zytosolischen oder extramitochondrialen Kalziumspiegeln eine Überladung der Mitochondrien mit Kalzium stattfindet, nehmen diese hauptsächlich freies Kalzium

über den mitochondrialen Kalzium-Uniporter auf und reduzieren somit auch das extramitochondriale Kalzium. [91] Mithilfe des extramitochondrialen Fluoreszenzfarbstoffes Calcium-Green 5N kann die Konzentration von freiem Kalzium fluorenszoptisch gemessen werden und somit bei Zugabe von externem freiem Kalzium die Aufnahme in die Mitochondrien und die Funktion der MPTP indirekt verifiziert werden. [92] Überprüft wurden im Rahmen dieses Assays die Kalzium-Aufnahme und die maximale Kapazität der Mitochondrien für Kalzium, bis die MPTP aufgrund eines zu hohen intramitochondrialen Kalziumspiegels die Mega-Pore öffnete. [93]

Es wurden dieselben Mitochondrien-Fraktionen wie für die Messung mit dem Oroboros verwendet (Kapitel 2.2.6). Von jedem Tier wurden ebenfalls von allen drei entnommenen Organen (Herz, Gehirn und Skelettmuskel) je zwei Assays gemacht und der Mittelwert zur weiteren Berechnung herangezogen. Dazu wurden in jede Probe PTP-Puffer mit EGTA, mit einer vorgelegten Konzentration von 5 mmol / l Glutamat und 2,5 mmol / l Malat, jeweils insgesamt 412,5 µg Mitochondrien und 4 µl DMSO als Lösungsmitteläquivalent für das in der Hälfte der Proben zusätzlich hinzugegebene Ciclosporin A, sodass am Ende in allen Proben ein Gesamtvolumen von 437,5 µl vorlag. Zu der Hälfte der Proben wurden nochmals zusätzlich 2 µM Ciclosporin A hinzugefügt. Ciclosporin A hemmt die MPTP und führt dadurch bei Kalziumzugabe zu einer gesteigerten mitochondrialen Beladung mit Kalzium, wenn normalerweise die MPTP schon eine Mega-Pore bilden würde. [94] Somit lassen sich Rückschlüsse über die Dichtigkeit der Mitochondrienmembran ziehen. Zuletzt wurde noch der Farbstoff Calcium-Green 5N für eine resultierende Konzentration von 1 µmol / l dazugegeben, der seine Fluoreszenzeigenschaften abhängig von der äußeren Kalziumkonzentration ausbildet, bevor mit der eigentlichen Messung und der Zugabe von Kalzium begonnen wurde. [95]

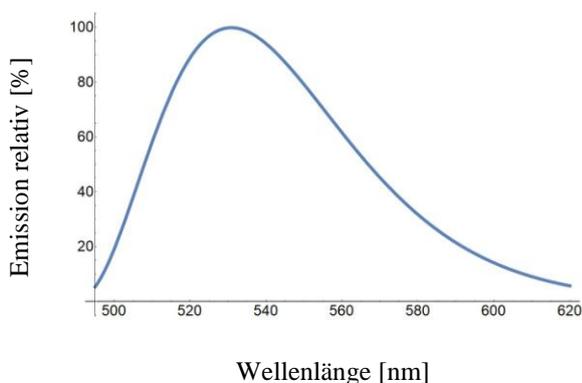


Abbildung 19, Emissionsverhalten des Farbstoffes Calcium-Green 5N

Dargestellt ist das relative Emissionsspektrum des Farbstoffes Calcium-Green 5N, welches bei etwa 532 nm sein Maximum erreicht. Die Abbildung basiert auf [96].

Die Kalziumkonzentration wurde mit einer Anregungsfrequenz von 506 nm und einer Detektionsfrequenz von 532 nm mit dem Fluoreszenzplattenreader Tecan M200 Pro gemessen. Jeweils nach 120 Sekunden wurden in alle Proben 10 µl Kalziumchloridlösung (200 mM), mit einer resultierenden Erhöhung von 10 µmol / l freien Kalziums, gelöst in PTP-Puffer ohne EGTA, automatisch eingespritzt. [97] Gemessen wurde alle 5 Sekunden, sodass der extramitochondriale Kalziumabfall registriert werden konnte. Insgesamt wurden bei jeder Versuchsreihe 12 Dosen Kalziumchlorid hinzugegeben.

Alle Messwerte wurden als Relation zum Leerwert direkt als Excel-Datei gespeichert und in GraphPad Prism übertragen. Hier wurde für jeden Probenotyp (jeweils 6 Messungen je Organ und Maustyp) ein Two-way ANOVA-Test mit Bonferroni posttest durchgeführt.

2.2.8 Detektion defekter Mitochondrien mittels Cytochrom C-Assay

Zur zusätzlichen Identifikation von möglicherweise defekten Mitochondrien wurde in der zytosolischen Fraktion der präparierten Organe (Herz, Gehirn und Skelettmuskel) der Gehalt an Cytochrom C mittels WesternBlot bestimmt. Die Methodik wurde schon in Kapitel 2.2.4 detailliert beschrieben. Cytochrom C kommt natürlicherweise nur in der inneren Mitochondrienmembran vor und wird nur bei einem Untergang der Mitochondrien im Zytosol freigesetzt. [98]

2.2.9 Auswahl der Tiere für die Zell- und Mitochondrienanalysen

Für die Versuche der Zell- und Mitochondrienanalysen standen 27 Tiere zur Verfügung. Davon waren acht männliche WT, fünf weibliche WT, neun männliche KO und fünf weibliche KO. Alle Tiere waren zwischen 5 und 12 Monate alt, sodass sich bei den KO-Tieren erste SPRED2 KO phänotypische Eigenschaften bereits ausgeprägt hatten.

Die jüngeren Tiere wurden zur Zellisolation und zur Messung an der IonOptix verwendet, die älteren Tiere hingegen zur Mitochondrien-Isolation. Es wurde bei beiden Versuchsgruppen (Zellisolation und Mitochondrienanalyse) sowohl darauf geachtet die Tiere nach ihrem Geschlecht als auch auf ihr Alter in eine WT und KO Gruppe zu sortieren. Folgende Tabelle 4 und Tabelle 5 zeigen die genaue Zuordnung der Tiere.

Mausnummer	Versuch	Genotyp	Geschlecht	Alter (Monate)
147	Zellisolation	WT	♂	10
148	Zellisolation	WT	♂	10
196	Mitochondrienanalyse	WT	♂	9
651	Mitochondrienanalyse	WT	♂	9
339	Mitochondrienanalyse	WT	♂	8
267	Zellisolation	WT	♂	8
268	Zellisolation	WT	♂	8
347	Zellisolation	WT	♂	7
157	Mitochondrienanalyse	WT	♀	10
648	Mitochondrienanalyse	WT	♀	10
189	Mitochondrienanalyse	WT	♀	10
199	Zellisolation	WT	♀	9
426	Zellisolation	WT	♀	5

Tabelle 4, Liste der WT Mäuse für Zellisolation und Mitochondrienanalyse

Aufgelistet sind die ursprünglichen Tiernummern aller Wildtyp-Mäuse, sowie die Zuordnung zum jeweiligen Versuch, Geschlecht und Alter in Monaten, welche für die jeweiligen Versuche verwendet wurden.

Mausnummer	Versuch	Genotyp	Geschlecht	Alter (Monate)
143	Zellisolation	KO	♂	12
191	Zellisolation	KO	♂	11
198	Mitochondrienanalyse	KO	♂	9
650	Mitochondrienanalyse	KO	♂	9
224	Mitochondrienanalyse	KO	♂	9
225	Mitochondrienanalyse	KO	♂	9
253	Mitochondrienanalyse	KO	♂	8
266	Mitochondrienanalyse	KO	♂	8
361	Zellisolation	KO	♂	6
164	Mitochondrienanalyse	KO	♀	11
165	Mitochondrienanalyse	KO	♀	11
649	Zellisolation	KO	♀	10
652	Zellisolation und Mitochondrienanalyse	KO	♀	7
653	Zellisolation	KO	♀	6

Tabelle 5, Liste der KO Mäuse für Zellisolation und Mitochondrienanalyse

Aufgelistet sind die ursprünglichen Tiernummern aller Knockout-Mäuse, sowie die Zuordnung zum jeweiligen Versuch, Geschlecht und Alter in Monaten, welche für die jeweiligen Versuche verwendet wurden.

2.2.10 Genotypisierung der SPRED2 Mäuse

Regelmäßig wurden die neu geborenen Tiere mittels einer kleinen Probe ihres Schwanzes und der Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein eines gesunden SPRED2-Allels und eines dem Stamm entsprechenden veränderten SPRED2-Allels genotypisiert. Die Eltern-tiere für die Zucht waren jeweils heterozygote Tiere, sodass prinzipiell alle drei Kombinationen möglich waren: SPRED2 homozygot WT, SPRED2 heterozygot und SPRED2 homozygot KO. Zur Forschung wurden ausschließlich die homozygoten Tiere verwendet, also SPRED2 WT und SPRED2 KO. Wurde in der PCR ein Signal nur für einen Typus des SPRED2-Allels gefunden, so war das Tier dem Typus entsprechend homozygot. Wurden beide Allele gefunden, so war das Tier entsprechend heterozygot und wurde nicht für die Versuche herangezogen.

2.3 Statistik und Datenanalyse

Sofern nichts anderes vermerkt wurden die Daten mit Excel ausgewertet und die Signifikanzen unter Zuhilfenahme des Student's T-Test bestimmt. Die Darstellung erfolgte anschließend ebenfalls mittels Excel oder GraphPad Prism. In den Diagrammen sind die Mittelwerte und je nach Typ auch die einzelnen Datenpunkte sowie der Standardfehler (\pm SEM) dargestellt.

Die Signifikanzen der Zellstimulationsmessungen, der Atmungsmessungen, sowie die der MPTP-Assays, wurden mittels Two-way-ANOVA in Kombination mit einem Bonferroni posttest berechnet. Dabei galten die Wertepaare Stimulationsfrequenz / Messwert, Zeit / Kalziumgehalt, Zeit / Sauerstoffverbrauch bzw. Zeit / Änderung des Membranpotentials und WT / KO als Untersuchungsparameter.

Die Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt: * für $p < 0.05$; ** für $p < 0.01$; *** für $p < 0.001$ und **** für $p < 0.0001$ bei allen Student's T-Tests und allen Bonferroni posttests. Bei signifikantem Two-way-ANOVA ($p < 0.05$) wurde die jeweilige Kurve am Ende mit „#“ gekennzeichnet.

Die Darstellung der Versuchsanzahl der Zellstimulationsmessungen erfolgt immer doppelt. Es sind sowohl die Anzahl der Einzelzellmessungen als auch die Anzahl der verwendeten Versuchstiere nach folgendem Schema angegeben: n = Zellen/Tiere.

3 Ergebnisse

3.1 In Vivo Versuche

3.1.1 Flussgeschwindigkeitsmessung

Gemessen wurden die Blutflussgeschwindigkeiten mittels Doppler in Zentimetern pro Sekunde in Aorta und den beiden Carotis-Arterien zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Dabei konnten je nach Zeitpunkt und Messstelle unterschiedlich viele Tiere herangezogen werden. Folgende Tabelle 6 gibt die Anzahl der Tiere in den unterschiedlichen Versuchen an:

SPRED2 WT				SPRED2 KO			
	Carotis rechts	Carotis links	Aorta		Carotis rechts	Carotis links	Aorta
Vor TAC-OP	n = 11	n = 10	n = 5	Vor TAC-OP	n = 8	n = 8	n = 3
Unmittelbar nach TAC-OP	n = 11	n = 10	n = 4	Unmittelbar nach TAC-OP	n = 9	n = 9	n = 3
Drei Wochen nach TAC-OP	n = 10	n = 11	n = 4	Drei Wochen nach TAC-OP	n = 8	n = 9	n = 4

Tabelle 6, Anzahl der Tiere bei Flussgeschwindigkeitsmessungen in den Carotiden und der Aorta

Die Tabelle zeigt die jeweilige Stichprobenanzahl pro Messreihe. Links sind die Zahlen für die Wildtyp-Mäuse aufgeschlüsselt, rechts die für Knockout-Mäuse. Jeder der drei Messreihen (vor, unmittelbar nach TAC-OP und drei Wochen später) wurde mit unterschiedlicher Stichprobenzahl in den beiden Carotiden und der Aorta durchgeführt.

3.1.1.1 Vor der TAC-OP

Vor dem operativen Eingriff lagen keine Signifikanten Veränderungen der Flussgeschwindigkeiten vor, weder in den Carotiden noch in der Aorta, siehe Abbildung 20.

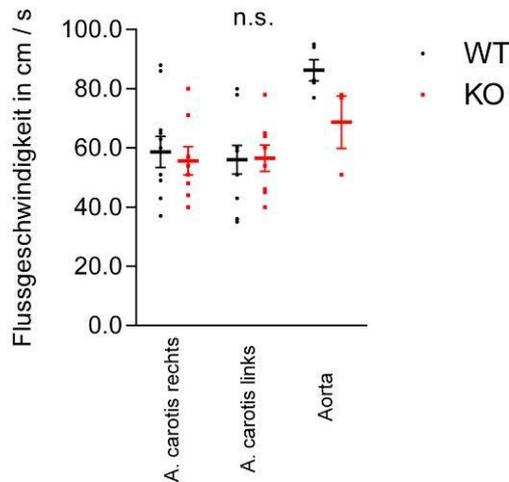


Abbildung 20, Dopplermessung vor der TAC-OP

Die Flussgeschwindigkeitsmessungen der verschiedenen Gefäße, mittels Dopplermessung vor der TAC-OP, ergaben keine signifikanten Unterschiede. Es wurden folgende Anzahl an Messungen durchgeführt: n (WT Carotis rechts) = 11 und n (KO Carotis rechts) = 8, für n (WT Carotis links) = 10 und n (KO Carotis links) = 8 und für die Aortenmessungen ist n (WT Aorta) = 5 und n (KO Aorta) = 3.

3.1.1.2 Unmittelbar nach der TAC-OP

Unmittelbar nach der TAC-OP wurde eine Kontrolle der Flussgeschwindigkeiten durchgeführt, auch um den Erfolg der Operation zu zeigen. Hierbei erkennt man den typischen Anstieg der Flussgeschwindigkeit der rechten A. carotis und einen entsprechend geringeren Fluss der linken A. carotis im Vergleich zur Flussgeschwindigkeit vor der TAC-Operation. Dieser Effekt beweist den Erfolg der Operation. Für jedes Tier wurde jeweils ein Verhältnis berechnet aus der Flussgeschwindigkeit von links zu rechts und es wurden anschließend nur Tiere mit einem Score von kleiner als 0,6 für weitere Versuche einbezogen. Der Fluss über der Aorta stieg durch die iatrogene Stenose ebenfalls stark an. Bei der Messung des Aortenbogens unmittelbar nach der TAC-OP konnte ein signifikanter Unterschied der Flussgeschwindigkeiten nachgewiesen werden (Abbildung 21: Mittelwerte WT 320,16 cm / s zu KO 263,76 cm / s bei $p = 0.047$). Mutmaßlich hat dieser leicht signifikante Unterschied etwas mit der verminderten Körpergröße zu tun.

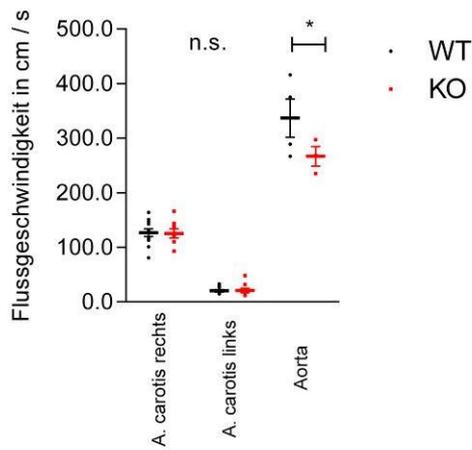


Abbildung 21, Dopplermessung unmittelbar nach der TAC-OP

Die Flussgeschwindigkeitsmessungen der verschiedenen Gefäße, mittels Dopplermessung unmittelbar nach der TAC-OP, ergaben keine signifikanten Unterschiede für die Carotiden. Die Flussgeschwindigkeit der Aorta war mit $p = 0,047$ leicht signifikant unterschiedlich. Für die Carotis-Messungen ist n (WT Carotis rechts) = 11 und n (KO Carotis rechts) = 9, für n (WT Carotis links) = 10 und n (KO Carotis links) = 9 und für die Aortenmessungen ist n (WT Aorta) = 4 und n (KO Aorta) = 3.

3.1.1.3 Drei Wochen nach der TAC-OP

Exakt drei Wochen nach der TAC-Operation und unmittelbar vor der hämodynamischen Messung wurde erneut eine Dopplermessung durchgeführt. Hierbei waren die Unterschiede der Flussgeschwindigkeiten wieder etwas ausgeglichener, sodass kein signifikanter Unterschied mehr zu erkennen war, siehe Abbildung 22.

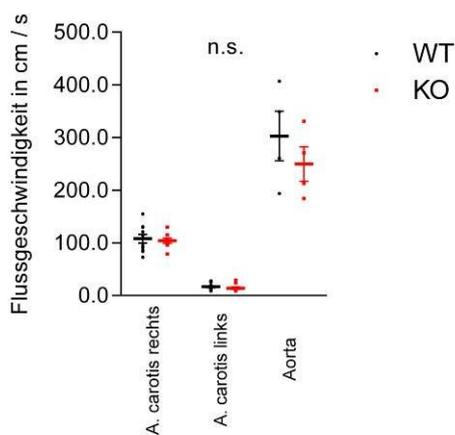


Abbildung 22, Dopplermessung drei Wochen nach der TAC-OP

Die Flussgeschwindigkeitsmessungen der verschiedenen Gefäße, mittels Dopplermessung drei Wochen nach der TAC-OP, ergaben erneut keine signifikanten Unterschiede. Für die Carotis-Messungen ist n (WT Carotis rechts) = 10 und n (KO Carotis rechts) = 8, für n (WT Carotis links) = 11 und n (KO Carotis links) = 9 und für die Aortenmessungen ist n (WT Aorta) = 4 und n (KO Aorta) = 4.

3.1.1.4 Druckgradient über der Aortenklappe

Der Druckgradient, welcher indirekt die Klappenöffnungsfläche widerspiegelt, kann mithilfe der vereinfachten Bernoulli-Gleichung berechnet werden. Diese lautet $\Delta P = 4 * v^2$. Hierbei steht ΔP für den Druckgradienten über der Stenose bzw. der Aortenklappe und v für die Flussgeschwindigkeit gemessen mittels Dopplermessung in der Aorta. [99] Hierbei konnte in Abbildung 23 kein relevanter Druckunterschied über der Aortenklappe gemessen werden.

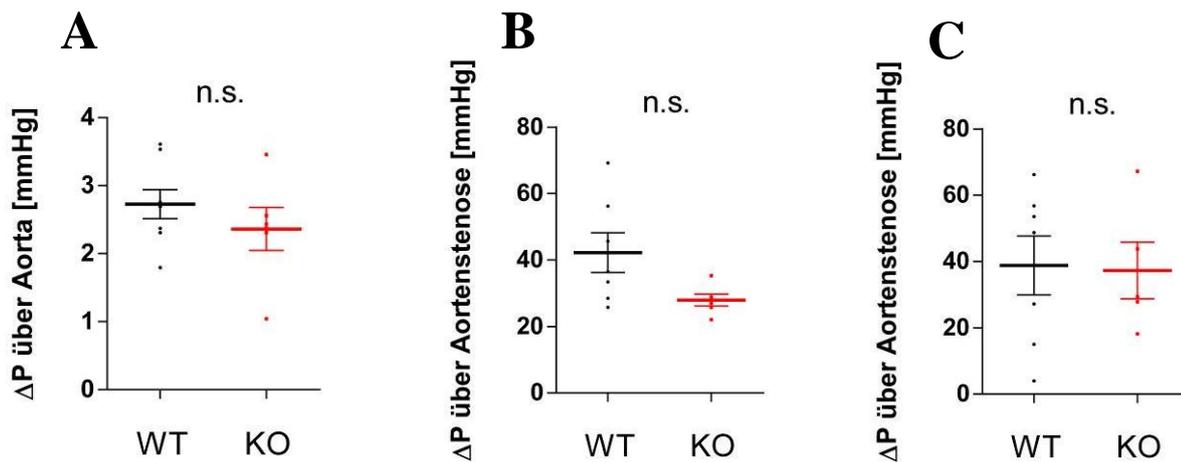


Abbildung 23, Druckgradient über der Aorta / Aortenstenose mittels vereinfachter Bernoulli-Gleichung

Dargestellt sind die berechneten Druckgradienten mithilfe der Doppler-Flussgeschwindigkeitsmessungen der Aorta. **A:** Vor der TAC-Operation, n (WT) = 8 und n (KO) = 6, **B:** Direkt nach der TAC-Operation, n (WT) = 7 und n (KO) = 6, **C:** 3 Wochen nach der TAC-Operation, n (WT) = 7 und n (KO) = 5.

Die Flussgeschwindigkeitsmessungen ergaben, bis auf die Messung nach der TAC-Operation in der Aorta, keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 22). Der Unterschied in der Aorta war zu erwarten, da das Lumen auf ein einheitliches Maß von 27G verringert wurde, die KO Mäuse und deren Gefäße aber insgesamt kleiner sind. Somit war relativ gesehen die Lumeneinengung bei den KO-Tieren etwas geringer als bei den Wildtypen und daher auch die Flussgeschwindigkeit nicht so stark erhöht. Die weiteren Flussgeschwindigkeitsmessungen in der Aorta und den Carotiden ergaben keine Unterschiede, was für eine gute Kompensationsfähigkeit der KO-Tiere bei gesteigerter Nachlast spricht. Auch die Flussgeschwindigkeit in der Aorta gleicht sich nach 3 Wochen wieder an, was ebenfalls auf eine gute Kompensationsfähigkeit hindeutet. Hier wurden ausschließlich junge Tiere im Alter von wenigen Monaten untersucht. Prinzipiell ist der Phänotyp der SPRED2 defizienten Tiere desto ausgeprägter, je älter sie werden. Daraus lässt sich nun schlussfolgern, dass junge SPRED2-KO Mäuse noch sehr gute kardiale Adaptionsmechanismen besitzen und keine klinisch manifeste Herzinsuffizienz aufweisen.

3.1.2 Invasive Hämodynamik Untersuchung unbehandelter Tiere

Zur Klärung, welche Auswirkungen die bekannte Myokardhypertrophie auf die Herzleistung hat, wurde die hämodynamische Untersuchung primär an unbehandelten Tieren durchgeführt. Es konnten insgesamt 18 Tiere mit dem Genotyp SPRED2 WT und einem durchschnittlichen Alter von 15,21 Monaten untersucht werden und 14 Tiere mit dem Genotyp SPRED2 KO und einem durchschnittlichen Alter von 14,88 Monaten. Gemessen wurden die Drücke und Volumina im linken Ventrikel.

