

Calciumregulation in Kardiomyozyten
haploinsuffizienter *Cacna1c*^{+/-}-Ratten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hauke Ansgar Fender

aus **Göttingen**

Marburg/Lahn **2021**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Jens Kockskämper**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Carsten Culmsee**

Eingereicht am **10.08.2021**

Tag der mündlichen Prüfung am **07.10.2021**

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1. Einleitung | 2 |
| 1.1 Das CACNA1C-Gen | 2 |
| 1.1.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle | 2 |
| 1.1.2 Der makromolekulare Cav1.2-Komplex | 4 |
| 1.1.3 CACNA1C-Varianten und ihre Krankheitsbilder | 6 |
| 1.1.4 Das Herz und die Psyche | 8 |
| 1.1.5 Das <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Rattenmodell | 10 |
| 1.2 Von der Erregung zur Kontraktion im Herzen | 11 |
| 1.2.1 Das Erregungsleitungssystem im Herzen | 11 |
| 1.2.2 Das ventrikuläre Aktionspotential..... | 12 |
| 1.2.3 Die elektromechanische Kopplung..... | 13 |
| 1.2.5 Effekt der Sympathikusaktivierung in Kardiomyozyten | 18 |
| 1.3 Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 2. Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Versuchstiere | 24 |
| 2.1.1 Erzeugung des heterozygoten Knockouts des <i>Cacna1c</i> -Gens | 24 |
| 2.1.2 Pfotenmarkierungssystem | 25 |
| 2.2 In-vivo Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen | 26 |
| 2.3 Chemische Substanzen und Lösungen | 27 |
| 2.3.1 Pharmakologische Substanzen..... | 27 |
| 2.3.1.1 Koffein | 27 |
| 2.3.1.2 Isoprenalin..... | 28 |
| 2.3.1.3 Thapsigargin | 30 |
| 2.4 Herzentnahme | 31 |
| 2.5 Isolation von Ventrikelmyozyten | 32 |
| 2.5.1 Retrograde Herzperfusion an der Langendorff-Apparatur | 32 |
| 2.5.2 Lösungen für die Zellisolierung | 34 |
| 2.5.2.1 Tyrode-Lösung..... | 34 |
| 2.5.2.2 Isolationslösungen..... | 35 |
| 2.5.2.3 Kardioplegielösung..... | 36 |
| 2.5.2.4 Kanülierungslösung | 36 |
| 2.5.2.4 Calciumfreie Lösung | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.2.5 Enzymlösung..... | 37 |
| 2.5.2.6 Stopp-Lösung..... | 38 |
| 2.5.2.7 Calciumlösungen | 38 |
| 2.5.3 Isolationsverfahren der Ventrikelmyozyten | 39 |
| 2.5.4 Ausplattieren der Ventrikelmyozyten..... | 42 |
| 2.5.5 Isoprenalinbehandlung von Herzen an der Langendorff-Apparatur | 42 |
| 2.6 Calciummessungen am Konfokalmikroskop | 44 |
| 2.6.1 Grundlagen der Konfokalmikroskopie | 44 |
| 2.6.2 Chemische Calciumindikatoren..... | 46 |
| 2.6.3 Beladung der Zellen mit Fluo-4/AM..... | 48 |
| 2.6.4 Calciummessungen am Zeiss-LSM 510..... | 49 |
| 2.6.5 Calciummessungen am Visitech-2D-Konfokalmikroskop..... | 51 |
| 2.6.6 Auswertung der Calciumtransienten | 52 |
| 2.6.7 Messung der Calciumtransienten unter basalen Bedingungen..... | 53 |
| 2.6.8 Messung der Calciumtransienten unter gestressten Bedingungen..... | 53 |
| 2.6.9 Bildbearbeitung der originalen Linescan-Abbildungen..... | 54 |
| 2.7 Western Blot-Untersuchungen..... | 55 |
| 2.7.1 Homogenisierung von Herzgewebe | 55 |
| 2.7.2 Homogenisierungspuffer..... | 55 |
| 2.7.3 Quantitative Proteinbestimmung der Homogenate..... | 57 |
| 2.7.4 Western Blot..... | 58 |
| 2.7.4.1 Probenvorbereitung | 58 |
| 2.7.4.2 Gelvorbereitung | 59 |
| 2.7.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 60 |
| 2.7.4.4 Transfer | 61 |
| 2.7.4.5 Immundetektion..... | 62 |
| 2.7.6 Auswertung der Western Blots | 65 |
| 2.9 Statistik..... | 66 |
| 3. Ergebnisse | 68 |
| 3.1 Charakterisierung des <i>Cacna1c</i>^{+/-}-Rattenmodells..... | 68 |
| 3.2 Basale Bedingungen | 69 |
| 3.2.1 Heterozygote <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Ratten entwickeln keine Hypo- oder Hypertrophie des Herzens..... | 69 |
| 3.2.1 <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Tiere zeigen einen verminderten Blutdruck bei unveränderter Herzfrequenz..... | 70 |
| 3.2.2 Expression der Calcium-regulierenden Proteine im Ventrikelmyokard unter basalen Bedingungen..... | 71 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.2.1 Verminderte Cav1.2-Expression aber stärkere Phosphorylierung an Ser1928 in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Ventrikelmyokard | 71 |
| 3.2.2.2 Unveränderte Expression von Cav1.3 und Cav β 2 in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Ventrikelmyokard | 72 |
| 3.2.2.3 Calcium-regulierende Proteine in LV Myokard von <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Tieren unterliegen einem Remodeling..... | 73 |
| 3.2.3 Calcium-Regulation in elektrisch-stimulierten Ventrikelmyozyten unter basalen Bedingungen..... | 75 |
| 3.2.3.1 Elektrisch-stimulierte Calciumtransienten in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten sind unverändert | 75 |
| 3.2.3.2 Unveränderte SR-Ca-Beladung und fraktionelle Ca-Freisetzung in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten | 77 |
| 3.3 Stress-Bedingungen: Nachahmung erhöhter Sympathikusaktivität..... | 79 |
| 3.3.1 Die ISO-vermittelte Erhöhung des CaT ist in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten schwächer ausgeprägt..... | 79 |
| 3.3.2 Die ISO-vermittelte Erhöhung der fraktionellen Ca-Freisetzung ist in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten schwächer ausgeprägt | 82 |
| 3.3.3 Frequenzabhängigkeit der CaT: Kleinere CaT-Amplitude in Gegenwart von ISO bei allen untersuchten Frequenzen in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten | 84 |
| 3.3.4 Die ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten rechtsverschoben | 86 |
| 3.3.5 ISO-behandelte Herzen: Geringere Steigerung der RyR2-Phosphorylierung an Ser2808 in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Ventrikeln | 89 |
| 3.3.6 <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten zeigen einen geringeren sarkolemmalen Ca-Einstrom nach ISO-Behandlung..... | 92 |
| 4. Diskussion | 96 |
| 4.1 Basale Bedingungen | 96 |
| 4.1.1 <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Ratten entwickeln keine Herzhypertrophie aber haben einen verminderten Blutdruck..... | 97 |
| 4.1.2 <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Ventrikel zeigen eine verminderte Cav1.2 Expression | 98 |
| 4.1.3 <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten können unveränderte CaT generieren, unterliegen aber einem Remodeling | 100 |
| 4.2 Gestresste Bedingungen | 104 |
| 4.2.1 Abgeschwächte ISO-Antwort in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten..... | 104 |
| 4.2.2 Die ISO-vermittelte Erhöhung des Ca-Einstroms ist in <i>Cacna1c^{+/-}</i> -Myozyten vermindert..... | 106 |
| 4.2.3 Eine reduzierte Phosphorylierungs-Reserve ist verantwortlich für den abgeschwächten ISO-Effekt auf die CaT..... | 109 |
| 4.3 Conclusio..... | 112 |
| 5. Zusammenfassung..... | 114 |
| 6. Summary | 116 |
| Literaturverzeichnis..... | 118 |