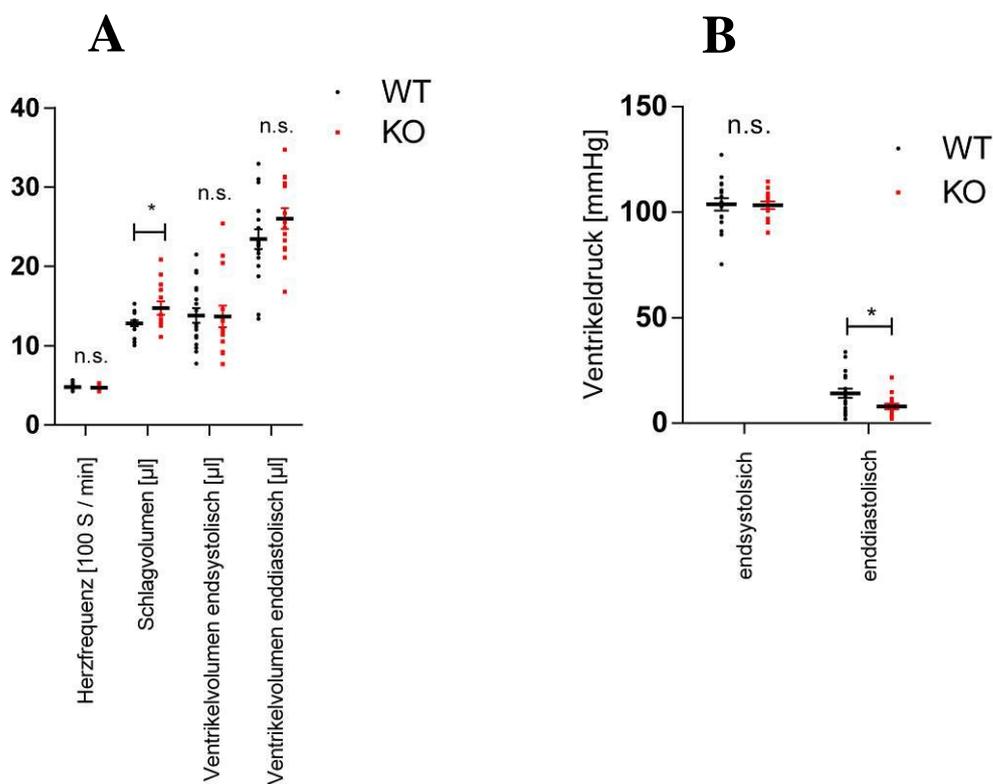


Abbildung 24, A und B, Hämodynamikmessung unbehandelter SPRED2 WT und SPRED2 KO Tiere

Abbildung A zeigt die Ventrikelvolumina und die herzfrequenzabhängigen Parameter der hämodynamischen Messungen unbehandelter SPRED2 WT und KO Mäuse. Das Schlagvolumen ($p = 0.031$) war bei den KO-Mäusen signifikant größer.

Abbildung B zeigt den endsystolischen und den enddiastolischen Ventrikeldruck der hämodynamischen Messungen unbehandelter SPRED2 WT und KO Mäuse. Hierbei war der enddiastolische Ventrikeldruck bei den KO-Mäusen signifikant niedriger ($p = 0.023$).

Für A und B waren n (WT) = 18 und n (KO) = 14.

Bei ausgeglichener Herzfrequenz ließ sich ein signifikanter Unterschied im Schlagvolumen (Mittelwert WT 11,73 μ l zu KO 13,99 μ l bei $p = 0.031$) erkennen. Im Zusammenhang scheint auch der signifikant niedrigere enddiastolische Ventrikeldruck (Mittelwerte WT 13,26 mmHg zu KO 7,55 mmHg bei $p = 0.023$) zu stehen, wobei der endsystolische Ventrikeldruck unbeeinflusst zu bleiben scheint. Die enddiastolischen und endsystolischen Ventrikelvolumina für sich genommen waren nicht signifikant unterschiedlich, was vermutlich an einer zu geringen Versuchstierzahl liegt, da das Schlagvolumen hingegen eine ausreichend signifikante Differenz erreichte.

3.1.3 Invasive Hämodynamik Untersuchung drei Wochen nach der TAC-OP

Im zweiten Schritt wurden TAC-operierte Tiere hämodynamisch untersucht. Es konnten insgesamt 9 Tiere mit dem Genotyp SPRED2 WT und einem durchschnittlichen Alter von 8,7 Wochen untersucht werden und 8 Tiere mit dem Genotyp SPRED2 KO und einem durchschnittlichen Alter von 8,9 Wochen. Das junge Alter im Vergleich zu den nicht operierten Tieren war absichtlich gewählt, um einen induzierten Alterungs- und Adaptionsprozess im jungen Tier besser untersuchen zu können. Tendenziell waren die jungen TAC-operierten KO Mäuse schlechter in der Lage den Druckgradienten in der Aorta zu kompensieren, allerdings ergaben sich noch keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu den nicht operierten älteren Tieren sind aber klar gegensätzliche Entwicklungen der Herzleistung erkennbar. Parallelen zu den älteren Tieren zeigten sich beim enddiastolischen Ventrikeldruck. Dieser war ebenfalls signifikant reduziert (Mittelwerte WT 24,34 mmHg zu KO 14,61 mmHg bei $p = 0.033$), siehe Abbildung 25.

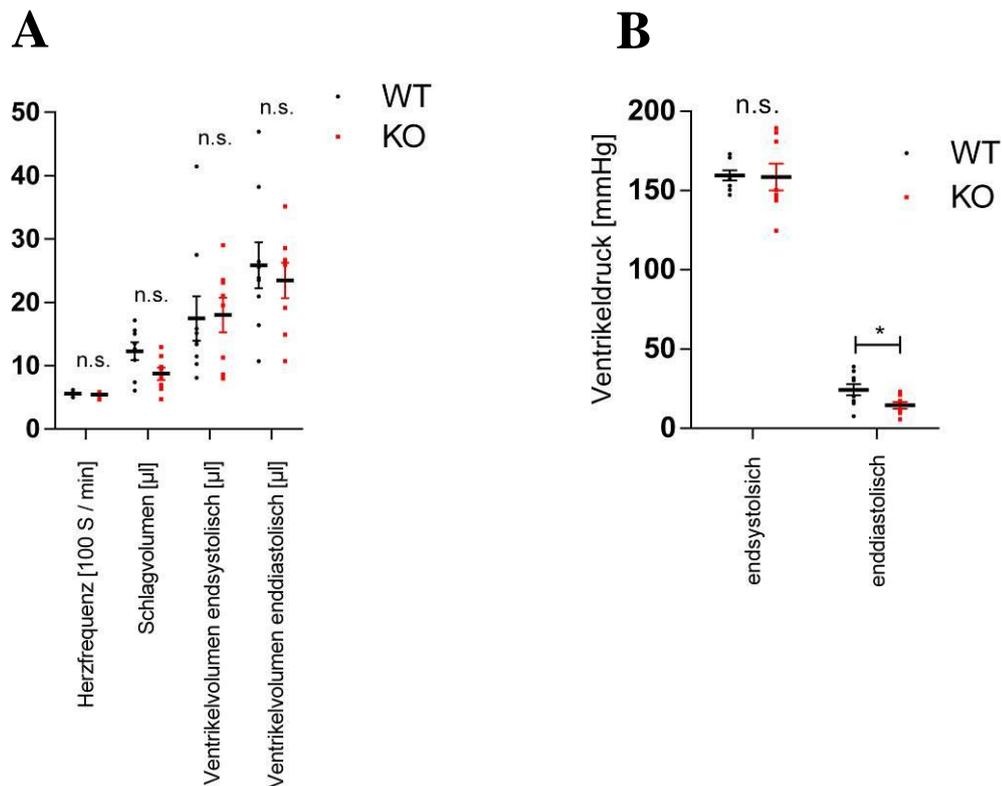


Abbildung 25, A und B, Häodynamikmessung TAC-operierter SPRED2 WT und SPRED2 KO Tiere

Abbildung A zeigt die Ventrikelvolumina und die herzfrequenzabhängigen Parameter der häodynamischen Messungen von SPRED2 WT und KO Mäusen drei Wochen nach der TAC-OP. Es ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede mehr.

Abbildung B zeigt den endsystolischen und den enddiastolischen Ventrikeldruck der häodynamischen Messungen von SPRED2 WT und KO Mäusen drei Wochen nach der TAC-OP. Hierbei war der enddiastolische Ventrikeldruck bei den KO-Mäusen weiterhin signifikant niedriger ($p = 0.033$).

Für A und B waren n (WT) = 9 und n (KO) = 8.

3.1.3.1 Messungen im Aortenbogen

Zusätzlich zur häodynamischen Messung im linken Ventrikel wurden auch die Drücke in der Aorta gemessen. Es konnte durch Ullrich et al. schon gezeigt werden, dass unbehandelte SPRED2 KO Tiere keine signifikanten Unterschiede beim Blutdruck aufweisen. [42] Bei diesem Versuch konnte nun auch bewiesen werden, dass TAC-operierte Mäuse, trotz erhöhter Nachlast, keine Blutdruckdifferenzen aufweisen, gezeigt in Abbildung 26. Der Aortendruck entspricht dem Blutdruck, da der Blutdruck zwischen systolischem Wert und diastolischem Wert schwankt, würde man für den mittleren arteriellen Blutdruck mathematisch den Mittelwert des Integrals bestimmen. Eine einfache Näherung daran ist die Summe aus $1/3$ des systolischen oder maximalen Druckes und $2/3$ des diastolischen oder minimalen Druckes (Arterieller Mitteldruck), welcher hier verwendet wurde. [64]

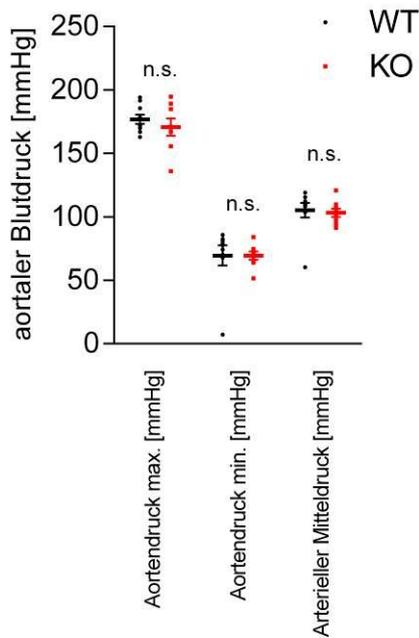


Abbildung 26, Aortaler Blutdruck nach TAC-Operation

Die invasiven Messungen des Blutdrucks nach der TAC-Operation in der Aorta ergaben weder für den maximalen, den minimalen, noch den arteriellen Mitteldruck signifikante Unterschiede. Für alle drei Parameter waren n (WT) = 9 und n (KO) = 8.

3.2 In Vitro Versuche

3.2.1 Kardiomyozyten Stimulationsmessungen

Die isolierten Kardiomyozyten wurden nach oben genanntem Protokoll entweder mit dem Farbstoff di-8-ANEPPS oder Indo beladen und unter Stimulation während der Kontraktionszyklen auf Länge, Membranpotential und Kalziumgehalt hin untersucht.

3.2.1.1 Membranpotential

Das Membranpotential wurde mit dem Farbstoff di-8-ANEPPS untersucht. Anhand des ratiometrischen Emissionsverhaltens konnte ein relatives Membranpotential gemessen werden. Die Rohdaten wurden so ausgewertet, dass Ruhemembranpotential, sowie das maximale bzw. das Aktionspotential, als auch die Dauer von Stimulation bis zum Erreichen des maximalen Membranpotentials und die Dauer nach dem maximalen Aktionspotential von Stimulation bis

zum Erreichen von 50 % bzw. 90 % des Ruhemembranpotentials frequenzabhängig dargestellt und verglichen werden konnten.

Das Ruhemembranpotential zeigte hierbei keinen Anhalt für einen signifikanten Unterschied ($p = 0,29$), wie in Abbildung 27 dargestellt. Es wurden für diese Messung 16 Zellen (von 3 Mäusen) der SPRED2 WT und 17 Zellen (von 3 Mäusen) der SPRED2 KO Mäuse verwendet und mittels FCCP und Oligomycin zum Erliegen der ATP-Synthese und in Folge dessen zum Zusammenbruch des Membranpotentials gebracht. Der Zusammenbruch des Membranpotentials durch die Zuführung von FCCP und Oligomycin war leider nicht eindeutig im zeitlichen Verlauf festzulegen. Aus diesem Grund können die erhobenen Daten zum Ruhemembranpotential nicht als eindeutig und abschließend betrachtet werden.

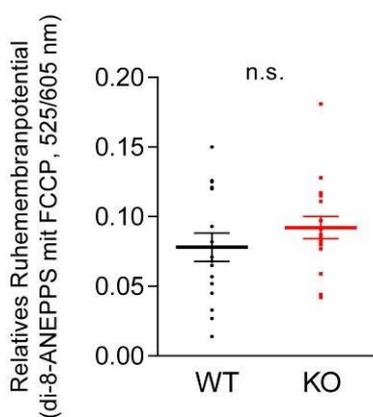


Abbildung 27, Relatives Ruhemembranpotential

Dargestellt ist das relative Ruhemembranpotential isolierter Kardiomyozyten von SPRED2 WT und KO Mäusen als Verhältnis der Potentiale zwischen zwei Stimulationen mit 0,5 Hz und dem zum Erliegen gekommenen Potential durch Zugabe von FCCP und Oligomycin. Es wurden n (WT) = 16/3 und n (KO) = 17/3 Zellen untersucht.

Hingegen zeigte das maximale bzw. das Aktionspotential für die Stimulationsfrequenz von 1 Hz (Mittelwerte WT 0,088 zu KO 0,095 bei $p = 0.023$) einen signifikanten Unterschied. Hier hatten die SPRED2 KO Maus-Kardiomyozyten ein signifikant höheres Aktionspotential. Bei den höheren Frequenzen blieb die Tendenz ebenfalls erhalten, aufgrund einer geringeren Anzahl von Versuchszellen wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 28 dargestellt.

Für die Messung des Aktionspotentials, sowie zur Bestimmung der Zeitintervalle von Stimulation bis zum Aktionspotential sowie zur Rückkehr von 50 % und 90 % des Ausgangswertes wurden mit je Genotyp 3 verwendeten Versuchstieren folgende Zellzahlen gemessen und in Tabelle 7 dargestellt:

Frequenz	0,5 Hz	1,0 Hz	2,0 Hz	3,0 Hz	4,0 Hz	6,0 Hz	8,0 Hz
SPRED2 WT	67	62	56	37	25	11	4
SPRED2 KO	68	47	42	36	28	15	2

Tabelle 7, Ausgewertete Zellzahlen bei Aktionspotentialmessungen mit di-8-ANEPPS

Von der Stimulationsfrequenz zwischen 0,5 Hz und 8 Hz abhängig sind die untersuchten Zellzahlen für die Messungen mit dem Farbstoff di-8-ANEPPS für beide Genotypen SPRED2 WT und KO dargestellt.

Die sinkenden Zahlen bei höheren Stimulationsfrequenzen ergaben sich dadurch, dass sich desto weniger Zellen nach Protokoll stimulieren ließen, je höher die Stimulationsfrequenz gewählt wurde.

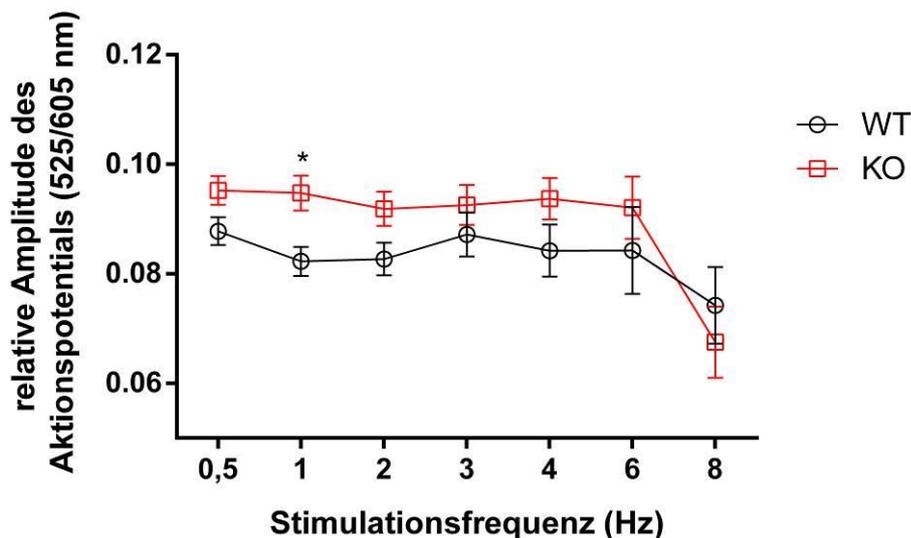


Abbildung 28, Relative Amplitude des Aktionspotentials

Dargestellt ist die relative Amplitude des Aktionspotentials als Quotient der beiden gemessenen Intensitäten in den Wellenlängen 525 nm und 606 nm, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 7 entnommen werden. Für die Stimulationsfrequenzen von 1 Hz ergab sich eine signifikant größere Amplitude für die KO-Zellen.

Das maximale Membranpotential lässt, vor allem in den niedrigeren Stimulationsfrequenzen, signifikante zeitliche Unterschiede bis zum Erreichen des maximalen Membranpotentials in Abbildung 29 erkennen. Die SPRED2 KO Kardiomyozyten waren deutlich schneller am Maximalwert angekommen als die Wildtypen der SPRED2 WT Mäuse.

Bei den Stimulationsfrequenzen von 1 Hz (Mittelwerte WT 4,55 ms zu KO 1,15 ms bei $p = 0.016$) und 2 Hz (Mittelwerte WT 5,77 ms zu KO 2,38 ms bei $p = 0.016$) lassen sich signifikante Unterschiede erkennen. Der Two-way-ANOVA ist ebenfalls signifikant unterschiedlich ($p = 0,04$).

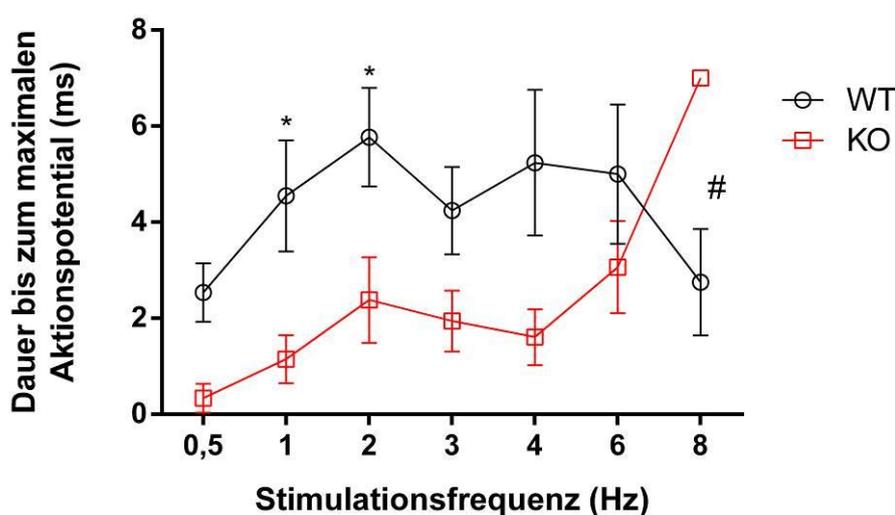


Abbildung 29, Dauer bis zum maximalen Aktionspotential

Dargestellt ist die Dauer bis zum Erreichen des maximalen inneren Membranpotentials der Kardiomyozyten, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 7 entnommen werden. Für die Stimulationsfrequenzen von 1 Hz und 2 Hz ergaben sich signifikant kürzere Zeiten bis zum Erreichen des maximalen inneren Membranpotentials für die KO-Zellen.

In den folgenden Graphen der Abbildung 30 sind die Repolarisationszeiten bis zum Erreichen von 50 % bzw. 90 % des Ausgangswertes nach Stimulation aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass bis zum Erreichen von 50 % keine großen Unterschiede vorhanden sind.

Bis zum Erreichen der 90 % des Ausgangswertes lassen sich in Abbildung 30 hingegen schon deutliche Unterschiede erkennen. Im mittleren Stimulationsfrequenzbereich von 1 Hz und 2 Hz benötigten die SPRED2 KO Kardiomyozyten deutlich mehr Zeit als die Wildtypen. Hier-

bei zeigen sich für die Frequenzen 1 Hz (Mittelwerte WT 132,1 ms zu KO 198,3 ms bei $p = 0.007$) und 2 Hz (Mittelwerte WT 134,8 ms zu KO 185,0 ms bei $p = 0.0001$) deutlich signifikante Unterschiede. Ebenfalls sind die Two-way-ANOVA Analysen bei beiden Kurven signifikant unterschiedlich: Für 50 % Rückgang gilt $p = 0.0012$ und für 90 % Rückgang gilt $p = 0.0010$.

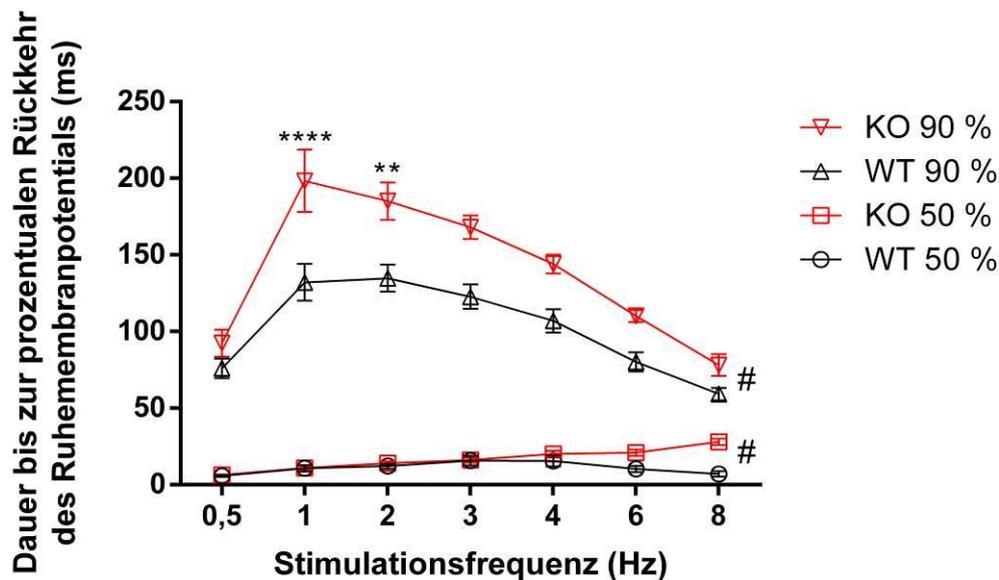


Abbildung 30, Zeit bis zu 50 % und 90 % Membranrepolarisation

Dargestellt ist die Dauer bis zum Wiedererreichen von 50% (untere Kurven) bzw. 90% (obere Kurven) des Ausgangsmembranpotentials in Abhängigkeit des maximalen Membranpotentials nach Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 7 entnommen werden.

3.2.1.2 Kalziummessungen

Die murinen Kardiomyozyten wurden mit Hilfe des Farbstoffes Indo während der Kontraktionszyklen auch auf ihren relativen Kalziumgehalt untersucht. Dieser Farbstoff folgt ebenfalls einem ratiomerischen Prinzip und kann daher unabhängig der Aufnahmeveldgröße genaue Ergebnisse zum relativen Kalziumgehalt liefern, wenn man die beiden Emissionsbereiche in Abhängigkeit setzt. Dabei wurden ebenfalls die maximalen und minimalen Kalziumwerte für jede Stimulationsfrequenz erhoben, sowie deren Amplitudenunterschiede. Außerdem wurde ebenfalls die Zeitdauer bis zum Erreichen des maximalen Kalziumgehaltes gemessen und die Dauer bis 50% bzw. 90% des Kalzium-Ausgangswertes erreicht wurden. Für alle Kalzium-

Messungen wurden je 4 WT Mäuse und 3 KO Mäuse mit folgenden Zellzahlen in Tabelle 8 verwendet:

Frequenz	0,5 Hz	1,0 Hz	2,0 Hz	3,0 Hz	4,0 Hz	6,0 Hz	8,0 Hz
SPRED2 WT	73	73	73	71	72	71	58
SPRED2 KO	62	62	62	56	50	36	28

Tabelle 8, Ausgewertete Zellzahlen bei Kalziummessungen mit dem Farbstoff Indo

Abhängig von der Stimulationsfrequenz zwischen 0,5 Hz und 8 Hz sind die untersuchten Zellzahlen für die Messungen mit dem Farbstoff Indo für beide Genotypen SPRED2 WT und KO dargestellt.

Ebenfalls wie beim Farbstoff di-8-ANEPPS verringerten sich die Fallzahlen bei steigender Stimulationsfrequenz, allerdings scheinen die Zellen den Farbstoff Indo besser toleriert zu haben als di-8-ANEPPS. Im folgenden Graphen sind die relativen Kalziumgehalte (im Verhältnis der beiden Emissionsspektren 405 nm / 485 nm) aufgetragen. Sowohl der maximale als auch der minimale Kalziumgehalt wurden für beide Zellgruppen in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Sowohl für den maximalen als auch den minimalen Kalziumgehalt konnten für die langsameren Stimulationsfrequenzen signifikante Unterschiede gefunden werden. So zeigt sich in Abbildung 31 für diese Werte je ein verringerter intrazellulärer Kalziumgehalt der SPRED2 KO Kardiomyozyten.

Für die Maximalwerte zeigt sich nur für die Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz (Mittelwerte WT 1,024 zu KO 0,938 bei $p = 0.015$) ein signifikanter Unterschied, bei den minimalen Werten zeigen sich für die Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz (Mittelwerte WT 0,883 zu KO 0,809 bei $p = 0.0018$), 1 Hz (Mittelwerte WT 0,880 zu KO 0,812 bei $p = 0.0045$), 2 Hz (Mittelwerte WT 0,885 zu KO 0,821 bei $p = 0.011$) und 3 Hz (Mittelwerte WT 0,890 zu KO 0,829 bei $p = 0.025$) signifikante Unterschiede. Ebenfalls sind die Two-way-ANOVA Analysen bei beiden Kurven signifikant unterschiedlich: Sowohl für die Systole als auch für die Diastole gilt jeweils $p < 0.0001$.

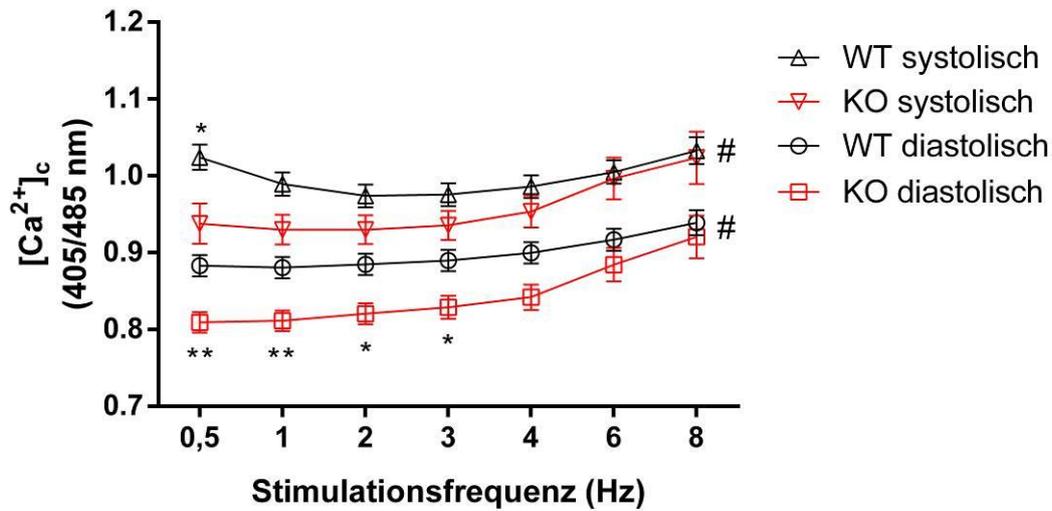


Abbildung 31, Relativer Kalziumgehalt

Dargestellt ist der relative Kalziumgehalt als Quotient der beiden gemessenen Intensitäten in den Wellenlängen 405 nm und 485 nm, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz und für den Minimal- und Maximalwert. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Die Differenzen zwischen maximalem und minimalem intrazellulärem Kalziumgehalt sind in folgendem Diagramm in Abbildung 32 dargestellt. Die Differenzen entsprechen dem relativen Kalziumshift pro Stimulation. Hierbei kann für die Stimulationsfrequenz von 4 Hz eine signifikant größere Amplitude für die SPRED2 KO Kardiomyozyten entdeckt werden als für die SPRED2 WT Kardiomyozyten (Mittelwerte WT 0,086 zu KO 0,111 bei $p = 0.030$). Der Two-way-ANOVA ist ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p < 0.0001$.

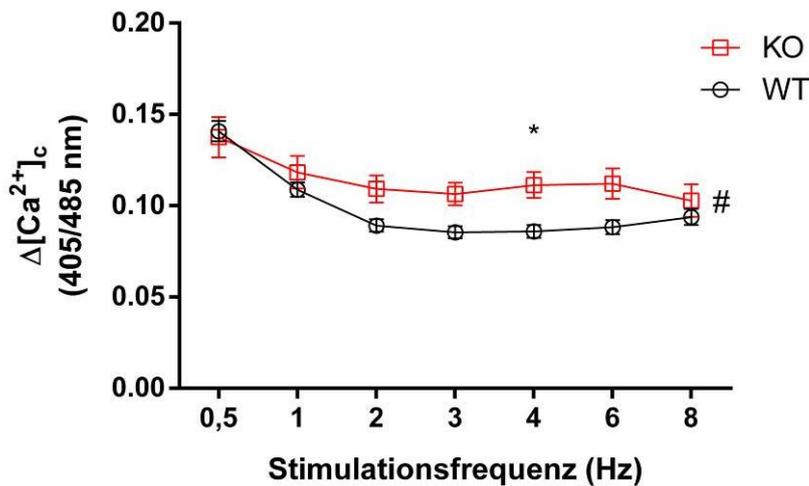


Abbildung 32, Kalziumshift: Differenz von maximalem zu minimalem Kalziumgehalt pro Zyklus

Dargestellt sind die Differenzwerte von maximalem und minimalem Kalziumwert während einer Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Wie bei der Messung des Aktionspotentials wurden auch für den intrazellulären Kalziumgehalt die Zeiten bis zum maximalen Kalziumgehalt bestimmt. Hier ergab sich für die Stimulationsfrequenz von 2 Hz eine signifikant längere Zeit für die SPRED2 KO Kardiomyozyten, was in Abbildung 33 gezeigt ist (Mittelwerte WT 21,4 ms zu KO 24,5 ms bei $p = 0.004$). Der Two-way-ANOVA ist ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p < 0.0001$.

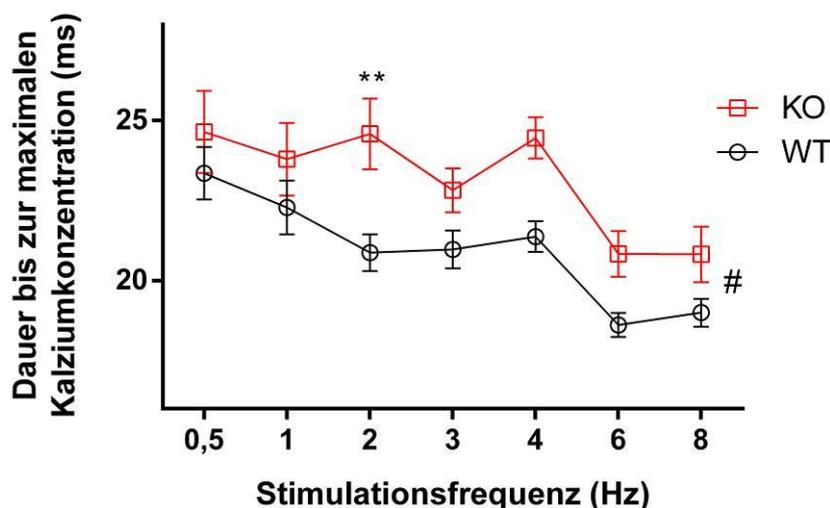


Abbildung 33, Dauer bis zum maximalen freien zytosolischen Kalzium

Dargestellt ist die Dauer bis zum Erreichen des maximalen zytosolischen Kalziumgehalts der Kardiomyozyten, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Wie schon beschrieben, wurde auch der Kalzium-Ausstrom gemessen und die Zeitpunkte bestimmt an denen 50 % bzw. 90 % des Ausgangswertes für das freie zytosolische Kalzium vorliegen. Es ergaben sich für einige Messpunkte signifikant längere Zeiten für die SPRED2 KO Kardiomyozyten. Für die 50 % Messungen konnten folgende stimulationsfrequenzabhängige Werte bestimmt werden: 0,5 Hz (Mittelwerte WT 142 ms zu KO 190 ms bei $p < 0.0001$), 1 Hz (Mittelwerte WT 124 ms zu KO 158 ms bei $p < 0.0001$) und 2 Hz (Mittelwerte WT 103 ms zu KO 124 ms bei $p = 0.0003$). Der Two-way-ANOVA ist ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p < 0.0001$.

Für die 90 % Messungen konnten folgende stimulationsfrequenzabhängige Werte bestimmt werden: 0,5 Hz (Mittelwerte WT 528 ms zu KO 688 ms bei $p < 0.0001$) und 1 Hz (Mittelwerte WT 405 ms zu KO 487 ms bei $p = 0.0001$). Der Two-way-ANOVA ist auch hier ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p < 0.0001$.

Sowohl die 50 %-Werte als auch die 90 %-Werte sind in Abbildung 34 dargestellt.

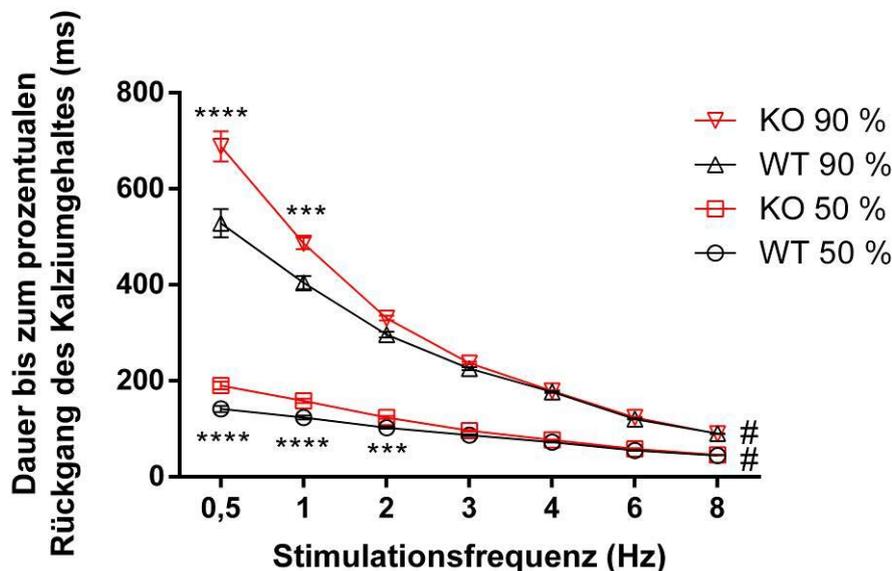


Abbildung 34, Kalziumrückstrom zu 50 % und 90 % des Ausgangswertes

Dargestellt ist die Dauer bis zum Wiedererreichen von 50 % bzw. 90 % des Ausgangskalziumgehaltes in Abhängigkeit des maximalen zytosolischen Kalziumgehaltes der Kardiomyozyten nach Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

3.2.1.3 Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums

Das Sarkoplasmatische Retikulum speichert in der Diastole einen Großteil des in der Systole freigesetzten zytosolischen Kalziums. Um den Gehalt des Kalziums im Sarkoplasmatischen Retikulum abzuschätzen, kann man bei regelhafter Stimulation der Kardiomyozyten (z.B. mit 0,5 Hz), sobald eine gleichmäßige Erregung mit Myozytenantwort stattfindet, eine definierte Stimulationspause machen (hier 10 Sekunden und 30 Sekunden) und jeweils das zytoplasmatische Kalzium vor und nach der Pause mittels der oben beschriebenen Methode mit dem Farbstoff Indo messen. Bei verändertem Kalziumgehalt nach den Pausen, im Vergleich der beiden Genotypen, würde dies für eine differierende Kalziumkonzentration im Sarkoplasmatischen Retikulum sprechen. [100]

Dabei konnte gezeigt werden, dass die SPRED2 KO Zellen in vitro keinen Unterschied im zytoplasmatischen Kalziumgehalt nach den Stimulationspausen aufweisen, siehe Abbildung 35.

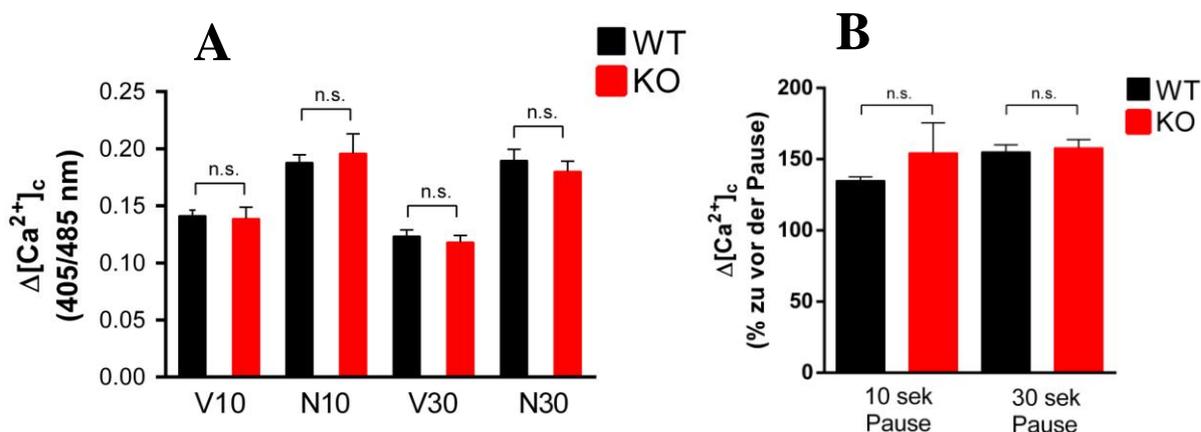


Abbildung 35, A: Zytoplasmatischer Kalziumgehalt vor und nach den Pausen, B: Relatives Verhältnis

Dargestellt ist in **A** der zytoplasmatische Kalziumgehalt der Kardiomyozyten vor und nach den 10 und 30 Sekundenpausen (V10: vor der 10 s Pause, N10: nach der 10 s Pause, V30: vor der 30 s Pause, N30: nach der 30 s Pause). In schwarz sind die WT-Zellen gezeigt ($n(\text{WT } 10 \text{ s}) = 64/3$ und $n(\text{WT } 30 \text{ s}) = 33/3$), in rot die KO-Zellen mit $n(\text{KO } 10 \text{ s}) = 57/3$ und $n(\text{KO } 30 \text{ s}) = 45/3$. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied.

In **B** ist der zytoplasmatische Kalziumgehalt vor und nach den Pausen in Relation gesetzt. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.1.4 Kontraktionsmessungen

Zeitgleich zur Kalzium-Messung mit dem Farbstoff Indo wurde der Sarkomer-Abstand vermessen und so die Kontraktionsfähigkeit und Anspannung der Zelle während des Stimulationszyklus bestimmt. Auch hier wurden maximale und minimale Länge, deren Differenz, sowie die Zeit bis zur maximalen Anspannung und Entspannung zu 50 % und 90 % bestimmt. Die verwendeten Zellzahlen entsprechen denen der Kalziummessungen.

Im nachfolgenden Graphen sind die maximalen und minimalen Sarkomerlängen in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenzen aufgetragen. Dabei ergaben sich für die maximale Kontraktion bei niedrigen Stimulationsfrequenzen signifikante Unterschiede. Die SPRED2 KO Kardiomyozyten schaffen eine signifikant geringere maximale Kontraktion als die Wildtyp-Zellen bei 0,5 Hz (Mittelwerte WT 1,68 μm zu KO 1,71 μm bei $p = 0.0014$) und 1 Hz (Mittelwerte WT 1,69 μm zu KO 1,72 μm bei $p = 0.047$), siehe Abbildung 36. Der Two-way-ANOVA für die Systole war signifikant unterschiedlich mit $p = 0.0004$, ebenfalls wie der Two-way-ANOVA für die Diastole mit $p = 0.0016$.

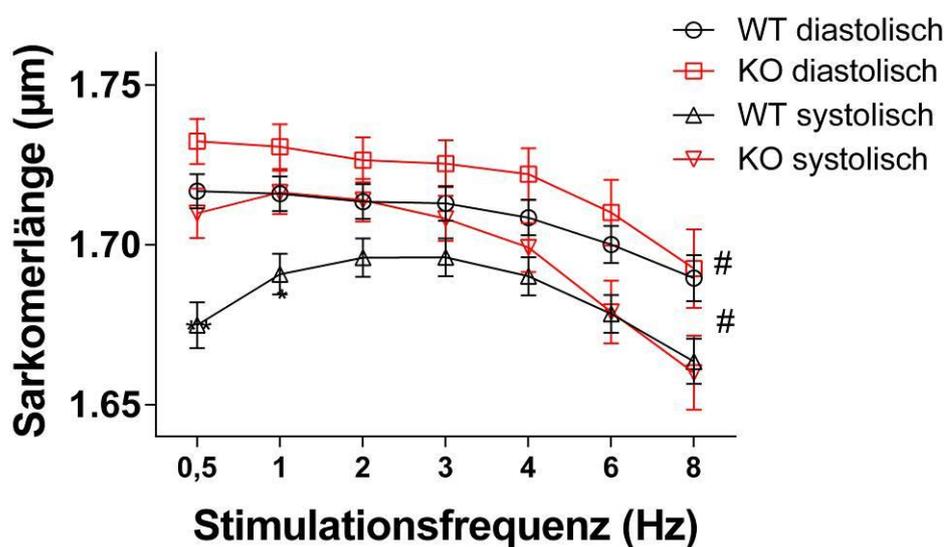


Abbildung 36, Minimale und maximale Sarkomerlänge

Dargestellt ist die minimale und maximale Sarkomerlänge während einer Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Die relative Sarkomerverkürzung wurde berechnet aus der Differenz der maximalen und der minimalen Sarkomerlänge im prozentualen Verhältnis zur maximalen (Ruhe-) Länge. Hierbei ergaben sich signifikant geringere Werte für die SPRED2 KO Kardiomyozyten bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz (Mittelwerte WT 2,45 % zu KO 1,17 % bei $p < 0.0001$) und 1 Hz (Mittelwerte WT 1,48 % zu KO 0,87 % bei $p = 0.0097$), wie in Abbildung 37 gezeigt.

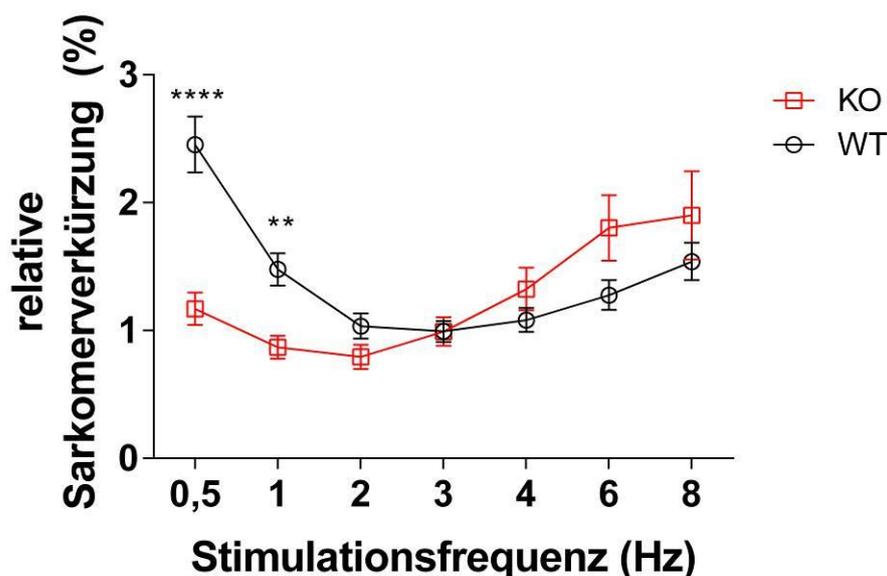


Abbildung 37, Relative Sarkomerverkürzung

Dargestellt sind die Differenzwerte von maximaler und minimaler Sarkomerlänge während einer Stimulation im Verhältnis zur Ruhelänge, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Ebenfalls analog zu den oben genannten Messungen wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Sarkomeranspannung bzw. bis zur minimalen Sarkomerlänge gemessen. Hierbei ergab sich, wie in Abbildung 38 dargestellt, nur eine leicht signifikant verlängerte Zeit der SPRED2 KO Kardiomyozyten für 3 Hz (Mittelwerte WT 53 ms zu KO 64 ms bei $p = 0.047$). Der Two-way-ANOVA war ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p < 0.0086$.

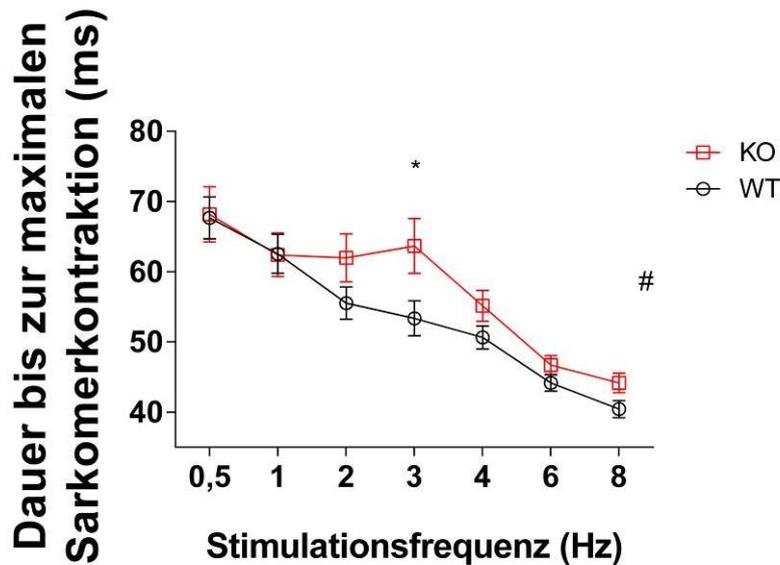


Abbildung 38, Dauer bis zur maximalen Sarkomerkontraktion

Dargestellt ist die Dauer bis zum Erreichen der maximalen Sarkomerkontraktion nach Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

Es wurde nicht nur die Dauer zur maximalen Kontraktion bestimmt, sondern auch die Dauer bis zur anschließenden Entspannung bis 50 % und 90 % des Ausgangswertes. Hierfür ergaben sich jeweils signifikant verlängerte Zeiten für die SPRED2 KO Kardiomyozyten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz für 50 % (Mittelwerte WT 123 ms zu KO 180 ms bei $p < 0.0001$) sowie 1 Hz für 50 % (Mittelwerte WT 109 ms zu KO 146 ms bei $p = 0.003$) und 0,5 Hz für 90 % (Mittelwerte WT 421 ms zu KO 621 ms bei $p < 0.0001$) sowie 1 Hz für 90 % (Mittelwerte WT 374 ms zu KO 450 ms bei $p = 0.014$), siehe Abbildung 39. Der Two-way-ANOVA war ebenfalls signifikant unterschiedlich mit $p = 0.002$ für 50 % Relaxation und $p = 0.0002$ für 90 % Relaxation.

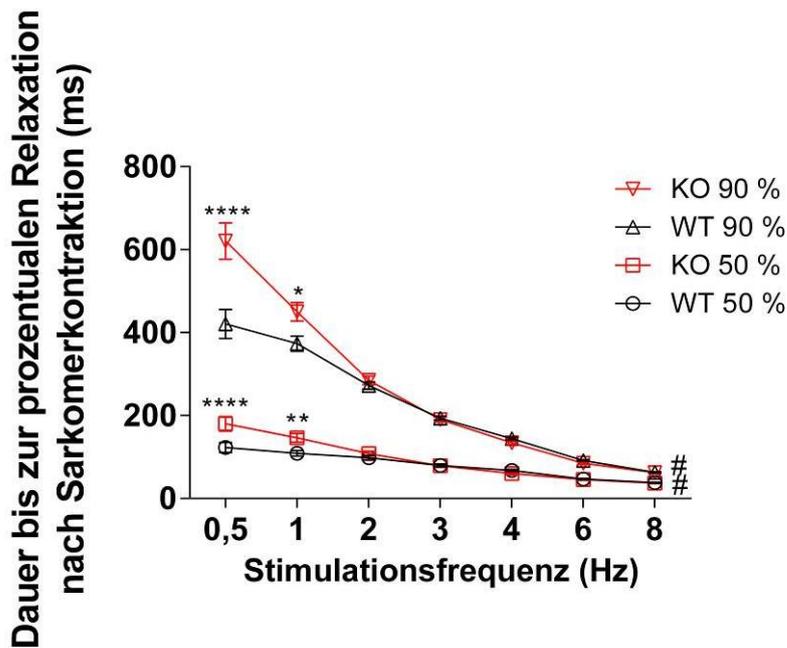


Abbildung 39, Sarkomer Relaxationszeit

Dargestellt ist die Dauer bis zum Wiedererreichen von 50 % bzw. 90 % der Ausgangslänge der Sarkomere nach Stimulation, jeweils einzeln dargestellt für jede Stimulationsfrequenz. In schwarz dargestellt sind die Zellen der WT-Mäuse, in rot die der KO-Mäuse. Die untersuchten Zellzahlen können in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz der Tabelle 8 entnommen werden.