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Abbildungsverzeichnis..... | 126 |
| Tabellenverzeichnis..... | 127 |
| Publikationen..... | 128 |
| Danksagung | 129 |
| Erklärung..... | 130 |
| Lebenslauf..... | 131 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| AM | <i>Acetoxymethylester</i> |
| AR | <i>Adrenozeptor</i> |
| ATP | <i>Adenosintriphosphat</i> |
| BCA | <i>Bicinchoninsäure</i> |
| BDM | <i>Diacetylmonoxim</i> |
| BSA | <i>Rinderserumalbumin</i> |
| Ca | <i>Calcium</i> |
| CaM | <i>Calmodulin</i> |
| CaMKII | <i>Ca-Calmodulin abhängige Proteinkinase II</i> |
| cAMP | <i>zyklisches Adenosinmonophosphat</i> |
| CICR | <i>Calcium-induced calcium release</i> |
| Cl | <i>Chlorid</i> |
| CSQ | <i>Calsequestrin</i> |
| dF | <i>Amplitude des CaT</i> |
| EGTA | <i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i> |
| F | <i>systolisches Calcium</i> |
| F ₀ | <i>diastolisches Calcium</i> |
| F _{diast} | <i>diastolische Fluoreszenz</i> |
| F _{rest} | <i>Ruhefluoreszenz</i> |
| HRP | <i>Meerrettichperoxidase</i> |
| ISO | <i>Isoprenalin</i> |
| K | <i>Kalium</i> |
| KHK | <i>Koronare Herzkrankheit</i> |
| LQTS | <i>long QT-Syndrom</i> |
| LTCC | <i>L-Typ-Calciumkanal</i> |
| MDD | <i>Major depressive disorder</i> |
| Na | <i>Natrium</i> |
| NCX | <i>Na/Ca-Austauscher</i> |
| PKA | <i>Proteinkinase A</i> |
| PLB | <i>Phospholamban</i> |
| RyR | <i>Ryanodinrezeptor</i> |
| RyR2 | <i>Ryanodinrezeptor-Isoform-2</i> |
| SDS | <i>Natriumlaurylsulfat</i> |
| Ser | <i>Serin</i> |
| SERCA | <i>Ca-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums</i> |
| SNP | <i>Single nucleotide polymorphism</i> |
| SR | <i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i> |
| Thr | <i>Threonin</i> |
| t-Tubuli | <i>transversale Tubuli</i> |
| WT | <i>Wildtyp</i> |
| ΔF | <i>Amplitude des CaT</i> |
| τ | <i>Abfallzeitkonstante</i> |

1. Einleitung

1. Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der kardiale Phänotyp eines heterozygoten Knockouts des *CACNA1C*-Gens im Tiermodell untersucht. Grundlage der Untersuchungen war dafür ein haploinsuffizientes *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell. Im Folgenden soll die Bedeutung und Funktion des Gens sowie dessen Signifikanz in psychiatrischen als auch Herz-Kreislauf-Erkrankungen erläutert werden. Dafür soll auf den Zusammenhang zwischen Herz und Psyche eingegangen und der Ablauf der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten nähergebracht werden.

1.1 Das *CACNA1C*-Gen

Das *CACNA1C*-Gen ist im Menschen auf Chromosom 12 und in der Ratte (*Rattus norvegicus*) auf Chromosom 4 lokalisiert. *CACNA1C* codiert für die porenbildende α 1C-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanals (LTCC) Ca_v1.2 (Yates et al., 2019). Dieser Kanal wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert, unter anderem im Gehirn in Neuronen, in Glattmuskelzellen und in Kardiomyozyten (Bhat et al., 2012). Das Gen nimmt sowohl im Gehirn, bei der Entwicklung und auf Verhaltensebene, eine zentrale Rolle ein, als auch im Herzen, wo Ca_v1.2 für den Calciumeinstrom während eines Aktionspotentials verantwortlich ist. Dadurch haben *CACNA1C* und Varianten des Gens auf den Gebieten der psychiatrischen aber auch der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den letzten Jahren rapide an Interesse gewonnen. Auf eine detaillierte Beschreibung dieser Zusammenhänge wird in einem späteren Abschnitt Bezug genommen. Zunächst sollen spannungsabhängige Calcium (Ca)-Kanäle im Allgemeinen und der Ca_v1.2-Kanal im Besonderen vorgestellt werden.

1.1.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Der Ca_v1.2-Kanal gehört zur Gruppe der spannungsabhängigen Ca-Kanäle. Spannungsabhängige Ca-Kanäle sind wichtige Proteine, die in verschiedensten Zelltypen Membranpotentialänderungen in intrazelluläre Calciumsignale umwandeln. Die Ca-Kanäle

fungieren somit als Übermittler, die ein elektrisches Signal über den sekundären Botenstoff Ca in zelluläre Ereignisse übertragen.