3.2.1.5 Lineare Regression Sarkomerlänge zu Kalziumgehalt

Um zu klären, ob die Sensitivität des Längenverhaltens der Sarkomere auf den intrazellulären Kalziumgehalt unterschiedlich stark ausgeprägt ist, wurde eine lineare Regression der Werte durchgeführt. Hierfür wurde jeder Stimulationsfrequenzwert einzeln nach Sarkomerlänge und relativem Kalziumgehalt zueinander im Graphen aufgetragen und anschließend eine lineare Regression pro Genotyp durchgeführt.

In Graph Pad Prism wurde mit dem internen Algorithmus die Signifikanz des Steigungsunterschieds und des Schnittpunktes zur Y-Achse der jeweiligen Geraden pro Genotyp berechnet. Hierbei zeigte sich eine Signifikanz von $p = 0,2964$ für einen Unterschied der Steigungen und eine Signifikanz von $p = 0,5251$ für die Unterschiede der Y-Achsen Schnittpunkte. Dies entspricht keinem signifikanten Unterschied, sodass die kalziumabhängige Sarkomerverkürzung als identisch angenommen werden kann.

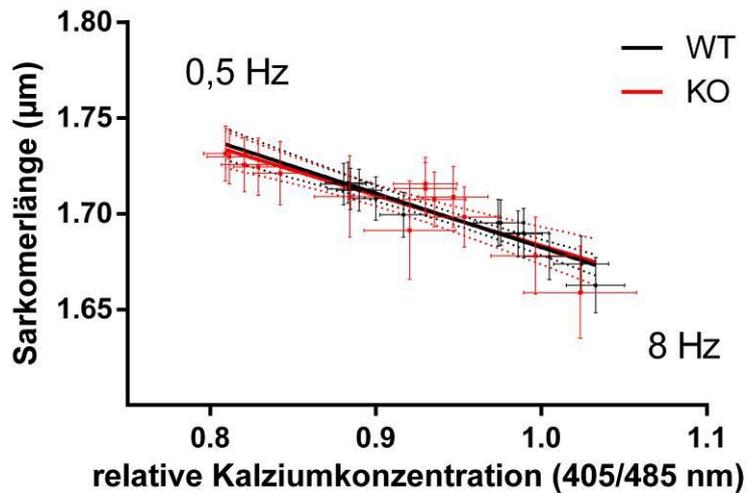


Abbildung 40, Lineare Regression: Sarkomerlänge zu Kalziumgehalt

Dargestellt sind alle Messpunkte der systolischen und diastolischen Kontraktionsmessungen jeweils für alle Stimulationsfrequenzen (0,5 Hz bis 8 Hz) einzeln mit entsprechenden Fehlerbalken (95 % Konfidenzintervall). In schwarz dargestellt sind die Wildtyp-Zellen, in rot die Knockout-Zellen. Die durchgezogene schwarze und rote Linie entsprechen den berechneten Regressionsgeraden und sind ebenfalls jeweils mit den zugehörigen Fehlergeraden (95 % Konfidenzintervall) als gepunktete Linien dargestellt. Die verwendeten Zellzahlen können der Tabelle 8 entnommen werden.

3.2.2 Western Blot und Schnittbildgebung

Zur quantitativen Untersuchung verschiedener Ionenkanäle und zentraler, an der Reizleitung und Reizbildung beteiligter, Proteine wurden murine Herzlysate verwendet und mittels Western Blot untersucht.

Zur Schnittbildgebung wurden Kryoschnitte von murinen Myokardventrikeln verwendet und immunhistochemisch angefärbt.

3.2.2.1 Connexin 43

Das Channel-Protein Connexin 43 zeigte keine signifikanten Unterschiede (Mittelwerte WT 1,12 zu KO 1,56 bei $p = 0.10$), siehe Abbildung 41. Die Tendenz deutet allerdings darauf hin, dass Connexin 43 in KO-Zellen vermehrt exprimiert werden könnte.

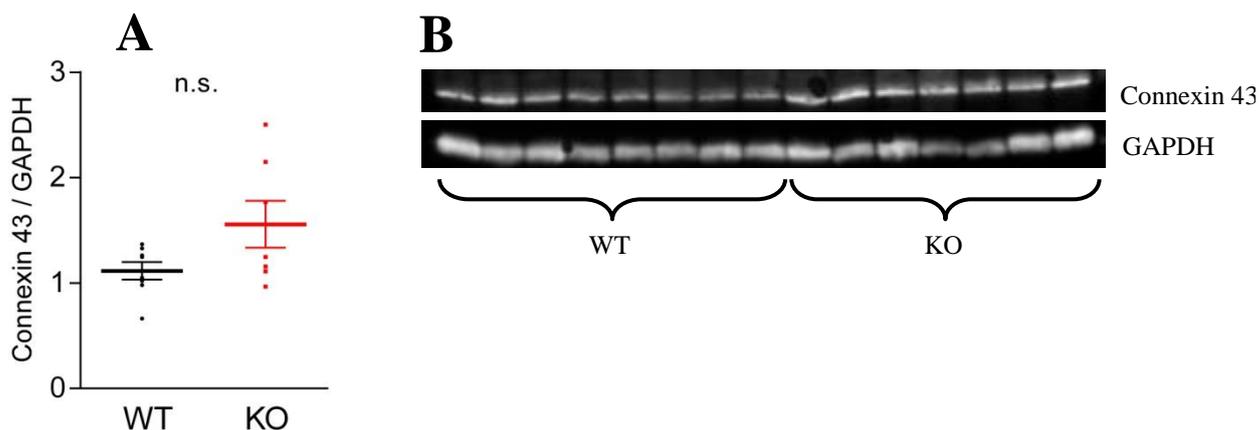


Abbildung 41, A und B, Western Blot Connexin 43

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem Connexin 43 zu GAPDH. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 8 und n (KO) = 7.

3.2.2.2 Kalzium-Kanäle und Modulatoren

Für die Untersuchung des intrazellulären Kalziumhaushaltes von Kardiomyozyten kommen mehrere Ionenkanäle in Frage. In dieser Arbeit wurden folgende Kanäle quantitativ mittels Western Blot untersucht:

Ca_v1.2 (Spannungsabhängiger Kalziumkanal), NCX-1 (Natrium-Kalzium-Austauscher), PMCA4b (Plasma-Membran-Kalzium-ATPase), CaM- und P-CaM-Kinase II (Calcium / Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II), SERCA2a (Sarkoplasmatische- / Endoplasmatische-Retikulum-ATPase), Phospholamban und P-Phospholamban.

Außerdem wurde für den Kalziumkanal Ca_v1.2 exemplarisch eine Schnittbildgebung angefertigt.

Ca_v1.2

Im Western Blot zeigen sich für die Expression des Kalziumkanals Ca_v1.2 signifikante Unterschiede und auch in der Schnittbildgebung lässt sich ein deutlicher Unterschied erkennen. In SPRED2 KO Mäusen wird der Kalziumkanal verringert exprimiert (Mittelwerte WT 1,17 zu KO 1,06 bei $p = 0.0097$), siehe Abbildung 42 und Abbildung 43.

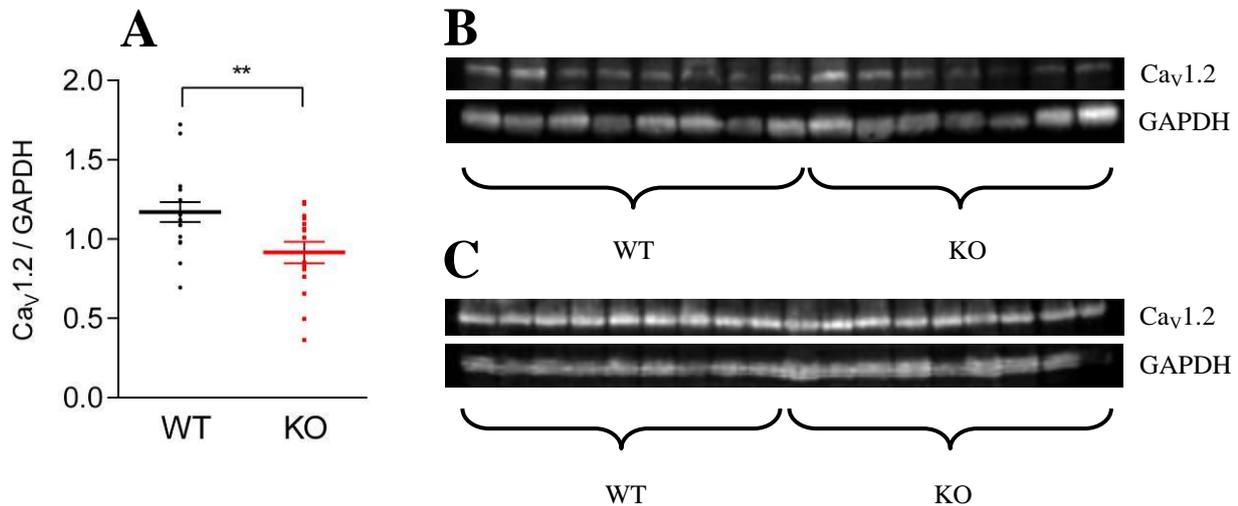


Abbildung 42, A, B und C, Western Blot Ca_v1.2

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem Ca_v1.2 zu GAPDH. Hierbei ergab sich ein signifikant reduzierter Nachweis bei den KO-Mäusen ($p = 0.0097$). In B und C sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen von allen verwendeten Proben dargestellt. Für Abbildung A, sowie B und C zusammen gilt n (WT) = 17 und n (KO) = 16.

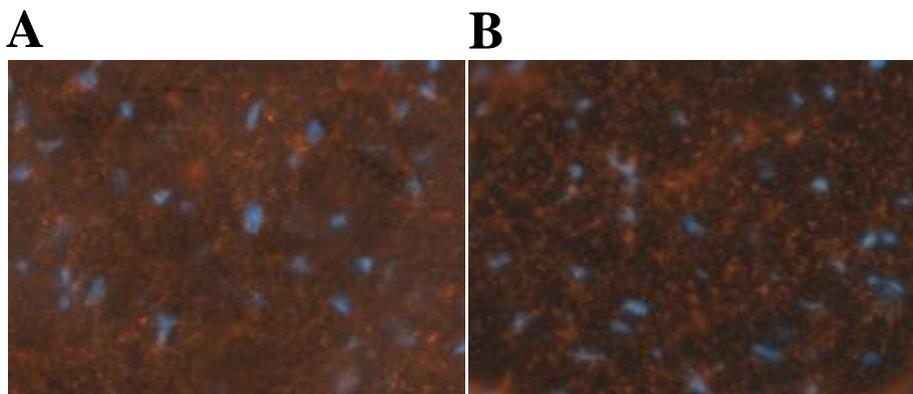


Abbildung 43, A und B, Histoimmunfärbung Ca_v1.2 (A: SPRED2 WT und B: SPRED2 KO)

Dargestellt sind zwei Histoimmunfärbungen zweier exemplarischer Kryoschnitte von Ventrikelmyokard einer WT-Maus (A) und einer KO-Maus (B). In Orange dargestellt ist das Signal des Antikörpers gegen Ca_v1.2 und in Blau das Signal von DAPI, welches die Zellkerne repräsentiert.

NCX-1

Für den Austauscher-Kanal NCX-1 fanden sich im Western Blot keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.20$), was in Abbildung 44 erkennbar ist.

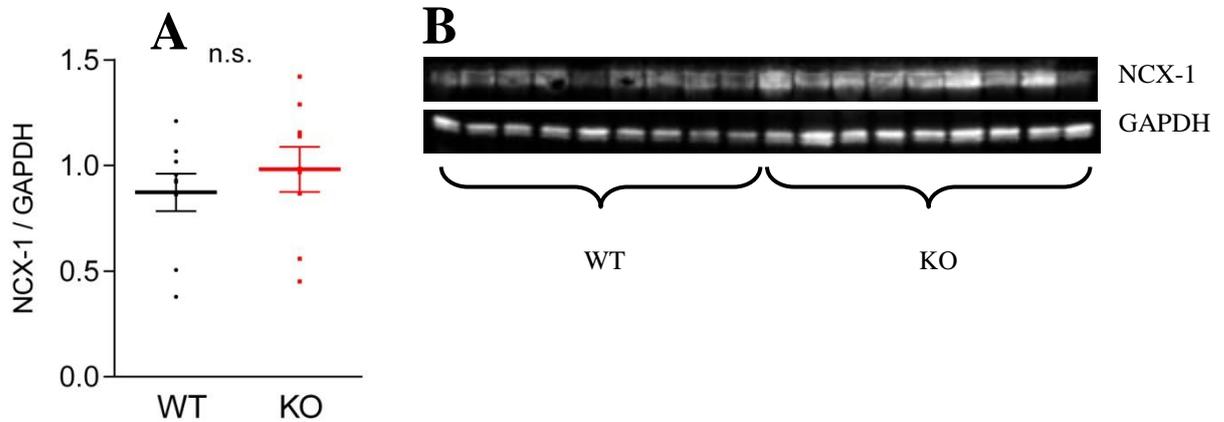


Abbildung 44, A und B, Western Blot NCX-1

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem NCX-1 zu GAPDH. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 9 und n (KO) = 9.

PMCA4b

Für die Plasma-Membran-Kalzium-ATPase (PMCA4b) fanden sich im Western Blot ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.06$), siehe Abbildung 45.

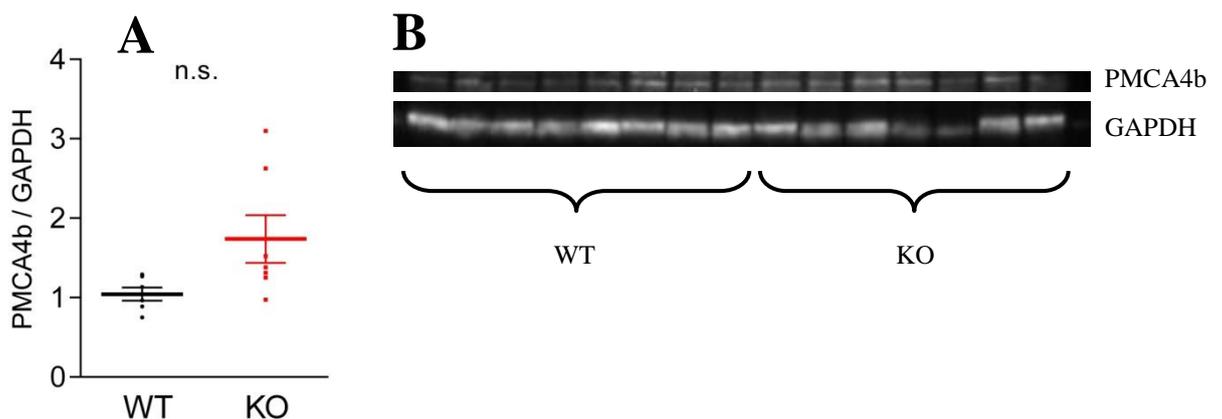


Abbildung 45, A und B, Western Blot PMCA4b

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem PMCA4b zu GAPDH. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 8 und n (KO) = 7.

SERCA2a

Für die Sarkoplasmatische- / Endoplasmatische-Retikulum-ATPase (SERCA2a) konnte für die SPRED2 KO Mäuse gezeigt werden, dass sie diese signifikant vermindert exprimieren (Mittelwerte WT 1,0 zu KO 0,61 bei $p = 0.003$), siehe Abbildung 46.

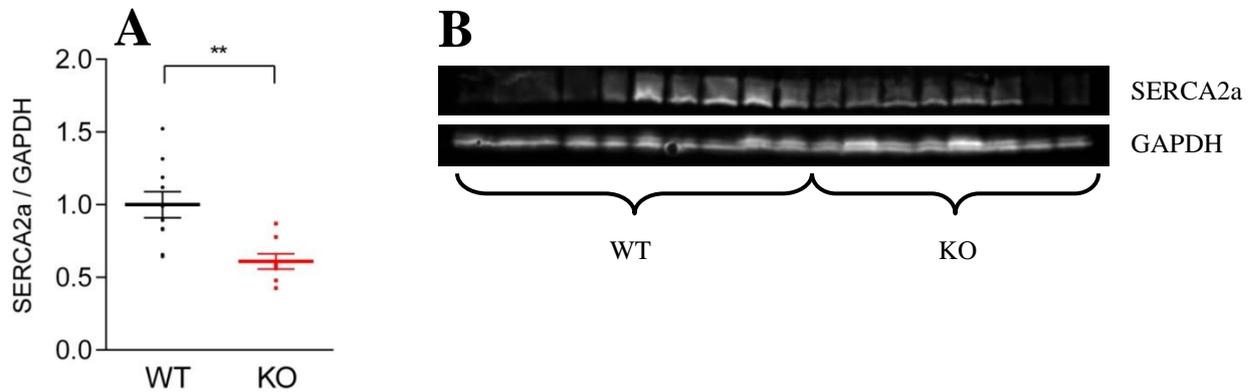


Abbildung 46, A und B, Western Blot SERCA2a zu GAPDH

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem SERCA2a zu GAPDH. Für die KO-Mäuse ergab sich ein signifikant geringeres Signal ($p = 0.003$). In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 10 und n (KO) = 8.

P-Phospholamban und Phospholamban

Die Phosphorylierung von Phospholamban zeigt keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.10$) bei der Untersuchung von Phospholamban und P-Phospholamban mittels Western Blot, wie in Abbildung 47 erkennbar ist.

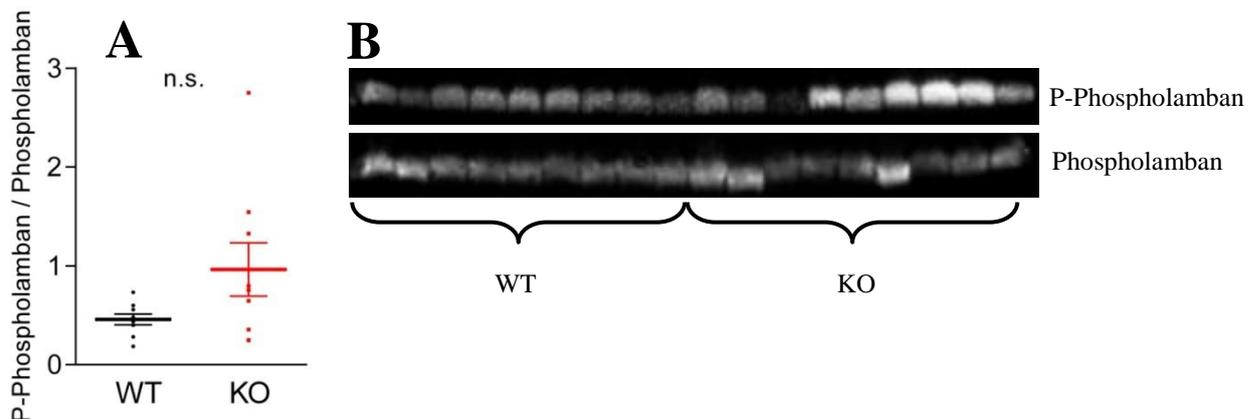


Abbildung 47, Western Blot P-Phospholamban zu Phospholamban

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem P-Phospholamban zu Phospholamban. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 9 und n (KO) = 9.

P-CaM-Kinase II

Die Calcium / Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaM-Kinase II) wurde mittels Western Blot auf ihre Aktivierung durch Phosphorylierung zur P-CaM-Kinase II hin untersucht. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.25$) zwischen SPRED2 WT und SPRED2 KO Maus-Kardiomyozyten, wie in Abbildung 48 gezeigt.

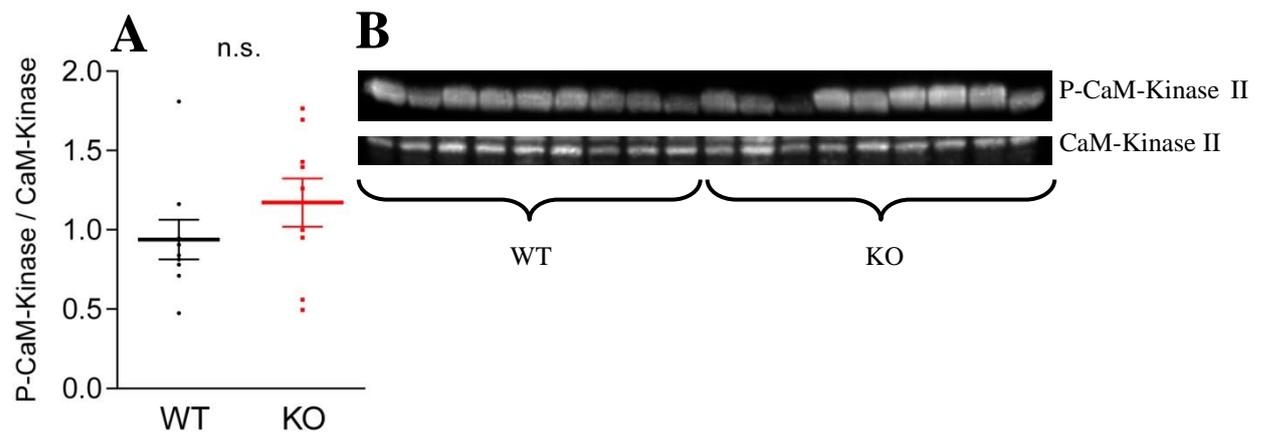


Abbildung 48, A und B, Western Blot (P-)CaM-Kinase II

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkierter P-CaM-Kinase zu CaM-Kinase. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 9 und n (KO) = 9.

3.2.2.3 Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$

Der spannungsabhängige Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ wurde als zentraler Ionenkanal für den Aufstrich im Aktionspotential ebenfalls mittels Western Blot auf seine Expression hin untersucht. Hierbei konnten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.88$) zwischen SPRED2 WT und SPRED2 KO Maus-Kardiomyozyten feststellen lassen, wie in Abbildung 49 gezeigt.

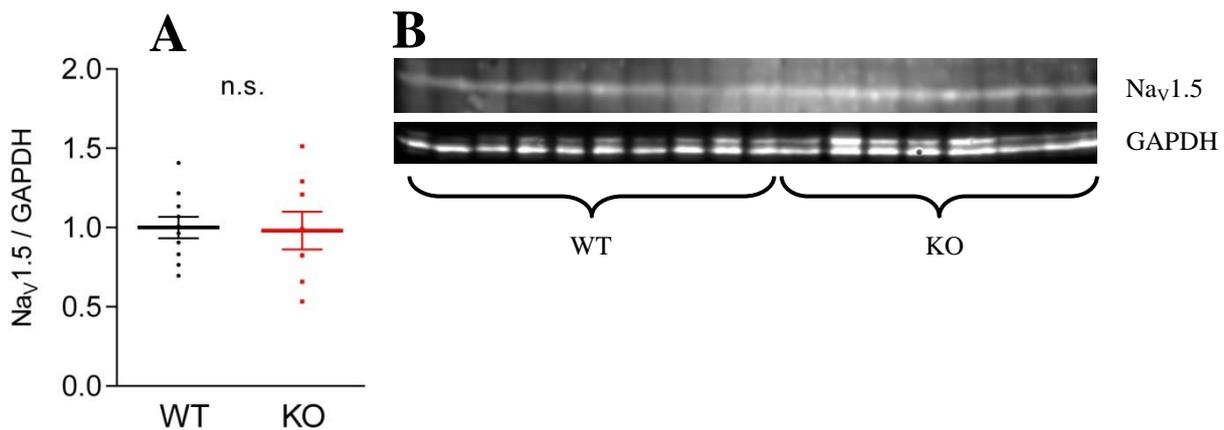


Abbildung 49, A und B, Western Blot $\text{Nav}1.5$

Western Blot der Herzmuskel-Lysate. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem $\text{Nav}1.5$ zu GAPDH. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In B sind die Chemolumineszenz-Aufnahmen dargestellt. Für beide Abbildungen gilt $n(\text{WT}) = 10$ und $n(\text{KO}) = 8$.