Ca ist ein ubiquitärer intrazellulärer Botenstoff. Innerhalb der Zelle wird die Ca-Konzentration durch Kompartimentierung des Ions und durch spezialisierte Ionenaustauscher und Pumpen bei einer zytosolischen Konzentration von etwa 100 nM extrem gering gehalten. Zum einen sind diese Mechanismen überlebensnotwendig – denn andauernd hohe Ca-Konzentrationen würden zum Zelltod führen, da Ca Phosphate (und damit den Energielieferanten der Zelle, ATP) binden und ausfällen kann. Zum Anderen prädestinieren diese Bedingungen Ca, mit dessen Möglichkeit zu schnellen Konzentrationsänderungen, für seine Rolle als sekundären Botenstoff. Die Grundprinzipien hierbei sind der durch ein Signal ausgelöste Anstieg der zytoplasmatischen Ca-Konzentration, wobei Ca sowohl aus extrazellulären Quellen (z.B. Ca-Einstrom durch LTCC) als auch aus intrazellulären Quellen (z.B. Ca-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen/ endoplasmatischen Retikulum, SR/ER) in das Zytoplasma gelangt. Dort fungiert Ca in seiner nun erhöhten Konzentration als sekundärer Botenstoff und ist in der Lage, Signalkaskaden in Gang zu setzen. Im Anschluss wird Ca wieder aus der Zelle geschleust oder zurück in die Calciumspeicher der Zelle gepumpt (Berridge et al., 2000; Clapham, 1995). Verschiedenste Prozesse im Körper werden über dieses Prinzip vermittelt.

In Herz- und Glattmuskelzellen wird so durch einen Anstieg der zytoplasmatischen Ca-Konzentration und die Aktivierung des Querbrückenzyklus eine Kontraktion ausgelöst (Bers, 2002). In Skelettmuskelzellen aktivieren die LTCC in den transversalen Tubuli (t-Tubuli) der Muskelzelle direkt Ryanodin-Rezeptoren (RyR), die in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisiert sind. In der Folge wird Ca aus dem SR freigesetzt und es kommt zu einer schnellen Muskelkontraktion (Catterall, 1991). In endokrinen Zellen wird überdies über einen Ca-Einstrom die Freisetzung von Hormonen reguliert (Yang and Berggren, 2006). In Neuronen wird über die Ca-abhängige Transmitterfreisetzung die synaptische Transmission initiiert (Tsien and Lipscombe, 1988). Auch weitere biochemische Prozesse, die Genexpression (Flavell and Greenberg, 2008) oder die Enzymaktivität, können über spannungsabhängige Ca-Kanäle gesteuert werden (Catterall, 2011).

Bei den spannungsabhängigen Ca-Kanälen kommen verschiedene Typen vor, die sich in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. In Herz- und Muskelzellen wird der Hauptcalciumeinstrom über Ca-Kanäle vom L-Typ vermittelt (LTCC). Diese Kanäle wurden deshalb L-Typ genannt, weil ihre Inaktivierung langsam erfolgt und sie

eine hohe Leitfähigkeit besitzen (long-lasting, large-conductance). Außerdem sind LTCCs sensibel für Pharmaka aus der Gruppe der Ca-Antagonisten, nämlich Dihydropyridine, Benzothiazepine und Phenylalkylamine (Tsien and Lipscombe, 1988). Desweiteren gibt es T-Typ-Ca-Kanäle (transient, tiny conductance), die bereits bei weitaus negativeren Potentialen aktiviert werden, schnell inaktivieren und nicht durch die oben genannten Ca-Antagonisten inhibiert werden können. Dann gibt es die N-Typ-Ca-Kanäle, bei denen das „N“ entweder für „neither“ steht, da sie in ihren Eigenschaften weder dem L- noch dem T-Typ zugeordnet werden konnten, oder aber für „Neuron“, wo sie vorkommen (Nowycky et al., 1985). Zudem gibt es weitere Typen, wie P/Q-Typ- oder R-Typ-Ca-Kanäle für die es bei dieser Erwähnung bleiben soll.

Aber auch die hier erwähnten Kanaltypen unterteilen sich noch in weitere, unterschiedliche Isoformen. Die große Diversität der spannungsabhängigen Ca-Kanäle kommt einerseits dadurch zustande, dass bereits für die kanalbildende $\alpha 1$ -Untereinheit verschiedene codierende Gene und somit Proteinisoformen existieren. Andererseits können auch aus einem Gen unterschiedliche Isoformen durch alternatives Spleißen entstehen. Einen weiteren Aspekt der Vielseitigkeit der Kanäle stellen die zugehörigen assoziierten Untereinheiten dar, welche einen zusätzlichen Einfluss auf die Modulation des Kanalkomplexes haben (Snutch and Reiner, 1992). Letzten Endes ist diese große Diversität die Folge von vielen unterschiedlichen Faktoren. Sie spiegelt jedoch unbestreitbar die große Bedeutsamkeit spannungsabhängiger Ca-Kanäle in physiologischen Prozessen wider.

1.1.2 Der makromolekulare Cav1.2-Komplex

Spannungsabhängige Calciumkanäle und damit auch der LTCC $\text{Ca}_v1.2$ sind makromolekulare Komplexe, die aus der porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit und weiteren assoziierten Untereinheiten ($\beta, \gamma, \alpha 2\delta$) zusammengesetzt sind (Abbildung 1-1). Wie bereits erwähnt, wird die Pore des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals von der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit, die von dem *CACNA1C*-Gen codiert wird, gebildet. Außer der Bildung der Ionenkanalpore enthält die $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit den für Ca-Ionen spezifischen Selektivitätsfilter. Zudem enthält die Untereinheit den Spannungssensor des Kanals und das Protein weist die entsprechenden Bindestellen für die Ca-Antagonisten auf. Die mit der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit assoziierten Hilfsuntereinheiten

modulieren einerseits die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals und spielen andererseits eine wichtige Rolle im Transport und der Expression des Proteins in der Zellmembran (Rougier and Abriel, 2016).

Die α_1C -Untereinheit hat eine molekulare Masse von ≈ 240 kDa (bzw. ≈ 190 kDa wenn der C-Terminus post-translational abgetrennt wurde) und enthält vier homologe Domänen (DI-DIV), jede dieser Domänen besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), die durch intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins liegen intrazellulär vor. Die S4-Segmente bilden dabei den Spannungssensor des Kanals, wohingegen die sogenannte P-Schleife zwischen den Segmenten S5-S6 die Pore mit Selektivitätsfilter ausbildet (Rougier and Abriel, 2016; Shaw and Colecraft, 2013). Insbesondere das vierte Transmembransegment (S4) enthält in einer stark konservierten Sequenz eine Vielzahl der positiv-geladenen, basischen Aminosäuren Lysin und Arginin und trägt so zu einer Konformationsänderung nach Depolarisation der Zellmembran bei (Bodi, 2005).

Es existieren vier verschiedene Isoformen (β_1 - β_4) der $Ca_v\beta$ -Untereinheit. Die β -Untereinheit bindet mit hoher Affinität an die α -Interaktions-Domäne (α -interaction-domain; AID), einer speziellen Sequenz der α_1 -Untereinheit des Kanals (Dolphin, 2003). Der β -Untereinheit wurde mittels der Bindung an diese Domäne eine Funktion im Transport des Kanals zur Plasmamembran zugesagt (Bichet et al., 2000). Dieser Mechanismus wird jedoch kontrovers diskutiert (Yang et al., 2019). Allerdings scheint die Interaktion beider Untereinheiten über die AID eine wichtige Rolle in der β -adrenergen Modulation des Kanals zu spielen (Yang et al., 2019). Die β -Untereinheit ist jedoch zweifelsfrei an der Modulation der biophysikalischen Eigenschaften des Kanals beteiligt. Hierbei erhöht die β -Untereinheit die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des Kanals und moduliert die Spannungsabhängigkeit sowie die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung (Bodi, 2005; Rougier and Abriel, 2016; Shaw and Colecraft, 2013).

Die Assoziation der α_1 - mit der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit führt ebenfalls zu einer Modulation der biophysikalischen Eigenschaften des Kanals. Sie erhöht den maximalen Strom des Kanals und beschleunigt die Kinetiken der Aktivierung und der Inaktivierung. Außerdem scheint die Untereinheit die Affinität des Kanals zu Dihydropyridinen zu erhöhen (Bodi, 2005; Rougier and Abriel, 2016; Shaw and Colecraft, 2013).