3.2.3 Mitochondrien

Zusätzlich zu den Messungen der Kardiomyozyten unter Stimulation wurden auch isolierte Mitochondrien auf ihre Funktion untersucht. Hierzu wurden mehrere Versuchsansätze durchgeführt.

Zuerst wurde die mitochondriale Atmung getrennt mit den Substraten Pyruvat und Fettsäuren aus drei verschiedenen Organsystemen (Herz, Gehirn, Skelettmuskel) untersucht. Hierbei wurden die Fähigkeiten der ATP-Produktion aus Energieträger, Sauerstoff und ADP bestimmt, zusätzlich wurde die Hemmung der ATP-Synthase mittels Oligomycin und zuletzt mit Dinitrophenol die maximale Funktionskapazität unter Entkopplung untersucht.

Im nächsten Schritt wurde dann die Fähigkeit der Mitochondrien zur Kalziumaufnahme untersucht.

Zusätzlich wurde aus der zytosolischen Fraktion das Cytochrom C mittels Western Blot bestimmt, welches als Markerprotein für einen Mitochondriendefekt genutzt wird.

3.2.3.1 Bestimmung der mitochondrialen Atmung

Die Atmungsmessungen der Mitochondrien ergaben in Abbildung 51 A und B leicht signifikante Unterschiede in „state 2“ (Gehirn), „state 3“ (Herz und Gehirn) und „state 4“ (Gehirn) für das Substrat Fettsäure. Weitere Ergebnisse in Abbildung 50 und Abbildung 51 sind nicht signifikant unterschiedlich. [17, 101] Der „state 1“ wird nicht zur Interpretation herangezogen, da er als Ausgangswert für die Bestimmung weiterer Werte dient.

Folgende Werte waren in Abbildung 51 A signifikant unterschiedlich: „State 3“ mit 30 μmol ADP (Mittelwerte WT 35,9 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ zu KO 26,4 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ bei $p = 0,025$).

Folgende Werte waren in Abbildung 51 B signifikant unterschiedlich: „State 2“ (Mittelwerte WT 11,2 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ zu KO 6,7 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ bei $p = 0,014$), „State 3“ mit 30 μmol ADP (Mittelwerte WT 17,5 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ zu KO 11,5 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ bei $p = 0,036$) und „State 4“ (Mittelwerte WT 18,5 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ zu KO 13,3 $\text{nmol O}_2 / \text{mg Protein} * \text{min}$ bei $p = 0,049$).

Trotz signifikant unterschiedlicher Ergebnisse scheint die mitochondriale Funktion normal zu sein. In der folgenden Tabelle 9 sind die in der Auswertung eingeflossenen Versuchstiere nach Anzahl für die einzelnen Versuche aufgelistet:

	Herz	Gehirn	Skelettmuskel
SPRED2 WT	n = 6	n = 6	n = 6
SPRED2 KO	n = 8	n = 9	n = 6

Tabelle 9, Anzahl der Versuche bei mitochondrialen Atmungsmessungen

Dargestellt ist die Anzahl verschiedener Versuchstiere an den Mitochondrien-Messungen für die mitochondriale Atmung und das mitochondriale Membranpotential in Abhängigkeit des Organs und des Genotyps.

Pyruvat / Malat:

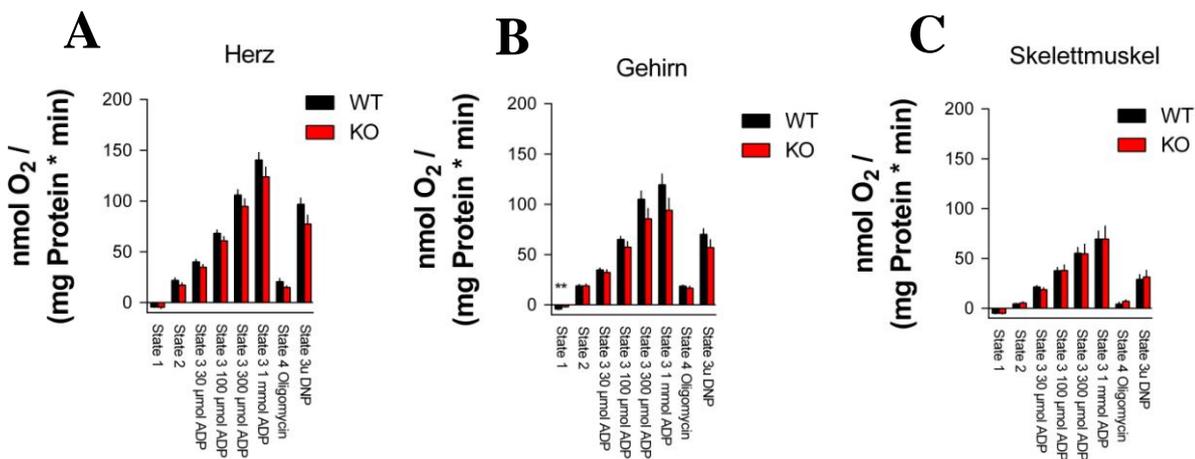


Abbildung 50, A, B und C, mitochondriale Atmungsmessungen mit Pyruvat und Malat als Substrat

Die mitochondriale Atmung wurde mit Pyruvat und Malat als Substrat gemessen, jeweils an drei Organsystemen: Herz (A), Gehirn (B) und Skelettmuskel (C). Es wurden jeweils die Abschnitte „State 1“ bis „State 3u“ bestimmt und grafisch aufgetragen. In schwarz sind die WT-Proben und in rot die KO-Proben dargestellt. Die Anzahl der Proben je Versuchsreihe kann Tabelle 9 entnommen werden.

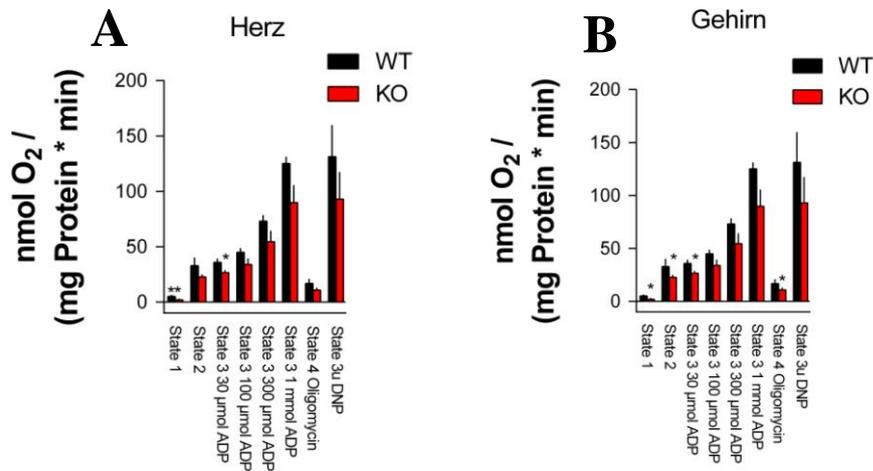
Fettsäure:

Abbildung 51, A und B, mitochondriale Atmungsmessungen mit Fettsäuren als Substrat

Die mitochondriale Atmung wurde mit Fettsäuren als Substrat gemessen, jeweils an drei Organsystemen: Herz (A) und Gehirn (B). Es wurden jeweils die Abschnitte „State 1“ bis „State 3u“ bestimmt und grafisch aufgetragen. In weiß sind die WT-Proben und in schwarz die KO-Proben dargestellt. Die Anzahl der Proben je Versuchsreihe kann Tabelle 9 entnommen werden.

3.2.3.2 Mitochondriales Membranpotential

Da das mitochondriale Membranpotential parallel zu den Messungen der mitochondrialen Atmung durchgeführt wurde, ergab sich eine jeweils identische Versuchsanzahl.

Sowohl bei den Messungen mit Pyruvat und Malat als Substrat, als auch bei den Messungen mit Fettsäuren als Substrat ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Somit kann auch hier davon ausgegangen werden, dass es keine Unterschiede in der Funktionalität der Mitochondrien gibt.

Pyruvat / Malat:

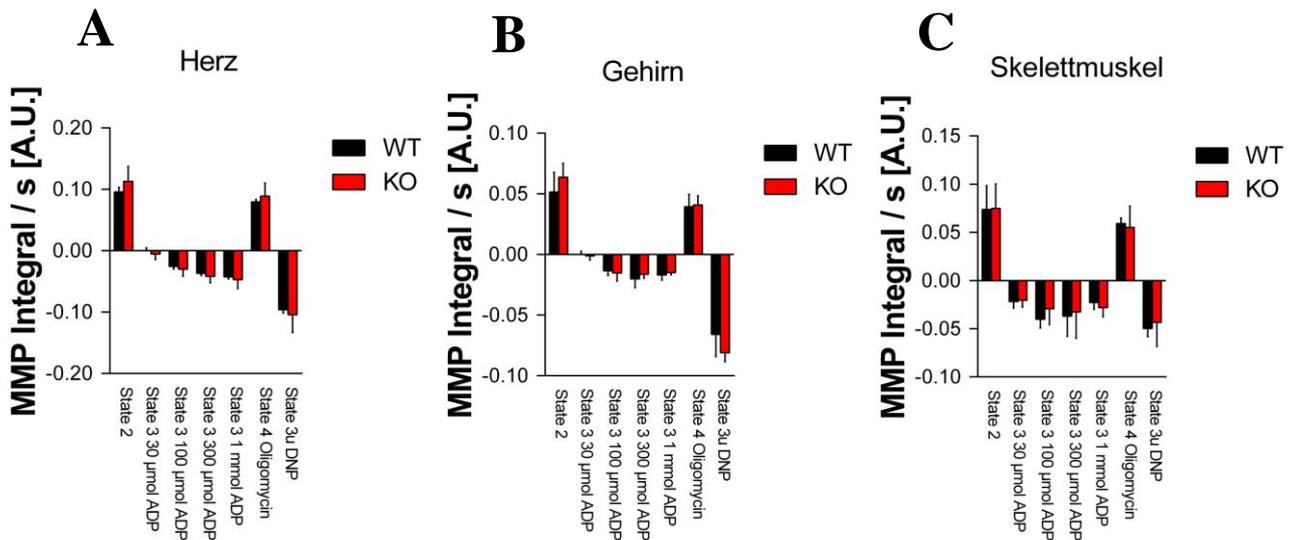


Abbildung 52, A, B und C, Messungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mit Pyruvat und Malat

Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Pyruvat und Malat als Substrat gemessen, jeweils an drei Organsystemen: Herz (A), Gehirn (B) und Skelettmuskel (C). Es wurden jeweils die Abschnitte „State 2“ bis „State 3u“ bestimmt und grafisch aufgetragen. In weiß sind die WT-Proben und in schwarz die KO-Proben dargestellt. Die Anzahl der Proben je Versuchsreihe kann Tabelle 9 entnommen werden. Bei keinem der Messpunkte ergaben sich signifikante Unterschiede.

Fettsäure:

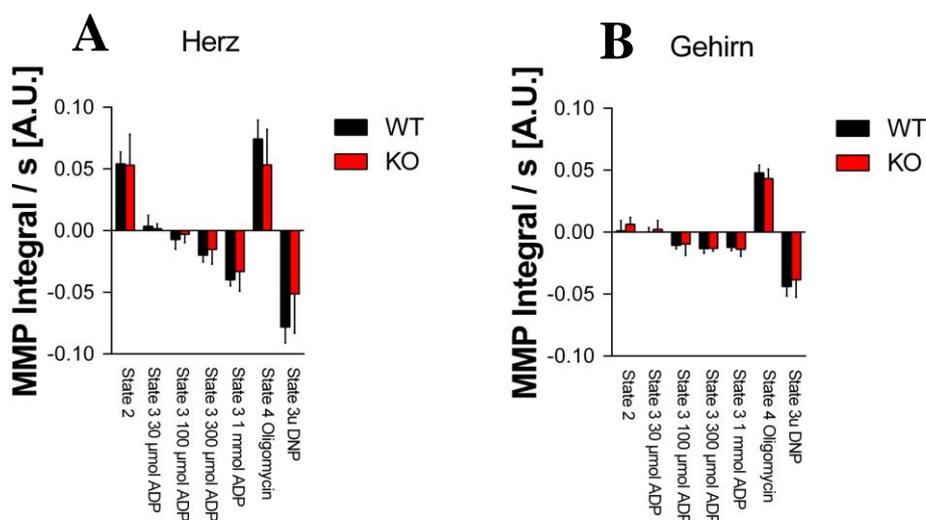


Abbildung 53, A und B, Messungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mit Fettsäuren

Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Fettsäuren als Substrat gemessen, jeweils an zwei Organsystemen: Herz (A) und Gehirn (B). Es wurden jeweils die Abschnitte „State 2“ bis „State 3u“ bestimmt und grafisch aufgetragen. In weiß sind die WT-Proben und in schwarz die KO-Proben dargestellt. Die Anzahl der Proben je Versuchsreihe kann Tabelle 9 entnommen werden.

3.2.3.3 Mitochondriale Kalziumaufnahme

Die Messungen der mitochondrialen Fähigkeit zur Kalziumaufnahme wurden ebenfalls in drei Organsystemen durchgeführt (Herz in Abbildung 54, Gehirn in Abbildung 55 und Skelettmuskel in Abbildung 56). Mithilfe von Cyclosporin A wurde die MPTP im Parallelversuch gehalten und dadurch die optimierte Kalziumaufnahme gemessen.

Für keine der erstellten Kalziumaufnahme-Kurven konnte im Two-way ANOVA Test ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die mitochondriale Kalziumaufnahme sowie die Funktionen der MPTP und der Mitochondrienmembran im Vergleich zu den Wildtyp-Mitochondrien normal sind.

Auch für die Bestimmung der Kalziumaufnahme wurden unterschiedlich viele Versuche je Versuchstyp durchgeführt. Die genaue Anzahl kann hierfür folgender Tabelle 10 entnommen werden:

	Herz	Gehirn	Skelettmuskel
SPRED2 WT	n = 5	n = 6	n = 6
SPRED2 KO	n = 6	n = 5	n = 6

Tabelle 10, Anzahl der Versuche bei mitochondrialer Kalziumaufnahme

Dargestellt ist die Anzahl verschiedener Versuchstiere an den Mitochondrien-Messungen mittels PTP-Assay in Abhängigkeit des Organs und des Genotyps.

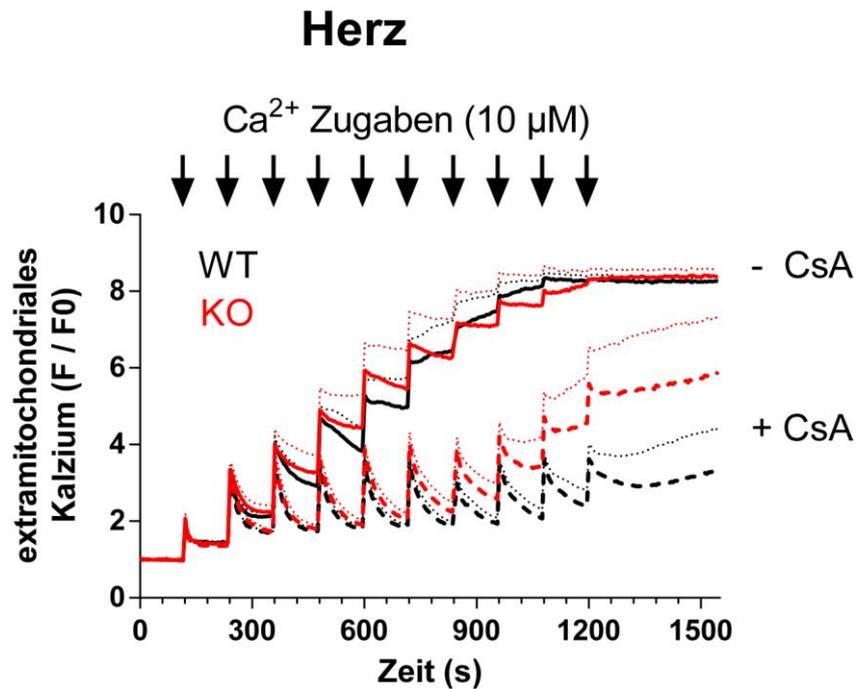


Abbildung 54, MPTP-Assay Herz-Mitochondrien

Beim MPTP-Assay wurde sukzessive Kalzium zu den Proben der isolierten Herz-Mitochondrien hinzugefügt und der extramitochondriale Kalziumgehalt mittels Fluoreszenzfarbstoff Calcium-Green 5N gemessen. Verglichen wurden vier unterschiedliche Gruppen: Jeweils der unterschiedliche Genotyp (SPRED WT und KO) und in An- und Abwesenheit von Cyclosporin A (CsA). Die Probenanzahl kann Tabelle 10 entnommen werden. Beim Two-way ANOVA Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

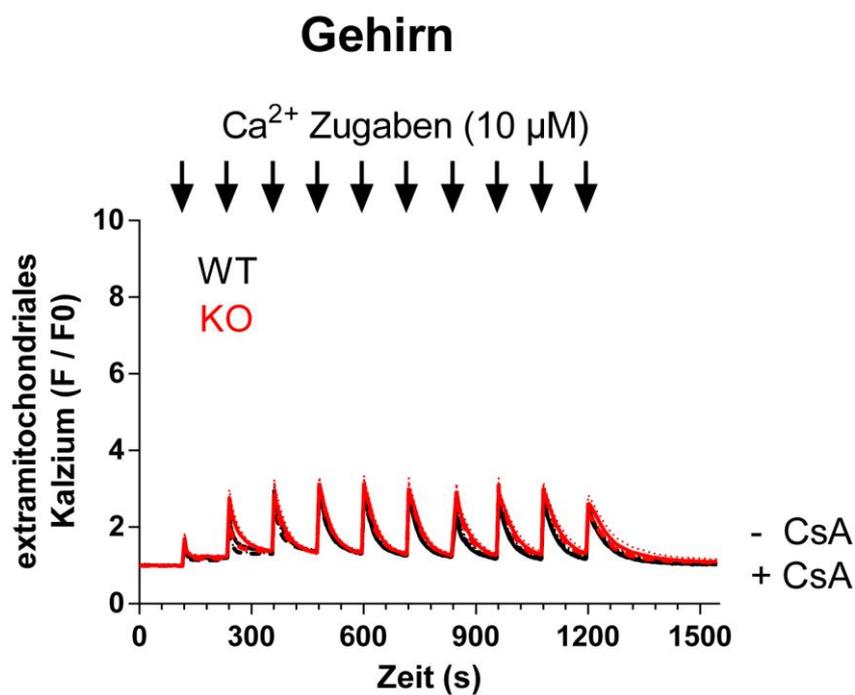


Abbildung 55, MPTP-Assay Gehirn-Mitochondrien

Beim MPTP-Assay wurde sukzessive Kalzium zu den Proben der isolierten Gehirn-Mitochondrien hinzugefügt und der extramitochondriale Kalziumgehalt mittels Fluoreszenzfarbstoff Calcium-Green 5N gemessen. Verglichen wurden vier unterschiedliche Gruppen: Jeweils der unterschiedliche Genotyp (SPRED WT und KO) und in An- und Abwesenheit von Cyclosporin A (CsA). Die Probenanzahl kann Tabelle 10 entnommen werden. Beim Two-way ANOVA Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

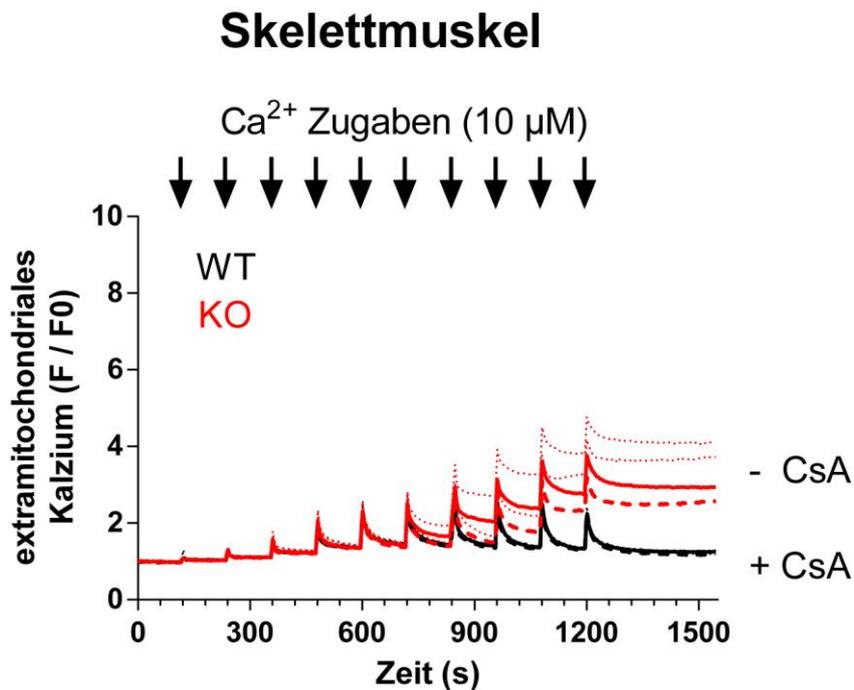


Abbildung 56, MPTP-Assay Skelettmuskel-Mitochondrien

Beim MPTP-Assay wurde sukzessive Kalzium zu den Proben der isolierten Skelettmuskel-Mitochondrien hinzugefügt und der extramitochondriale Kalziumgehalt mittels Fluoreszenzfarbstoff Calcium-Green 5N gemessen. Verglichen wurden vier unterschiedliche Gruppen: Jeweils der unterschiedliche Genotyp (SPRED WT und KO) und in An- und Abwesenheit von Cyclosporin A (CsA). Die Probenanzahl kann Tabelle 10 entnommen werden. Beim Two-way ANOVA Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3.4 Bestimmung des zytosolischen Cytochrom C-Gehalts

Das Cytochrom C wurde aus der zytosolischen Fraktion der Mitochondrien-Isolation der drei Organsysteme (Herz, Gehirn und Skelettmuskel) mittels Western Blot bestimmt und ins Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration gesetzt. Insgesamt wurden ebenso viele Proben verwendet wie bei den Atmungsmessungen in Kapitel 2.2.6.3.

Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an Cytochrom C in der SPRED2 KO-Fraktion der Kardiomyozyten als in den der Fraktion der Wildtyp-Zellen (Mittelwerte WT $3,52 \cdot 10^5$ KO $7,44 \cdot 10^5$ bei $p = 0.002$), siehe Abbildung 57.

Im Zytosol der Mitochondrienisolation von Gehirn- und Skelettmuskelproben konnte kein signifikanter Unterschied im Assay festgestellt werden.