Von der γ -Untereinheit sind acht verschiedene Isoformen ($\gamma 1 - \gamma 8$) bekannt. Funktionell moduliert diese Untereinheit in Kombination mit der β -Untereinheit ebenfalls die Eigenschaften des Kanals, wobei die genaue Auswirkung dieser Untereinheit noch zukünftiger Erforschung bedarf (Shaw and Colecraft, 2013).

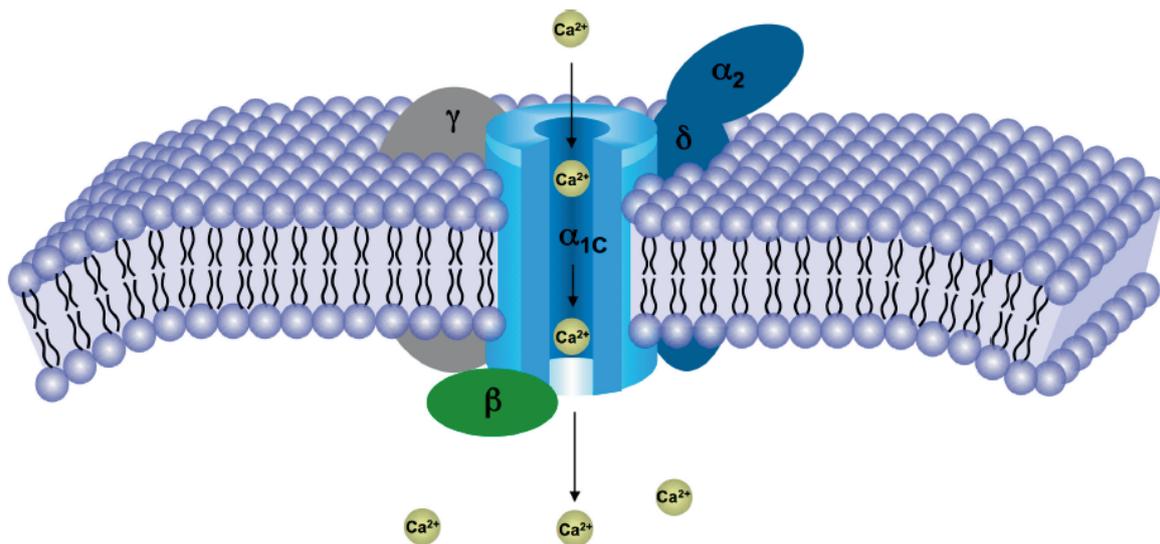


Abbildung 1-1: Der makromolekulare Cav1.2-Komplex

Die $\alpha 1C$ -Untereinheit bildet die Pore des Kanals. Die mit ihr assoziierten Untereinheiten werden im Text erläutert. Übernommen aus (Hu et al., 2017).

1.1.3 *CACNA1C*-Varianten und ihre Krankheitsbilder

Risikofaktoren für das Auftreten psychiatrischer Krankheitsbilder sind neben Umwelteinflüssen auch erblich bedingte Faktoren im Sinne von genetischen Prädispositionen. Vor allem durch genetische Assoziationsstudien in Menschen konnten immer mehr Erkrankungen in den Zusammenhang mit bestimmten Genen und Genvarianten gebracht werden (Burmeister et al., 2008). Innerhalb solcher genomweiten Assoziationsstudien hat sich das *CACNA1C*-Gen, bzw. dessen Polymorphismen, als ein gemeinsamer Risikofaktor in vielen der untersuchten psychiatrisch-erkrankten Patienten herauskristallisiert und damit das Interesse auf dem Gebiet der Psychiatrie und Psychologie geweckt. Polymorphismen im *CACNA1C*-Gen konnten seitdem mit dem Auftreten von Depressionen (Major depressive