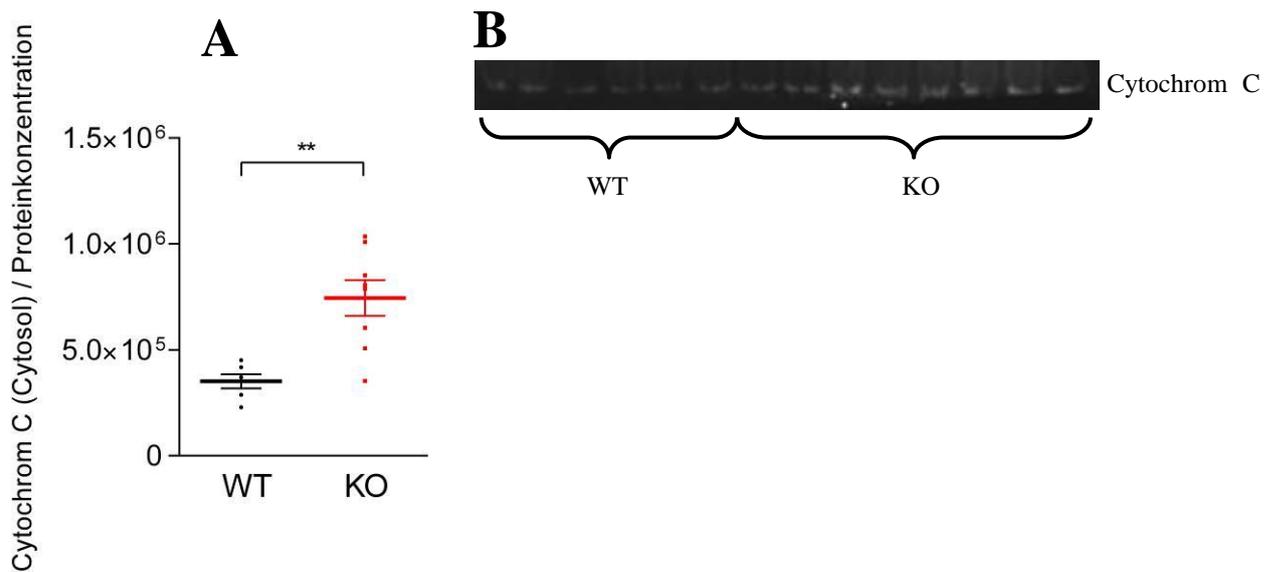


Abbildung 57, A und B, Cytochrom C (Herz)

Western Blot der zytosolischen Fraktion der Mitochondrienuntersuchung. Dargestellt in A ist das Verhältnis von antikörpermarkiertem Cytochrom C zur bestimmten Proteinkonzentration der Proben. Hierbei ergab sich ein deutlich gesteigerter Anteil an Cytochrom C in den Proben der Herz-Zytoplaste ($p = 0.002$). In B ist die Chemolumineszenz-Aufnahme dargestellt. Für beide Abbildungen gilt n (WT) = 6 und n (KO) = 8.

4 Diskussion

SPRED2 defiziente Mäuse zeigen eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalweges und sind mit Ihrem Phänotyp somit ein Vertreter der allgemein bekannten Rasopathien. Rasopathien haben meist Auswirkungen auf den gesamten Organismus, was auch hier im Falle der SPRED2 Defizienz vorliegt.

Durch Ullrich et al. sowie Motta et al. konnten inzwischen weitreichende Erkenntnisse zur Auswirkung im murinen Modell und beim Menschen erlangt und gezeigt werden. [42, 43, 53] Es wurden weitreichende Veränderungen des Phänotyps beschrieben. Dabei gibt es auf den ersten Blick sichtbare Veränderungen, wie eine verminderte Körpergröße und ein vermindertes Körpergewicht, als auch weitere relevante Veränderungen an Gehirn und am Herzen. Weitere Organsysteme sind ebenfalls betroffen und beeinträchtigt.

Auffällig ist vor allem eine verringerte Lebensdauer der Mäuse, mit deutlich geringerer Überlebensrate nach 21 Monaten von 55 % mehr verstorbenen Tieren als bei vergleichbaren Wildtypen. [62] Beim Menschen konnte dies aufgrund der Aktualität der Ergebnisse noch nicht beschrieben werden. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Betracht. Einerseits könnten neurologische Phänomene dafür verantwortlich sein und eine beschriebene Hirnmassenminderung Ausdruck des Neuronenuntergangs sein. [53] Andererseits könnten auch die beschriebenen ventrikulären Arrhythmien im Rahmen eines plötzlichen Herztodes zu einem vorzeitigen Versterben der Tiere führen. [42] Bisher konnte jedoch kein solches Ereignis aufgezeichnet oder bewiesen werden, daher bleibt die genaue Ursache weiterhin unklar. Am ehesten scheint dies multifaktorieller Genese zu sein.

In dieser Arbeit wurde fokussiert der kardiale Phänotyp untersucht und mehrere Methoden zur Untersuchung kombiniert. Dass gehäuft Arrhythmien entstehen, auch ventrikulären Ursprungs, konnte bereits gezeigt werden. Als primäre Ursache hierfür gilt die SPRED2 Defizienz als bewiesen. Wodurch die Arrhythmien letztendlich auf Zellebene ausgelöst werden, konnte bislang nicht geklärt werden. Hierfür wurden in dieser Arbeit Versuche in vivo und in vitro durchgeführt. In vivo konnte mittels hämodynamischer Messung und kardialer Stressinduktion durch eine TAC-Operation die Funktion des ganzen Organs untersucht werden. Parallel wurden Stimulationsmessungen an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt, um durch die Messung des Kalziumgehaltes, des Membranpotentials und der Sarkomerlänge Rückschlüsse auf Kanalaktivitäten ziehen zu können. In Frage kommende Kanäle und modulierende Proteine wurden anschließend mittels Western Blot und Histoimmunfärbung untersucht.

Da Ullrich et al. zusätzlich vermeintlich degradierte Mitochondrien mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahme zwischen Myofibrillen beschrieben hatten, wurde die Möglichkeit einer primär ursächlichen mitochondrialen Schädigung in Betracht gezogen. [42] Hierfür wurden ebenfalls spezielle Untersuchungen angestellt.

4.1 In vivo

Untersucht wurden SPRED2 WT und KO Mäuse vor und nach einer TAC-Operation auf Flussgeschwindigkeiten der großen Gefäße und mittels hämodynamischer Untersuchung. Zusammenfassend ergaben sich hierbei keine direkten Hinweise auf eine Herzinsuffizienz.

Bei der Berechnung des Druckgradienten über die Aortenstenose mittels vereinfachter Bernoulli-Gleichung zeigte sich kein erhöhter Widerstand, sodass man hier sagen kann, dass junge Tiere noch keinen Hinweis auf einen erhöhten Druckgradienten zeigen (siehe Abbildung 23).

Im zweiten Schritt wurden bei alten Tieren ohne TAC-Operation und bei jungen Tieren mit bzw. nach TAC-Operation hämodynamische Untersuchungen mittels Linksherzkatheter durchgeführt. Hierbei konnte bei den über einem Jahr alten und unbehandelten KO-Tieren ein erhöhtes Schlagvolumen identifiziert werden. Dieses war verknüpft mit einem verringerten enddiastolischen Ventrikeldruck (siehe Abbildung 24). Bei den TAC-operierten jungen KO-Tieren gab es keinen Unterschied beim Schlagvolumen, allerdings war der enddiastolische Ventrikeldruck ebenfalls leicht vermindert (siehe Abbildung 25). Der entscheidende Parameter für einen funktionierenden Kreislauf ist das Herz-Zeit-Volumen, angepasst an den aktuellen Bedarf. Dieses bestimmt sich aus Herzfrequenz und Schlagvolumen. Das Schlagvolumen wiederum wird beeinflusst durch die Kontraktilität des Myokards und der Vor- und Nachlast. Der gemessene enddiastolische linke Ventrikeldruck stellt am ehesten die Vorlast des linken Systems dar, welche zur Füllung des linken Ventrikels beiträgt. Da das enddiastolische Ventrikelvolumen allerdings unverändert bzw. tendenziell nur leicht reduziert zu sein scheint, dürfte diese Reduktion keinen signifikanten Einfluss auf das Herz-Zeit-Volumen ausüben. [102] Ganz im Gegenteil müssen aufgrund der bei älteren Tieren gemessenen höheren Schlagvolumina andere Mechanismen greifen, um eine gesteigerte Kontraktilität hervorzurufen. Dabei kommen unter anderem eine veränderte Sarkomerlänge oder ein erhöhtes intrazelluläres Kalzium in Frage. [102, 103]

Der aortale Blutdruck war wie von Ullrich et al. bei unbehandelten Tieren schon beschrieben, ebenfalls bei den TAC-operierten Tieren ohne signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 26). [42] Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine mögliche Herzinsuffizienz noch keine messbaren Auswirkungen auf den Kreislauf ausübt und somit noch kompensiert zu sein scheint.

4.2 In vitro

In Vitro wurden sowohl die Zellstimulationsmessungen, als auch die folgenden Proteinanalysen, sowie die Untersuchung der Mitochondrien durchgeführt.

4.2.1 Kardiomyozyten Stimulationsmessungen

Das gemessene Ruhemembranpotential zeigte bei der relativen Messung mittels des Farbstoffes di-8-ANEPPS keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 27). Die Methode Aktionspotentiale mittels Fluoreszenzfarbstoffen zu beschreiben ist limitiert, durch die Reaktivität des Farbstoffes und seiner Verträglichkeit. Zusammengenommen lassen sich mit dieser Methode nur starke Änderungen detektieren, für feinere Änderungen ist die Patch-Clamp Technik der Goldstandard.

Die ebenfalls gemessenen Membranpotentiale während des durchgeführten Stimulationsprotokolls zeigten tendenziell eine größere Amplitude bei den KO-Zellen als bei den WT-Zellen (siehe Abbildung 28). Im Gegensatz dazu wurden die maximalen Membranpotentiale nach einer Stimulation schneller erreicht (siehe Abbildung 29). Somit kann man in Summe sagen, dass die Anstiegsgeschwindigkeit des Membranpotentials bei den KO-Zellen deutlich größer ist als bei den WT-Zellen. Im Vergleich konnte von Anne Marie Augustin schon gezeigt werden, dass die Amplitude des QRS-Komplexes im EKG vergrößert erscheint, was sich mit diesen Erkenntnissen zu decken scheint. [62]

In den EKG-Analysen von Anne Marie Augustin konnte ebenfalls eine QRS-Verbreiterung gezeigt werden. [62] Die erhöhte Anstiegsgeschwindigkeit des Membranpotentials steht somit im Widerspruch zu der im EKG gefundenen QRS-Verbreiterung und muss durch andere Phänomene erklärt werden. Zum Beispiel könnten hierfür der Kalziumeinstrom, eine Verringe-

rung der Reizleitungsgeschwindigkeit zwischen den Kardiomyozyten als Pendant zum humanen Schenkelbock oder auch direkte Einflüsse auf den Bereich der Gap-Junctions als Erklärung dienen. [104, 105]

Die Repolarisation ist hingegen signifikant verlängert. So benötigten die KO-Zellen vor allem bei mittleren Stimulationsfrequenzen von 1 Hz und 2 Hz bis zur Repolarisation von 90 % deutlich mehr Zeit als die WT-Zellen (siehe Abbildung 30). Auch im EKG konnte dies von Anne Marie Augustin als QT-Zeit Verlängerung gemessen werden. [62] In Summe spricht eine Verlängerung der Repolarisation für eine erhöhte Vulnerabilität von Arrhythmien. [106]

Bei den Messungen mit Hilfe des Farbstoffes Indo wurde der zytoplasmatische Kalziumgehalt während den Stimulationen gemessen. Hierbei fiel auf, dass tendenziell bei allen Stimulationsfrequenzen, signifikant vor allem bei den langsameren Stimulationsfrequenzen, deutlich niedrigere intrazelluläre Kalziumspiegel vorhanden waren (siehe Abbildung 31). Der Kalziumshift während jedes Zyklus war erhöht, vor allem signifikant bei 4 Hz Stimulationsfrequenz, ebenso war auch die Dauer bis zum maximalen intrazellulären Kalziumgehalt tendenziell erhöht, hier vor allem signifikant bei 2 Hz (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Für diesen Umstand kommen zwei Möglichkeiten in Frage, entweder wird das Kalzium während der Diastole vermehrt nach Extrazellulär geschleust oder in das sarkoplasmatische Retikulum. Um dies zu differenzieren könnte man nun mit Hilfe von Koffein den RyR2 öffnen, was die Funktion der SERCA blockiert, und somit nach Erreichen eines „Steady State“ den isolierten Einfluss des Kalziumstroms von und nach extrazellulär betrachten. [107]

Der Kalziumrückstrom war ebenfalls, wie die Repolarisation des Membranpotentials, deutlich und hoch signifikant verlängert, insbesondere bei langsamen Stimulationsfrequenzen (siehe Abbildung 34).

Zur Klärung einer möglicherweise veränderten Kalziumausschüttung nach intrazellulär wurde durch eine Stimulationspause und anschließendem Vergleich der Kalziumfreisetzung zwischen vor und nach der Pause die Konzentration des im Sarkoplasmatischen Retikulum gespeicherten Kalziums abgeschätzt (siehe Abbildung 35). Hierbei ergaben sich wie erwartet keine Differenzen, sodass man davon ausgehen kann, dass es keine Unterschiede in der gespeicherten Kalziummenge im Sarkoplasmatischen Retikulum gibt. Für die Abschätzung der gesamten Kalziummenge von ruhenden Kardiomyozyten ist diese Methode jedoch unpassend. [100]

Parallel zu den Kalziummessungen wurde die Länge der Sarkomere gemessen. Hierbei zeigte sich ein erwartetes Verhalten bei reduziertem Kalziumgehalt. Die Sarkomere waren sowohl im systolischen als auch im diastolischen Zustand etwas länger (siehe Abbildung 36). Im Zusammenhang mit dem verringerten Kalziumgehalt könnte dies der Ausdruck der geringeren Aktivierung durch das Kalzium und somit dessen Folge sein. [108]

Trotz eines größeren Kalziumshifts pro Zyklus konnte nur eine geringere prozentuale Kontraktilität der Sarkomere gemessen werden (siehe Abbildung 37). Im Bereich von 0,5 Hz und 1 Hz ist dies signifikant ersichtlich. Bei den höheren Frequenzen nehmen die Fehlerbalken aufgrund der sinkenden Zellzahl deutlich zu, weshalb hier der Beweis nicht erbracht werden konnte. Um den Zusammenhang zwischen Kontraktion und zytoplasmatischem Kalziumgehalt zu verifizieren, wurde eine lineare Regression erstellt (siehe Abbildung 40). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Abhängigkeit der Sarkomerlänge vom zytoplasmatischen Kalziumgehalt, was der Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden und der Y-Achsen Auslenkung entspricht. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Sensibilität auf eine Kontraktionsreaktion der Sarkomere auf das Vorhandensein von freiem Kalzium bei den KO-Zellen nicht unterschiedlich zur Sensibilität der WT-Zellen ist.

Die Dauer bis zur maximalen Sarkomerkontraktion war vor allem bei 3 Hz Stimulationsfrequenz signifikant verlängert, aber auch bei den anderen Frequenzen tendenziell eher länger als kürzer (siehe Abbildung 38). Die Verlangsamung der Kontraktionsgeschwindigkeit steht ebenfalls im Zusammenhang mit dem verlängerten Kalziumeinstrom und könnte ebenfalls eine Folge dessen sein.

Die Relaxation der Sarkomere verhält sich ebenfalls wie der intrazelluläre Kalziumgehalt und das Membranpotential und ist vor allem bei niedrigeren Stimulationsfrequenzen signifikant zeitlich verlängert (siehe Abbildung 39). Einen wesentlichen Störfaktor im Rahmen der Kontraktionsmessungen anhand der Sarkomerlänge spielt sicherlich auch der verwendete Farbstoff Indo. Dieser wirkt als Indikator für den Gehalt des zytoplasmatischen Kalziums und muss hierfür mit den freien Kalziumionen wechselwirken. Hierdurch wird die Kontraktilität der Myokardzellen beeinflusst, wie groß dieser Störfaktor allerdings ausfällt, ist unbekannt. Auch hier würde sich eine nun anschließende Messung mittels Patch Clamp anbieten.

4.2.2 Proteinanalysen

Zur Spezifizierung der gemessenen Unterschiede im Membranpotential und im Kalziumhaushalt wurden einige in Frage kommende Kanäle mittels Western Blot und im Falle des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals auch mittels Histoimmunfärbung untersucht.

Exemplarisch für die notwendige Reizweiterleitung von Zelle zu Zelle wurde das Protein „Connexin 43“ untersucht. Dieses Protein stellt den grundlegenden Baustein für die Ausbildung von Gap-Junctions dar und ist im Ventrikelmyokard neben weiteren Connexinen das führende Protein. [16] Ohne eine ausreichende Anzahl an Gap-Junctions wäre eine Reizweiterleitung nicht oder nur bedingt möglich. Wie in Abbildung 41 erkennbar, konnten hier keine Unterschiede entdeckt werden, sodass die Verbreiterung des QRS-Komplexes auf andere Ursachen zurückgeführt werden muss.

Zur genaueren Untersuchung des Kalziumhaushaltes der Kardiomyozyten wurden die wichtigsten kardialen Kanäle ausgewählt. Hierzu zählen $\text{Ca}_v1.2$, NCX-1, PMCA4b, SERCA2a, die Phosphorylierung von Phospholamban und die Phosphorylierung der CaM-Kinase II. [109-112]

In Herzmuskelzellen kommt ein großer Anteil des Kalziums über den $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal von extrazellulär nach einer Membrandepolarisation in das Zytosol. Ein weiterer Kalziumanteil kommt über den Ryanodin-Rezeptor 2 aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Ausgeschleust wird das Kalzium anschließend wieder über die SERCA in das Sarkoplasmatische Retikulum und mit Hilfe der PMCA und des NCX nach extrazellulär. Dabei wird die SERCA durch phosphoryliertes Phospholamban aktiviert, außerdem wird auch die PMCA durch die phosphorylierte CaM-Kinase II aktiviert, welche allerdings noch weitere Funktionen erfüllt. Zusätzlich findet eine indirekte Regulation durch den Ca^{2+} / Calmodulin - Komplex statt. [6, 111, 112]

Die Kanäle NCX und PMCA, sowie die Aktivatoren P-Phospholamban und P- CaM-Kinase II zeigten im Western Blot keine Unterschiede zwischen den Proben von WT- und KO-Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass NCX und PMCA normal exprimiert und weder SERCA noch PMCA über die genannten Signalwege unterschiedlich aktiviert werden.

Die Kanäle $\text{Ca}_v1.2$ und SERCA waren hingegen signifikant reduziert in den KO-Ventrikellysaten enthalten. Bei der Histoimmunfärbung des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals lässt sich auch eine deutliche Signalmindering bei der KO-Probe erkennen.

Die reduzierte Expression von $Ca_v1.2$ und SERCA steht im Einklang mit den Zellstimulationsmessungen und könnte sowohl die Ursache für die Verlängerung des Kalziumeinstroms, als auch des Kalziumausstroms sein.

Bei Mäusen wird über 90 % des Kalziums mit Hilfe der SERCA zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum transportiert und weniger als 10 % über den NCX nach extrazellulär. Beim Menschen ist das Verhältnis etwas mehr zugunsten des NCX, hier übernimmt die SERCA etwa 60-75 % und etwa 25-40 % werden vom NCX transportiert. [113] Dies könnte ein Grund dafür sein, dass eine veränderte Expression der SERCA bei Mäusen einen deutlicheren kardialen Phänotyp erzeugt als beim Menschen. [53]

Um auch den auffälligen Membranpotential-Anstieg bei den Zellstimulationsmessungen und die Verbreiterung des QRS-Komplexes, sowie die bekannte QT-Zeit-Verlängerung zu untersuchen, wurde der spannungsabhängige Natriumkanal $Na_v1.5$ ausgewählt und ebenfalls mittels Western Blot untersucht. Bei Minderfunktion oder Blockade des $Na_v1.5$ sind unter anderem im Rahmen eines Long-QT-Syndroms schwerwiegende Herzrhythmusstörungen bekannt. [114, 115] Hier zeigten sich bei der Expression allerdings keine Unterschiede zwischen WT- und KO-Proben.

4.2.3 Untersuchungen der Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden mittels Dichtegradienten isoliert und unter Zugabe von zwei verschiedenen Substratgemischen (Kohlenhydrate bzw. Fettsäuren) auf ihre Funktion in Atmung und mitochondrialem Membranpotential hin untersucht. Es zeigten sich hierbei keine relevanten Unterschiede (siehe Abbildung 50, Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 53).

Auch bei der Durchführung des MPTP-Assays ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Mitochondrien und Knockout-Mitochondrien (siehe Abbildung 54, Abbildung 55 und Abbildung 56). Dadurch kann man davon ausgehen, dass die isolierten Mitochondrien keinem erhöhten Stress, wie z.B. radikalen Sauerstoffspezies, ausgesetzt waren.

Da die untersuchten Mitochondrien durch einen Dichtegradienten extrahiert wurden, kann eine Selektion nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte dazu geführt haben, dass ausschließlich normal dichte und „gesunde“ Mitochondrien isoliert wurden. Eventuell veränderte oder

beschädigte Mitochondrien mit verschiedener Dichte könnten so schon vor der Messung einem Selektionsprozess unterworfen gewesen sein, weshalb die Interpretation der Ergebnisse nicht abschließend sein sollte. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, dass ein Defekt der Mitochondrien nur im gesamtzellulären Kontext zu Auffälligkeiten führt.

4.2.4 Cytochrom C

Cytochrom C gilt als starker Apoptose-Induktor und befindet sich in gesunden Zellen an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran. Bei starkem zellulärem Stress, wenn Mitochondrien verstärkt beschädigt werden und die äußere Mitochondrienmembran undicht wird, kann Cytochrom C ins Zytosol gelangen und die Apoptose in Gang setzen. [116, 117] In den zytosolischen Fraktionen der Knockout-Herzlysate ließ sich verstärkt Cytochrom C nachweisen (siehe Abbildung 57).

Die Ursache hierfür könnte vielfältig sein. Als Möglichkeiten kommen unter anderem ein verstärkter Auf- und Abbau der Mitochondrien, zellulärer Stress oder Probleme beim Abbau im Rahmen der Autophagie in Frage, sodass das Cytochrom C im Zytoplasma nachweisbar ist. Der Nachweis von Cytochrom C kann durch diese Ursachen prinzipiell auch bei gesunden Mitochondrien erbracht werden, da nicht die Mitochondrien selbst der Auslöser sind, sondern der zelluläre Kontext eine Zerstörung gesunder Mitochondrien hervorruft. [118]

Durch Ullrich et al. konnte außerdem bereits eine deutlich verstärkte Apoptoserate der SPRED2 KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu den Wildtypen gezeigt werden.

4.3 Gesamtbewertung

Die globalen Auswirkungen des SPRED2-Knockouts scheinen deutliche Auswirkungen auf die physiologische Arbeitsweise der Kardiomyozyten zu haben. Im Zentrum der Auswirkungen auf Zellebene scheint der Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten zu stehen. Der zytoplasmatische Kalziumgehalt ist bei etwas größerem Kalziumshift trotzdem allgemein niedriger als bei den vergleichbaren Wildtypzellen. Gleichzeitig sind die Sarkomere länger und auch das Aktionspotential zeigt entsprechende Auswirkungen. So ist zwar schneller das maximale Ak-

tionspotential erreicht, dafür dauert die Repolarisation ebenfalls deutlich länger. Bei der hämodynamischen Messung fiel ein erhöhtes Schlagvolumen auf.

Setzt man die zellulären und hämodynamischen Auswirkungen nun in den Kontext der verstärkten Apoptoseneigung mit erhöhter Fibrosierung und der von Ullrich et al. bewiesenen myokardialen Hypertrophie, könnten diese als Anpassungsvorgang an eine beginnende Herzinsuffizienz verstanden werden. Diese ist im Allgemeinen gekennzeichnet durch eine reduzierte Pumpleistung des Herzens, entweder mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion oder erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion bei gleichzeitigem Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion oder linksventrikulären Hypertrophie. [119, 120] Da hier weder Schlagvolumen oder Blutdruck erniedrigt, noch der enddiastolische Ventrikeldruck erhöht sind, könnte hier definitionsgemäß eine kompensierte linksventrikuläre Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion vorliegen. Dafür sprechen unter anderem die Hypertrophie und der erhöhte Kalziumshift.

Die Herzrhythmusstörungen lassen sich damit noch nicht ausreichend erklären. Die verzögerten Kalziumflüsse während der Stimulationszyklen sind am ehesten verantwortlich für die Verzögerung der Depolarisation und in Folge dessen auch der Repolarisation, so konnten Bergenholm et al. an blockierten $Ca_v1.2$ -Kanälen eine signifikante QRS-Verbreiterung nachweisen. [121] Die beobachteten Effekte des verzögerten Aufbaus des Membranpotentials nach Depolarisation, sowie die QRS-Verbreiterung und der QT-Zeit-Verlängerung könnten demnach die Folge des verlangsamten Kalziumstoffwechsels sein.

Eine verlängerte QT-Zeit ist für sich gesehen ein großer Risikofaktor für spontan entstehende Herzrhythmusstörungen. [106] Ebenso gilt eine Fibrosierung des Myokards als unabhängiger Risikofaktor für spontan entstehende Arrhythmien. [122, 123]

Der genaue molekulare Zusammenhang zwischen der defekten SPRED2 Expression, der Überaktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalweges und der wohl dadurch primär einsetzenden apoptotischen und fibrosierenden Umbauvorgänge ist bislang noch nicht sicher geklärt. Nach den von Ullrich et al. publizierten Ergebnissen könnte hierfür eine gestörte Autophagie ursächlich verantwortlich sein.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte nur ein kleiner Ausschnitt der kardialen Auswirkungen der SPRED2 Defizienz im Mausmodell untersucht werden. Dabei konnten einige messtechnische Probleme entdeckt werden. Im Folgenden werden hierfür mögliche Lösungsansätze diskutiert und erläutert:

Der Einfluss der Myokardfibrosierung konnte bislang auf der Ebene der *in vivo* Messung noch nicht gezeigt werden. Um diese Frage näher zu untersuchen bietet sich ein sogenannter „Occlusion Test“ an. Hierbei wird während einer hämodynamischen Messung die Vena cava inferior für einen bestimmten Zeitraum abgeklemmt und parallel eine invasive Druck-Volumen-Kurve erstellt und aufgezeichnet. Nach dem man die Vena cava inferior wieder freigibt erholt sich das System und es stellen sich nach und nach wieder die Ausgangsparameter ein. Je nach Verlauf dieser Erholungsreaktion können Rückschlüsse auf die funktionelle Dehnbarkeit des linken Ventrikels und damit auf den Einfluss der Fibrosierung gezogen werden. [34]

Die prinzipiellen und beschriebenen Messprobleme mit der Fluoreszenz-Anlage IonOptix durch Störeffekte, wie dem Einfluss der Farbstoffe auf die Messergebnisse, sollten mittels Patch Clamp Messung verifiziert werden. Damit lässt sich ebenfalls ein besseres Ergebnis zum Ruhemembranpotential erzeugen und ermöglicht einen größeren Spielraum für einzelne Kanalblockaden. Zum Beispiel käme hier die Entkopplung der SERCA-Funktion durch die Blockade des RyR2 mit Koffein in Frage, um beispielsweise den Einfluss des Kalziumausstroms nach extrazellulär zu verifizieren. [124]

Desweiteren könnte man die Kraft der Kontraktion der Kardiomyozyten direkt und ohne die Zugabe von Farbstoffen mittels Myograph messen, um daraus im Vergleich zur reinen Längenmessung ein physiologischeres Ergebnis zu erhalten.

Ebenfalls lässt sich die Expression der relevanten Ionenkanäle auch noch auf der RNA-Ebene mittels reverse transcriptase PCR untersuchen. Dies könnte eine sinnvolle Ergänzung der beschriebenen Messungen darstellen.

Bei den funktionellen Messungen der Mitochondrien ergab sich das potentielle Problem möglicherweise nur die unbeschädigten Mitochondrien isoliert und untersucht zu haben. Um dies zu quantifizieren benötigt man eine unselektierte Untersuchung der Mitochondrienfunktion im ganzen Zellkompartiment. Hierfür bietet sich zum Beispiel eine indirekte Untersuchung durch

die Messung von NAD^+ und FAD oder die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels Dichlorofluorescein- oder Dihydroethidium-Assay an. [125] Eine Möglichkeit zur direkten Untersuchung von Mitochondrien im zellulären Kontext wäre die Messung der mitochondrialen Atmung in skinned fibres. [126]

Nichts desto trotz wurden in dieser Arbeit ausschließlich kardiale Veränderungen untersucht. Ziel sollte als nächstes sein, die vermeintliche Ursache, nämlich die myokardiale Fibrosierung, aufzuklären. Hierbei scheint vor allem die gestörte Autophagie ursächlich zu sein. Wo hierbei genau eine Fehlregulation stattfindet, ist bislang unklar, man kennt inzwischen nur einen Teil der resultierenden Auswirkungen. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs gibt es inzwischen auch Lösungsansätze, zum Beispiel mittels transgenen Mäusen, welche EGFP und RFP gekoppelte LC3 Proteine exprimieren und man durch säurebedingte Deaktivierung der EGFP-Fluoreszenz in fusionierten Autophagolysosomen die Aktivität und intrazelluläre Lokalisation der Autophagie untersuchen kann.

Erst vor Kurzem wurden die allerersten Daten zum humanen SPRED2-Knockout publiziert. Hier war bis dato nicht bekannt, dass es einen solchen Gendefekt beim Menschen gibt bzw. geben kann und die Individuen auch lebensfähig sind. Daher sind hier in naher Zukunft noch sehr viele neue Erkenntnisse zu erwarten, insbesondere zur heterozygoten Ausprägung. Hierfür gibt es stand heute noch keine publizierten Daten. Da zumindest der SPRED2-Knockout auch beim Menschen eine starke phänotypische Ausprägung hervorruft, wird die Relevanz einer forcierten Forschung, auch für eventuelle Therapiemöglichkeiten, deutlich.

5 Zusammenfassung

Einflüsse einer SPRED2 Defizienz auf den systemischen Phänotyp bei Mäusen sind schon einige Zeit bekannt. Durch den Wegfall der inhibitorischen Funktion des SPRED2 Proteins wird der Signalweg über Ras/ERK-MAPK verstärkt aktiviert. Ein genereller Minderwuchs, veränderte hormonelle Regelkreise, neurologische Auffälligkeiten, eine deutlich verringerte Lebenserwartung, sowie kardiale und weitere Veränderungen sind die Folge. Schwerwiegende Veränderungen am murinen Herzen sind hierbei vor allem eine myokardiale Fibrosierung, eine myokardiale Hypertrophie und Herzrhythmusstörungen. Von Ullrich et al. wurde bereits ein adaptierter Score zur Klassifizierung der Häufigkeit und der Schweregrade von murinen Herzrhythmusstörungen entwickelt und im Vergleich von WT und KO eindeutig die für beide Parameter eine verstärkte Neigung zu häufigeren und schweren Rhythmusstörungen der KO Tiere gezeigt. Bei EKG Analysen der SPRED2 KO Tiere konnten von Ullrich et al. erste Vermutungen für die physiologische Ursache erstellt werden.

Das hier dargestellte Folgeprojekt hatte zum Ziel, die Ursache der Herzrhythmusstörungen auf Zell- und Proteinebene herauszufinden und zu versuchen, Rückschlüsse auf die primäre Ursache und des verantwortlichen Signalwegs des SPRED2 Knockouts zu ziehen.

Bei hämodynamischen Untersuchungen wurde eine gute Kompensationsfähigkeit junger Mäuse auf die Aortenkonstriktion mittels TAC-Operation bei den KO-Tieren beobachtet. So waren im Verlauf weder der Blutdruck noch der berechnete Druckgradient auffällig. Invasive Messungen im linken Ventrikel ergaben ein leicht gesteigertes Schlagvolumen.

Im Rahmen der Fluoreszenzmessungen der stimulierten Kardiomyozyten konnten bei den KO-Zellen deutliche Veränderungen im Bereich des Membranpotentials, des Kalziumhaushalts, als auch im Verhalten der Sarkomerverkürzung, beobachtet werden. So wurden beim Membranpotential eine schnellere und höhere amplitudige Depolarisation, sowie eine verzögerte Repolarisation beobachtet. Beim Kalziumhaushalt waren alle Phasen des Einstroms- und des Ausstroms verzögert, der Kalziumshift war leicht erhöht. Im Zusammenhang hierzu verhielt sich die Sarkomerkontraktion passend, diese war ebenfalls in allen Phasen verlängert und im Rahmen einer linearen Regression sowohl bei den KO-Zellen als auch den WT-Zellen gleich im Ansprechen auf einen veränderten intrazellulären Kalziumgehalt. Gleichzeitig konnte eine verringerte Expression von SERCA und $Ca_v1.2$ auf Proteinebene gefunden werden. Dies könnte Ursache für die verlängerten Zeiten bei Membrandepolarisation und Kalzium Ein- und Ausstrom sein und in Folge dessen auch verantwortlich für die bekannte QRS-

Verbreiterung sowie die QT-Zeit-Verlängerung sein. Sowohl eine QRS-Verbreiterung als auch eine QT-Zeit-Verlängerung sind bekannt für ihr arrhythmogenes Potential.

Die Untersuchung der Mitochondrien ergab keinen Unterschied zwischen SPRED2 WT und KO Proben. Lediglich in der zytosolischen Fraktion ließ sich bei den KO-Proben vermehrt Cytochrom-C nachweisen, dessen Ursache bis dato ungeklärt ist.

Im Zusammenhang betrachtet könnte die Folge einer SPRED2-Defizienz, über die schon beschriebene Störung der Autophagie, verantwortlich für eine Fibrosierung des Myokards sein. Die beschriebene Fibrosierung wiederum ist verantwortlich für eine gestörte Reizleitung und Adaptionsvorgänge auf Zellebene. Ob weitere Mechanismen als eine gestörte Autophagie als Ursache herangezogen werden können, muss nun weiter untersucht werden. Die gefundenen Veränderungen des Aktionspotentials und des Kalziumhaushalts sind wahrscheinlich für die im EKG gefundenen Herzrhythmusstörungen verantwortlich und erklären eine kürzere Lebensdauer der SPRED2 KO Mäuse zumindest teilweise.

Die erst vor Kurzem erstmalig publizierten Ergebnisse eines SPRED2 Knockouts beim Menschen lassen auf viele neue Erkenntnisse hoffen und möglicherweise auch neue Therapiemöglichkeiten entwickeln.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Zentrale kardiale Ionenkanäle zur Erregungsleitung und elektromechanischen Kopplung.....	11
Abbildung 2, Beispiel EKG des Menschen in der Ableitung Einthoven II.....	14
Abbildung 3, Beispiel EKG der Maus in der Ableitung Einthoven II	14
Abbildung 4, Signalkaskade des Raf / Ras / MAP-Kinase Signalweges und Bindungsstellen von SPRED2	19
Abbildung 5, Operations- und Untersuchungsaufbau für die TAC-OPs und hämodynamischen Messungen	24
Abbildung 6, Operationsfeld während der TAC-Operation	25
Abbildung 7, Dopplermessung der Aorta vor der TAC-Operation	26
Abbildung 8, Emissionsverhalten von di-8-ANEPPS	31
Abbildung 9, Ausschnitt einer fokussierten Kardiomyozyte im Aufnahme Fenster.....	32
Abbildung 10, Anordnung der Filter und Spiegel in der IonOptix für die Messungen mit di-8-ANEPPS.....	33
Abbildung 11, Aufbau der IonOptix Apparatur	36
Abbildung 12, Messkammer der IonOptix Apparatur.....	37
Abbildung 13, Indo Emissionsspektrum bei freier Ca^{2+} Konzentration von 0 (blau) und 39 $\mu\text{mol} / \text{l}$ (orange)	38
Abbildung 14, Anordnung der Filter und Spiegel in der IonOptix für die Messungen mit Indo	39
Abbildung 15, Citratzyklus und die Substrate Pyruvat und Malat	53
Abbildung 16, Die β -Oxidation	54
Abbildung 17, A und B, Exemplarische Darstellung des Sauerstoffgehaltes und des mitochondrialen Membranpotentials in der Messkammer während des Versuchs mit Pyruvat und Malat als Substrate	57
Abbildung 18, A und B, Exemplarische Darstellung des Sauerstoffgehaltes und des mitochondrialen Membranpotentials in der Messkammer während des Versuchs mit Fettsäuren als Substrat	58
Abbildung 19, Emissionsverhalten des Farbstoffes Calcium-Green 5N.....	59
Abbildung 20, Dopplermessung vor der TAC-OP	64
Abbildung 21, Dopplermessung unmittelbar nach der TAC-OP	65
Abbildung 22, Dopplermessung drei Wochen nach der TAC-OP	65
Abbildung 23, Druckgradient über der Aorta / Aortenstenose mittels vereinfachter Bernoulli-Gleichung	66
Abbildung 24, A und B, Hämodynamikmessung unbehandelter SPRED2 WT und SPRED2 KO Tiere.....	67
Abbildung 25, A und B, Hämodynamikmessung TAC-operierter SPRED2 WT und SPRED2 KO Tiere.....	69

Abbildung 26, Aortaler Blutdruck nach TAC-Operation	70
Abbildung 27, Relatives Ruhemembranpotential	71
Abbildung 28, Relative Amplitude des Aktionspotentials.....	72
Abbildung 29, Dauer bis zum maximalen Aktionspotential.....	73
Abbildung 30, Zeit bis zu 50 % und 90 % Membranrepolarisation	74
Abbildung 31, Relativer Kalziumgehalt	76
Abbildung 32, Kalziumshift: Differenz von maximalem zu minimalem Kalziumgehalt pro Zyklus	77
Abbildung 33, Dauer bis zum maximalen freien zytosolischen Kalzium.....	77
Abbildung 34, Kalziumrückstrom zu 50 % und 90 % des Ausgangswertes	78
Abbildung 35, A: Zytoplasmatischer Kalziumgehalt vor und nach den Pausen, B: Relatives Verhältnis	79
Abbildung 36, Minimale und maximale Sarkomerlänge	80
Abbildung 37, Relative Sarkomerverkürzung	81
Abbildung 38, Dauer bis zur maximalen Sarkomerkontraktion	82
Abbildung 39, Sarkomer Relaxationszeit	83
Abbildung 40, Lineare Regression: Sarkomerlänge zu Kalziumgehalt.....	84
Abbildung 41, A und B, Western Blot Connexin 43	85
Abbildung 42, A, B und C, Western Blot Ca _v 1.2.....	86
Abbildung 43, A und B, Histoimmunfärbung Ca _v 1.2 (A: SPRED2 WT und B: SPRED2 KO).....	86
Abbildung 44, A und B, Western Blot NCX-1	87
Abbildung 45, A und B, WesternBlot PMCA4b	87
Abbildung 46, A und B, Western Blot SERCA2a zu GAPDH.....	88
Abbildung 47, Western Blot P-Phospholamban zu Phospholamban.....	88
Abbildung 48, A und B, Western Blot (P-)CaM-Kinase II	89
Abbildung 49, A und B, Western Blot Na _v 1.5	90
Abbildung 50, A, B und C, mitochondriale Atmungsmessungen mit Pyruvat und Malat als Substrat	92
Abbildung 51, A und B, mitochondriale Atmungsmessungen mit Fettsäuren als Substrat.....	93
Abbildung 52, A, B und C, Messungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mit Pyruvat und Malat.....	94
Abbildung 53, A und B, Messungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mit Fettsäuren	94
Abbildung 54, MPTP-Assay Herz-Mitochondrien	96
Abbildung 55, MPTP-Assay Gehirn-Mitochondrien.....	97
Abbildung 56, MPTP-Assay Skelettmuskel-Mitochondrien	98
Abbildung 57, A und B, Cytochrom C (Herz).....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, Western Blot Gelzusammensetzung [72]	44
Tabelle 2, Proteinabhängige Gelparameter	45
Tabelle 3, Western Blot Antikörper Schemata	46
Tabelle 4, Liste der WT Mäuse für Zellisolation und Mitochondrienanalyse.....	61
Tabelle 5, Liste der KO Mäuse für Zellisolation und Mitochondrienanalyse	61
Tabelle 6, Anzahl der Tiere bei Flussgeschwindigkeitsmessungen in den Carotiden und der Aorta	63
Tabelle 7, Ausgewertete Zellzahlen bei Aktionspotentialmessungen mit di-8-ANEPPS	72
Tabelle 8, Ausgewertete Zellzahlen bei Kalziummessungen mit dem Farbstoff Indo.....	75
Tabelle 9, Anzahl der Versuche bei mitochondrialen Atmungsmessungen	92
Tabelle 10, Anzahl der Versuche bei mitochondrialer Kalziumaufnahme	95

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Zelsius
A.	Arteria
A.U.	Arbitrary unit, Willkürliche Einheit
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrio-Ventrikular
BDM	2,3- Butandion-Mnoxim
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaM-Kinase	Ca ²⁺ - / Calmodulin-abhängige Proteinkinase
Cav1.2	Spannungsabhängiger Kalziumkanal 1.2
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym-A
CsA	Cyclosporin A
Cyclo A	Cyclosporin A
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DE	Deutschland
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
di-8-ANEPPS	Farbstoff: Di-8-butyl-amino-naphthyl-ethylene-pyridinium-propyl-sulfonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ERK	Extrazellulär signalregulierende Kinase

EVH	Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Reduzierte Form von FAD
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm, X-fache-Erdbeschleunigung bei Zentrifugation
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wassermolekül
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hz	Hertz (1 / s)
I.E.	Internationale Einheit
IFM	Isoleucin-Phenylalanin-Methionin
K ⁺	Kalium-Ion
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
l	Liter
li	Links
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
max.	Maximal
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol

mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
min.	Minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
n	Anzahl der Stichproben
n.s.	Nicht signifikant
Na ⁺	Natrium-Ion
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH+H ⁺	Reduzierte Form von NAD ⁺
Na _v 1.5	Spannungsabhängiger Natriumkanal 1.5
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Austauscher
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
P	Phosphatrest / Druck
P-CaM-Kinase	Phosphorylierte Ca ²⁺ - / Calmodulin-abhängige Proteinkinase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Pondus hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	Anorganisches Phosphat
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
PLB	Phospholamban

PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
Prim	Primär
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
re	Rechts
ROS	Reactive oxygen species
RTK	Rezeptorthyrosinkinase
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
s	Sekunde
S	(Herz-) Schläge
s.c.	Subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekundär
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOS	Son of sevenless
SPRED	Sprouty-related protein with EVH1 domain
TAC	Transverse aortic constriction
TEMED	1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan
TF	Transkriptionsfaktor
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
U	Umdrehungen
v	Geschwindigkeit
V	Volt
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Pufferverzeichnis

„Lämmli“-Puffer	2,5 ml 10 % SDS; 4,0 ml; Glycerol 2 ml; Bromphenolblau 1 mg; eingestellt auf pH 6,8 mit 0,5 mol TrisHCl
Atmungspuffer	137 mM KCl; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; 2,5 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O, 20 mM HEPES; 0,5 mM EGTA; pH 7,2 (eingestellt mit 1 M KOH)
BM-Puffer	140 mM KCl; 20 mM HEPES; 5 mM MgCl ₂ ; 5 µM EGTA; pH 7.0 mit KOH/HCl
HM-Puffer (Homogenisierungspuffer)	BM-Puffer mit 1 mM ATP und 1 % BSA
IS-Puffer (Isolationspuffer)	225 mM Mannitol; 75 mM Saccharose; 2 mM HEPES; 1 mM EGTA; pH 7,4 eingestellt mit TrisBase oder TrisHCl
Liberasepuffer	20,0 ml Perfusionspuffer; 40 µl Trypsin; 25,2 µl 10 mM CaCl ₂ ; 2 mg Liberase (0,08 mg / ml)
MSS-Puffer	225 mM Mannitol; 75 mM Saccharose; 2 mM HEPES; pH 7,4 eingestellt mit TrisBase oder TrisHCl
PBS-Puffer	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; eingestellt mit HCl auf pH 7,4
PBS-T 0,05 %-Puffer	wie PBS-Puffer plus 0,5 % Tween
Perfusionspuffer	113 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,6 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,2 mM MgSO ₄ -7H ₂ O; 0,032 mM Phenolrot; 12 mM NaHCO ₃ ; 10 mM KHCO ₃ ; 10 mM HEPES; 10 mM BDM; 30 mM Taurin; 5,5 mM D-(+)-Glukose; 1 mM CaCl ₂ ; eingestellt auf pH 7,4 mit HCl/NaOH
PTP-Puffer	120 mM KCl; 70 mM Mannitol; 25 mM Saccharose; 20 mM HEPES; 5 mM KH ₂ PO ₄ ; 20 µM EGTA; eingestellt auf pH 7,5 mit TrisBase

RIPA-Puffer	150 mM NaCl; 1 % IGEPAL CA-630; 0,5 % Natriumdesoxycho- lat; 50 mM Tris; pH 8.0
SDS-Puffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
Stoppuffer 1	9,0 ml Perfusionspuffer; 1 ml FCS-Lösung; 12,5 µl 10 mM CaCl ₂
Stoppuffer 2	28,5 ml Perfusionspuffer; 1,5 ml FCS-Lösung; 37,5 µl 10 mM CaCl ₂
Stripping-Puffer (50 ml):	0,75 g Glycin; 50 mg SDS; 0,5 ml Tween20; einstellen auf pH 2,2 mit HCl; mit ddH ₂ O auffüllen auf 50 ml
Tyrode	130 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM HEPES; 2 mM Pyruvat; 0,3 mM Ascorbinsäure; 1 mM CaCl ₂ ; 10 mM Glukose; pH eingestellt auf 7,5 mit HCL/NaOH bei Raumtem- peratur

Chemikalienverzeichnis

Acrylamid mix 30 % (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosindiphosphat (ADP)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BDM (2,3- Butandion-Mnoxim)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Buprenovet (Buprenorphinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calcium-Green 5N (C3737)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ciclosporin A	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-(+)-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland
ddH ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Milli-Q-Anlage
α -Dinitrophenol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EGTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCCP	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glutamat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL CA-630	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Immersionsöl	Leica, Wetzlar, Deutschland
Indo-1, AM *UltraPure Grade*	AAT Bioquest, Sunnyvale, Kalifornien, USA
Isofluran CP	CP-Pharma Handelsgesell- schaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kohlenstoffdioxid	Linde GmbH, Pullach, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Carnitin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Laminin	Roche, Basel, Schweiz
Liberase	Roche, Basel, Schweiz
Malat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milcheiweiß, Casein-Natrium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oleoyl-L-Carnitin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Palmitoyl-CoA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pancuroniumbromid	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor "PhosSTOP"	Roche, Basel, Schweiz
Polyvinylidenfluorid (PVDF), Westran Clear Signal	Whatmann Inc., Maidstone, United Kingdom
Protease-Inhibitor "complete"	Roche, Basel, Schweiz
Protein A HRP-Konjugiert	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, NA9120
Protein G HRP-Konjugiert	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 18-161
Protein-Ladder, PageRuler™ Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Proteinase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pyruvat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reagenz A	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Reagenz B	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA

Rimadyl®	Zoetis, Berlin, Deutschland
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sauerstoff	Linde GmbH, Pullach, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Linde GmbH, Pullach, Deutschland
Subtilisin A	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Taurin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TMRM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TrisBase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TrisHCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt,

	Deutschland
Tween 20 Biochemica	AppliChem PanReac ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
WesternBright™ Chemolumineszenz Substrat Sirius	Biozym Stientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ziegenserum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Antikörperverzeichnis

Antikörperzielstruktur /Name	Hersteller, Spezies, Typ, Artikelnummer
Alexa Fluor 594, donkey anti sheep IgG, Sekundärantikörper, A11016	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Beta-Tubulin	Cell Signaling, rabbit, polyklonal, #2146
CaM-Kinase II	Badrilla, rabbit, polyklonal, A010-56AP
Ca γ 1.2	Alamone, rabbit, polyklonal, ACC-003
Connexin 40	Chemicon International, rabbit, polyklonal, AB1726
Connexin 43	Becton Dickinson, mouse, monoklonal, 610061
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, sheep, C9616
GAPDH	Cell Signaling, rabbit, monoklonal, #2118
Mouse	Dianova, goat, HRP-Konjugiert, 115-035-062
NCX-1	Novusbio, mouse, monoklonal, NB300-127
P-CaM-Kinase II	Abcam, rabbit, polyklonal, ab32678
Phospholamban	Cell Signaling, rabbit, monoklonal, #14562
PMCA4b	eigene Herstellung durch AG Schuh, rabbit, polyklonal
P-Phospholamban Thr 17	Badrilla, rabbit, polyklonal, A010-13AP
P-Tau	Cell Signaling, mouse, monoklonal, #9632
Rabbit	Dianova, goat, HRP-Konjugiert, 111-035-144
SERCA	Invitrogen, mouse, monoklonal, #MA3-919
Tau	Cell Signaling, mouse, monoklonal, #4019

Geräte- und Materialverzeichnis

Aortenkanüle 1mm	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Augensalbe Bepanthen®	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Autoklav CoolCLAVE™ Laboratory Bench Top Sterilizer	Genlantis, San Diego, USA
Beatmungsgerät UGO Basile 7025	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Binokular SZ40	Olympus, Hamburg, Deutschland
Biozero mit Objektiv Nikon, PPlan Apo, 4x 0.2, WD20, ohne Oel	Keyence, Osaka, Japan
Chemilumineszenz-Aufnahmegerät Fluorchem SP	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Dako Pen (Fettstift)	Dako, Wiesentheid, Deutschland
Desinfektionsmittel Cutasept F	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon™-Röhrchen	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Feinwage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
EPU-Herzkatheter (1.1F Mouse Octapolar EP Catheter, FTS-1113A-0518)	Scisense, London, Kanada
Fluoreszenzmikroskop (Z1m Imager)	Zeiss, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop (DM6FS)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzplattenreader	Tecan Infinite M200 Pro, Crailsheim, Deutschland

Heizplatte (24 V, 37 W)	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
BBD 6220 CO2-Inkubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Jung Ultracut E Mikrotom	Leica Microsystems AG (Reichert-Jung), Wetzlar, Deutschland
Kanüle 27G	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kompressen (steril)	Lohmann-Rauscher, Neuwied, Deutschland
Kryotom CM 1850	Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland
Langendorff Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Leukoplast® Hospital	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Metallintubationskanüle	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Mikroprozessor gesteuerte Dosierpumpe „Reglo Digital“	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Mikroskop Nikon Eklipse ME 600	Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan
Nahtmaterial Mersilene®, Polyester 5/0	Ethicon, Inc., New Jersey, USA
Nahtmaterial PROLENE® Polypropylene Suture 8660H	Ethicon, Inc., New Jersey, USA
Nahtmaterial Silk Black 6/0	FSSB GmbH, Jestetten, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus Gold	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Oroboros (O2k-FluoRespirometer)	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Pipetten und Spitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Polytron™ Homogenizer (PT 3100)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Potter-Gefäße	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Pulsed Doppler Transceiver	Indus Instruments, Webster, USA
Spritze 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenpumpe Program 2	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Temperatur-Kontrolle (TKM-0902)	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
Trockenschrank B 5042 E	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallgel Aquasonic®	Parker Laboratories Inc., New Jersey, USA
Vaporisator (Vapor 2000)	Dräger, Lübeck, Deutschland
Verstärker (Animal Bio Amplifier ML136)	ADInstruments, Sydney, Australien
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 1, Heraeus Fresco 17	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge 2, Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

IonOptix – Apparatur:

Aufnahmerechner mit Monitor	Dell Germany, Frankfurt am Main, Deutschland
Cell Framing Adapter CFA300 mit CFA Option D: Dual Emission option	IonOptix, Dublin, Irland
Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3)	Warner Instruments, Holliston, USA
FSI700 Fluorescence system interface	IonOptix, Dublin, Irland
MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable filed rate CCD	IonOptix, Dublin, Irland
Mikroskop Nikon Ti-S/L100	Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande
Model TC-324B Heater Controller, Single Channel	IonOptix, Dublin, Irland
MUS200 μ Step stand alone filter wheel and controller	IonOptix, Dublin, Irland
PMT400 Photomultiplier sub-system	IonOptix, Dublin, Irland
PTV100 PMT to Voltage Adapter	IonOptix, Dublin, Irland
Stimulus Isolation Unit (SIU-102)	Warner Instruments, Holliston, USA
Xenon short arc lamp -75XE (75W)	Ushio Inc., Tokyo, Japan

IonOptix Filter und Spiegel:

- Filter D525/30x	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter D605/55x	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter D405/30x	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter D485/30x	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter 365/535 pc	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter 89017bs F/TR	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Filter T660LPXR	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Halbdurchlässiger Spiegel 650DCXR	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Halbdurchlässiger Spiegel 585DCXR	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Halbdurchlässiger Spiegel 515DCXR	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Halbdurchlässiger Spiegel 440DCLP	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE
- Vollspiegel	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, DE

Softwareverzeichnis

Adobe Photoshop	CC2018, Mountain View, Kalifornien, USA
Adobe Illustrator	CC2018, Mountain View, Kalifornien, USA
AxioVision	ZEN core 3.0, Zeiss, Wetzlar, Deutschland
DatLab	Version 7.1.0.121, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Doppler Signal Processing Workstation	Vers. 1.627, Indus Instruments, Webster, USA
Excel	Microsoft Office Excel 2007, Microsoft, Albuquerque, New Mexico, USA
GraphPad Prism	Version 5.03, Graphpad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
ImageJ	Version 1.52n, Wayne Rasband
IonWizard	Version 6.6 revision 1, 2015, Windows 7, IonOptix, Dublin, Irland
LabChart Pro	Version 8.1.16, ADInstruments, Sydney, Australien
Wolfram Mathematica	Version 11.1, Wolfram Research, Champaign, Illinois, USA

Literaturverzeichnis

1. Wessels, A. and D. Sedmera, *Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man*. *Physiol Genomics*, 2003. **15**(3): p. 165-76.
2. Nielsen, M.S., et al., *Gap junctions*. *Compr Physiol*, 2012. **2**(3): p. 1981-2035.
3. Seifert, R., et al., *Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9391-6.
4. ., D.W.a.l.t.e.r.K.o.c.h., *Die Orte der Reizbildung und Reizleitung im menschlichen Herzen*. *Zeitschrift f. exp. Pathologic u. Therapie*, 1914. **16**: p. 1-9.
5. Zimmer, T., V. Haufe, and S. Blechschmidt, *Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart*. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014. **2014**(4): p. 449-63.
6. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
7. Wrzosek, A., *Regulation of Ca²⁺ release from internal stores in cardiac and skeletal muscles*. *Acta Biochim Pol*, 2000. **47**(3): p. 705-23.
8. Nerbonne, J.M. and R.S. Kass, *Molecular physiology of cardiac repolarization*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1205-53.
9. Eisner, D.A., *Ups and downs of calcium in the heart*. *J Physiol*, 2018. **596**(1): p. 19-30.
10. Wu, X., et al., *Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 antagonizes cardiac hypertrophy in association with calcineurin inhibition in rodents*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(4): p. 976-85.
11. Stammers, A.N., et al., *The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA)*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015. **93**(10): p. 843-54.
12. Martin, P.D., Z.M. James, and D.D. Thomas, *Effect of Phosphorylation on Interactions between Transmembrane Domains of SERCA and Phospholamban*. *Biophys J*, 2018. **114**(11): p. 2573-2583.
13. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(1): p. 21-50.
14. Shattock, M.J., et al., *Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart*. *J Physiol*, 2015. **593**(6): p. 1361-82.
15. Swaminathan, P.D., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias*. *Circ Res*, 2012. **110**(12): p. 1661-77.
16. Ahir, B.K. and M.K. Pratten, *Structure and function of gap junction proteins: role of gap junction proteins in embryonic heart development*. *Int J Dev Biol*, 2014. **58**(9): p. 649-62.
17. Michael Gekle, E.W., Stefan Gründer, Marlen Petersen, Albrecht Schwab, Fritz Markwardt, Nikolaj Klöcker, Hans-Christian Pape, Rosemarie Baumann, Hugo Marti, *Taschenlehrbuch Physiologie*. Vol. 2. 2015, Stuttgart: Thieme.
18. Kaese, S. and S. Verheule, *Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 345.

19. Liu, G., et al., *In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave*. J Physiol, 2004. **555**(Pt 1): p. 267-79.
20. Sabir, I.N., et al., *Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **98**(2-3): p. 208-18.
21. Goldberg, A.N., et al., *Electrocardiogram of the normal mouse, Mus musculus: general considerations and genetic aspects*. Cardiovasc Res, 1968. **2**(1): p. 93-9.
22. Black, N., et al., *Circadian rhythm of cardiac electrophysiology, arrhythmogenesis, and the underlying mechanisms*. Heart Rhythm, 2019. **16**(2): p. 298-307.
23. Gertsch, M., *Das EKG: auf einen Blick und im Detail*. 2008: Springer-Verlag.
24. J. Müller-Nordhorn, H.-R.A., H. Löwel & S. N. Willich *Epidemiologie des plötzlichen Herztodes*. Intensivmedizin und Notfallmedizin 2001. **38**: p. pages 499–507.
25. Zipes, D.P. and M. Rubart, *Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death*. Heart Rhythm, 2006. **3**(1): p. 108-13.
26. Israel, C.W., *Mechanisms of sudden cardiac death*. Indian Heart J, 2014. **66 Suppl 1**: p. S10-7.
27. Greene, H.L., *Sudden arrhythmic cardiac death--mechanisms, resuscitation and classification: the Seattle perspective*. Am J Cardiol, 1990. **65**(4): p. 4B-12B.
28. Trappe, H.-J., *Plötzlicher Herztod*. Der Kardiologe, 2007. **1**: p. 261–271.
29. Chokkalingam Mani, B. and S.S. Chaudhari, *Right Heart Cardiac Catheterization*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
30. Ahmed, I. and S. Hajouli, *Left Heart Cardiac Catheterization*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
31. Gassanov, N., et al., *[The PiCCO catheter]*. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(46): p. 2311-4.
32. Sangkum, L., et al., *Minimally invasive or noninvasive cardiac output measurement: an update*. J Anesth, 2016. **30**(3): p. 461-80.
33. Kobe, J., et al., *Cardiac output monitoring: Technology and choice*. Ann Card Anaesth, 2019. **22**(1): p. 6-17.
34. Abraham, D. and L. Mao, *Cardiac Pressure-Volume Loop Analysis Using Conductance Catheters in Mice*. J Vis Exp, 2015(103).
35. Tournoux, F., et al., *Validation of noninvasive measurements of cardiac output in mice using echocardiography*. J Am Soc Echocardiogr, 2011. **24**(4): p. 465-70.
36. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
37. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
38. Cypess, A.M. and C.R. Kahn, *The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis*. Curr Opin Pediatr, 2010. **22**(4): p. 478-84.
39. Desquiret, V., et al., *Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(1): p. 21-30.

40. Lorenzo, C. and F. McCormick, *SPRED proteins and their roles in signal transduction, development, and malignancy*. Genes Dev, 2020. **34**(21-22): p. 1410-1421.
41. Wakioka, T., et al., *Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 647-51.
42. Ullrich, M., et al., *SPRED2 deficiency elicits cardiac arrhythmias and premature death via impaired autophagy*. J Mol Cell Cardiol, 2019. **129**: p. 13-26.
43. Ullrich, M., et al., *OCD-like behavior is caused by dysfunction of thalamo-amygdala circuits and upregulated TrkB/ERK-MAPK signaling as a result of SPRED2 deficiency*. Mol Psychiatry, 2018. **23**(2): p. 444-458.
44. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
45. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. Adv Cancer Res, 1998. **74**: p. 49-139.
46. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.
47. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
48. Morrison, D.K., *MAP kinase pathways*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(11).
49. Bundschu, K., et al., *Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28572-80.
50. Ullrich, M., et al., *Identification of SPRED2 (sprouty-related protein with EVH1 domain 2) as a negative regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9477-88.
51. Engelhardt, C.M., et al., *Expression and subcellular localization of Spred proteins in mouse and human tissues*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(6): p. 527-38.
52. Mouse Genome Sequencing, C., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
53. Motta, M., et al., *SPRED2 loss-of-function causes a recessive Noonan syndrome-like phenotype*. Am J Hum Genet, 2021. **108**(11): p. 2112-2129.
54. Yoshida, T., et al., *Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors*. Oncogene, 2006. **25**(45): p. 6056-66.
55. Kwabi-Addo, B., M. Ozen, and M. Ittmann, *The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(4): p. 709-24.
56. Lo, T.L., et al., *The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6127-36.
57. McKie, A.B., et al., *Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer*. Oncogene, 2005. **24**(13): p. 2166-74.
58. Tsavachidou, D., et al., *SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5556-9.

59. Brems, H., et al., *Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1120-6.
60. Binder, G., *Noonan syndrome, the Ras-MAPK signalling pathway and short stature*. Horm Res, 2009. **71 Suppl 2**: p. 64-70.
61. Hennekam, R.C., *Costello syndrome: an overview*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003. **117C**(1): p. 42-8.
62. Augustin, A.M., *Auswirkung der SPRED2-Defizienz auf die kardiale Funktion und Beeinflussung durch die Behandlung mit dem Aldosteronantagonisten Eplerenon*, in *Physiologisches Institut*. 2017, Universität Würzburg: Würzburg. p. 135.
63. Lips, D.J., et al., *Left ventricular pressure-volume measurements in mice: comparison of closed-chest versus open-chest approach*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(5): p. 351-9.
64. DeMers, D. and D. Wachs, *Physiology, Mean Arterial Pressure*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
65. Saar, J.A., *Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer Atmung und reaktiver Sauerstoffspezies im Herzen*. 2014, Homburg/Saar.
66. Kao, e.a., *Fluorescence Emission Spectral Shift Measurements of Membrane Potential in Single Cells*, in *Biophysical Journal*. 2001, Elsevier.
67. Tanpradit, N., K. Chatdarong, and P. Comizzoli, *Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) pre-exposure ensures follicle integrity during in vitro culture of ovarian tissue but not during cryopreservation in the domestic cat model*. J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(12): p. 1621-1631.
68. Hearne, A., et al., *Oligomycin-induced proton uncoupling*. Toxicol In Vitro, 2020. **67**: p. 104907.
69. Scientific, T., *ThermoFisher Scientific*, in *ThermoFisher Scientific*. 2019.
70. Bioquest, A., *AAT Bioquest*. 2019.
71. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 361590.
72. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3 ed. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
73. Hara, M.R., M.B. Cascio, and A. Sawa, *GAPDH as a sensor of NO stress*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(5): p. 502-9.
74. Giepman, B.N., et al., *Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules*. Curr Biol, 2001. **11**(17): p. 1364-8.
75. Suzuki, T., P. Lui, and J.H. Wang, *Rapid purification of phospholamban by monoclonal antibody immunoaffinity chromatography*. Biochem Cell Biol, 1987. **65**(4): p. 302-9.
76. Colbran, R.J., *Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 1): p. 1-16.
77. Marionneau, C. and H. Abriel, *Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **82**: p. 36-47.
78. Hofmann, F., et al., *L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function*. Physiol Rev, 2014. **94**(1): p. 303-26.

79. Balasubramaniam, S.L., et al., *Sodium-calcium exchanger 1 regulates epithelial cell migration via calcium-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling*. J Biol Chem, 2015. **290**(20): p. 12463-73.
80. Aravindan, R.G., et al., *CASK interacts with PMCA4b and JAM-A on the mouse sperm flagellum to regulate Ca²⁺ homeostasis and motility*. J Cell Physiol, 2012. **227**(8): p. 3138-50.
81. Britzolaki, A., et al., *The SERCA2: A Gatekeeper of Neuronal Calcium Homeostasis in the Brain*. Cell Mol Neurobiol, 2018. **38**(5): p. 981-994.
82. Ow, Y.P., et al., *Cytochrome c: functions beyond respiration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 532-42.
83. Erin L. Seifert, V.B., Carmen Estey and Mary-Ellen Harper, *Essential Role for Uncoupling Protein-3 in Mitochondrial Adaptation to Fasting but Not in Fatty Acid Oxidation or Fatty Acid Anion Export*, in *Journal of Biological Chemistry*. 2008. p. 283, 25124-25131.
84. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
85. D L Farkas, M.D.W., P Febroriello, J H Carson, and L M Loew, *Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials*, in *Biophysical Journal*. 1989. p. 1053–1069.
86. Scaduto, R.C., Jr. and L.W. Grotyohann, *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*. Biophys J, 1999. **76**(1 Pt 1): p. 469-77.
87. Florian Horn, I.M., *Biochemie des Menschen*. Vol. 7., korrigierte Auflage. 2019, Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag.
88. Blaikie, F.H., et al., *Targeting dinitrophenol to mitochondria: limitations to the development of a self-limiting mitochondrial protonophore*. Biosci Rep, 2006. **26**(3): p. 231-43.
89. Chance, B.a.G.R.W., *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation*, in *The Journal of Biological Chemistry*. 1955. p. 217, 409-428.
90. Halestrap AP, C.S., Javadov SA., *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*, in *Cardiovascular Research*. 2004. p. 372–385.
91. Maack C, C.S., Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B., *Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes*, in *Circulation Research*. 2006. p. doi: 10.1161/01.RES.0000232546.92777.05.
92. Paredes, R.M., et al., *Chemical calcium indicators*. Methods, 2008. **46**(3): p. 143-51.
93. Maxwell, J.T., et al., *Analyses of Mitochondrial Calcium Influx in Isolated Mitochondria and Cultured Cells*. J Vis Exp, 2018(134).
94. Chen, S., et al., *Critical contribution of RIPK1 mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress to compression-induced rat nucleus pulposus cells necroptosis and apoptosis*. Apoptosis, 2018. **23**(5-6): p. 299-313.
95. Ukhanov, K.Y., et al., *Measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration in Limulus ventral photoreceptors using fluorescent dyes*. J Gen Physiol, 1995. **105**(1): p. 95-116.

96. Scientific, T. *Calcium GreenTM-5N, Hexapotassium Salt, cell impermeant*. [Homepage] 2021 07.11.2021 [cited 2021 2021]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C3737>.
97. Mai Chen, P.Y.S., J. Kurt Chuprun, Raymond J. Peroutka, Nicholas J. Otis, Jessica Ibetti, Shi Pan, Shey-Shing Sheu, Erhe Gao, and Walter J. Koch, *Pro-Death Signaling of GRK2 in Cardiac Myocytes after Ischemic Stress Occurs via ERK-Dependent, Hsp90-Mediated Mitochondrial Targeting*, in *Circulation Research*. 2013. p. 112(8): 1121–1134.
98. Babbitt, S.E., et al., *Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma*. *Trends Biochem Sci*, 2015. **40**(8): p. 446-55.
99. Li, Y.H., et al., *Doppler evaluation of peripheral vascular adaptations to transverse aortic banding in mice*. *Ultrasound Med Biol*, 2003. **29**(9): p. 1281-9.
100. Bers, D.M., *Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(3 Pt 2): p. H366-81.
101. Hood, D.A., et al., *Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging*. *Annu Rev Physiol*, 2019. **81**: p. 19-41.
102. Weyland, A. and F. Grune, *[Cardiac preload and central venous pressure]*. *Anaesthesist*, 2009. **58**(5): p. 506-12.
103. Tibbits, G.F. and B.N. Hamman, *Regulation of myocardial contractility*. *Med Sci Sports Exerc*, 1991. **23**(10): p. 1140-4.
104. Breithardt, G. and O.A. Breithardt, *Left bundle branch block, an old-new entity*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012. **5**(2): p. 107-16.
105. Burnham, M.P., et al., *Investigation of connexin 43 uncoupling and prolongation of the cardiac QRS complex in preclinical and marketed drugs*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(21): p. 4808-19.
106. Castiglione, A. and K. Odening, *[QT Interval and Its Prolongation - What Does It Mean?]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2020. **145**(8): p. 536-542.
107. Consolini, A.E., et al., *Mitochondrial Bioenergetics During Ischemia and Reperfusion*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **982**: p. 141-167.
108. Sweeney, H.L. and D.W. Hammers, *Muscle Contraction*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(2).
109. French, R.J. and G.W. Zamponi, *Voltage-gated sodium and calcium channels in nerve, muscle, and heart*. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2005. **4**(1): p. 58-69.
110. Zhihao, L., et al., *SERCA2a: a key protein in the Ca(2+) cycle of the heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2020. **25**(3): p. 523-535.
111. Oceandy, D., et al., *The regulatory function of plasma-membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) in the heart*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 927-30.
112. Valverde, R.H., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca²⁺-ATPase by calmodulin and protein kinase A*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(34): p. 30611-8.
113. Bers, D.M., *Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes*. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. d1697-711.

114. Song, W. and W. Shou, *Cardiac sodium channel Nav1.5 mutations and cardiac arrhythmia*. *Pediatr Cardiol*, 2012. **33**(6): p. 943-9.
115. Wagner, S., L.S. Maier, and D.M. Bers, *Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death*. *Circ Res*, 2015. **116**(12): p. 1956-70.
116. Labedzka, K., A. Grzanka, and M. Izdebska, [*Mitochondria and cell death*]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006. **60**: p. 439-46.
117. Hou, Y.M. and X. Yang, *Regulation of cell death by transfer RNA*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(6): p. 583-94.
118. Anna Atlante, P.C., Antonella Bobba, Amalia Azzariti§, Ersilia Marra, and and S. Passarella, *Cytochrome c Is Released from Mitochondria in a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent Fashion and Can Operate as a ROS Scavenger and as a Respiratory Substrate in Cerebellar Neurons Undergoing Excitotoxic Death*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2000. **275**(November 24): p. 37159 – 37166.
119. King, M., J. Kingery, and B. Casey, *Diagnosis and evaluation of heart failure*. *Am Fam Physician*, 2012. **85**(12): p. 1161-8.
120. Borlaug, B.A., *Evaluation and management of heart failure with preserved ejection fraction*. *Nat Rev Cardiol*, 2020. **17**(9): p. 559-573.
121. Bergenholm, L., et al., *Predicting QRS and PR interval prolongations in humans using nonclinical data*. *Br J Pharmacol*, 2017. **174**(19): p. 3268-3283.
122. de Jong, S., et al., *Fibrosis and cardiac arrhythmias*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(6): p. 630-8.
123. Centurion, O.A., et al., *Myocardial Fibrosis as a Pathway of Prediction of Ventricular Arrhythmias and Sudden Cardiac Death in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy*. *Crit Pathw Cardiol*, 2019. **18**(2): p. 89-97.
124. Kornreich, B.G., *The patch clamp technique: principles and technical considerations*. *J Vet Cardiol*, 2007. **9**(1): p. 25-37.
125. Wojtala, A., et al., *Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry*. *Methods Enzymol*, 2014. **542**: p. 243-62.
126. Kunz, W.S., et al., *Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1144**(1): p. 46-53.

Danksagung

Eine Doktorarbeit anzufertigen verlangt einem Doktoranden vieles ab. Nur durch ein starkes Umfeld durch Familie und Freunde lassen sich einige Herausforderungen meistern. Ebenso wichtig ist die fachliche Unterstützung, weshalb ich mich gerne bei einigen Menschen persönlich bedanken möchte.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Kai Schuh. Er hat immer ein offenes Ohr, hilft gerne wenn man nicht weiter weiß und hat mich erstklassig betreut. Vielen Dank für alles!

Ebenso möchte ich allen der AG Schuh, AG Friebe und AG Kuhn danken, die mich immer mit offenen Armen empfangen und unterstützten. Insbesondere erwähnen möchte ich hier Marco Abeßer, Dr. Sina Gredy, Denis Hepbasli, Lisa Krebs und Dr. Melanie Ullrich. Danke für Eure Hilfen im Labor und für die entstandene Freundschaft.

Auch meinen Betreuern am DZHI möchte ich herzlichst danken. Allen voran stellen möchte ich Dr. Michael Kohlhaas und Dr. Alexander Nickel, Euch danke ich herzlichst für eine ausgezeichnete Betreuung und Eure große Geduld. Desweiteren möchte ich allen beteiligten Assistenten und Kollegen am DZHI herzlich danken, insbesondere Alice Schaaf ebenfalls für Deine Geduld.

Meiner Familie gilt ein ganz besonderer Dank. Eure Unterstützung während des Studiums und dieses Projektes war hervorragend und hat so manchen Rückschlag ausgebügelt. Vielen Dank für alles!

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen befindet sich in der digitalen Version kein Lebenslauf.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die kardialen Auswirkungen einer SPRED2-Defizienz im Mausmodell“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The cardiac effects of a SPRED2 deficiency in the mouse model” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor on similar form.

Place, Date

Signature