disorder)(Green et al., 2010), bipolaren Störungen (Ferreira et al., 2008), Schizophrenie (Nyegaard et al., 2010), aber auch Angststörungen und Autismus (Jiang et al., 2013; Lee et al., 2012) in Verbindung gebracht werden. Das Gen kann also als ein gebietsübergreifender Risikofaktor für viele unterschiedliche psychiatrische Krankheitsbilder betrachtet werden (Dedic et al., 2018). Der Zusammenhang von *CACNA1C* mit psychiatrischen Erkrankungen scheint dabei nicht weit hergeholt, denn der vom Gen codierte Cav1.2-Kanal ist die im Gehirn am häufigsten exprimierte Isoform der LTCCs. Hier spielt der Kanal eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität der Neuronen, der synaptischen Plastizität, der Entwicklung von Dendriten und damit auch in Lernprozessen, Verhalten und der Erinnerung (Bhat et al., 2012). Bisher konnten in diesen Studien mehrere verschiedene Polymorphismen im Gen identifiziert und mit den genannten psychiatrischen Erkrankungen assoziiert werden. Der konsistenteste krankheitsassoziierte Polymorphismus war dabei ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) an der Stelle rs1006737 des Gens. Die entdeckten SNPs (single nucleotide polymorphisms) liegen in nicht-codierenden Abschnitten des Gens, den Intron-Regionen. Hier sind sie in der Region eines quantitativen Merkmals (expression quantitative trait locus; eQTL) lokalisiert und können so auf die Transkription des Gens einwirken und die Expressionslevel beeinflussen (Moon et al., 2018). Die Polymorphismen haben somit keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins, sondern vielmehr auf die exprimierte Proteinmenge. Der SNP rs1006737 scheint hierbei eine verminderte Expression des *CACNA1C*-Gens zu bewirken (Eckart et al., 2016). Abschließende Einigkeit besteht hierbei jedoch nicht, denn in einer anderen Studie wurde dieser SNP hingegen mit einer erhöhten mRNA-Expression des Gens in Zusammenhang gebracht (Bigos et al., 2010).

Darüber hinaus sind aber auch funktionelle Mutationen des *CACNA1C*-Gens bekannt, die sich in Krankheitsbildern äußern, die nicht nur die Psyche, sondern auch weitere Organsysteme, insbesondere das Herz betreffen. Eine dieser seltenen Krankheiten, die aus einer aktivitätssteigernden Mutation des Kanals resultiert, ist das Timothy-Syndrom. Dieses autosomal-dominant vererbte Syndrom geht einher mit Autismus-Spektrum-Störungen, zusammengewachsenen Fingern und Zehen (Syndaktylie), Herzfehlern und Arrhythmien (Splawski et al., 2004). Mutationen im *CACNA1C*-Gen können zu weiteren kardiologischen Erkrankungen führen, beispielsweise dem long-QT-Syndrom (LQTS), welches, wie der Name bereits verrät, mit einem abnormal langen QT-Intervall im EKG einhergeht. LQTS kann zu Arrhythmien führen, zeigt aber im Gegensatz zum Timothy-Syndrom weniger multi-

systemische Symptome auf (Wemhöner et al., 2015). Auch das Brugada-Syndrom, welches mit ventrikulären Tachykardien und dem plötzlichen Herztod einhergehen kann, wird mit *CACNA1C* in Verbindung gebracht (Brugada et al., 1993). Als letztes Beispiel soll das Syndrom der frühen Repolarisation (early repolarization syndrome; ERS) genannt werden, welches ebenfalls mit *CACNA1C* assoziiert sein kann und zum plötzlichen Herztod führen kann (Ali et al., 2015).

Auch die sich hier offenbarende wichtige Rolle des *CACNA1C*-Gens im Herzen liegt auf der Hand, denn, wie bereits erwähnt, ist der $Ca_v1.2$ -Kanal die einzig exprimierte Isoform in adulten Ventrikulomyozyten und dort verantwortlich für den Ca-Einstrom während des Aktionspotentials (Bers, 1999). Lediglich in atrialen- und Sinusknoten-Myozyten wird zusätzlich die Isoform $Ca_v1.3$ in geringen Mengen exprimiert (Striessnig et al., 2014). Dabei ist ein korrekt regulierter Ca-Einstrom über $Ca_v1.2$ unerlässlich im gesunden Herzen. So konnte in Kardiomyozyten gezeigt werden, dass ein erhöhter Ca-Einstrom über $Ca_v1.2$ in einer Hypertrophie des Herzmuskels enden kann (Chen et al., 2011). Überraschenderweise wurde in heterozygoten *Cacna1c*^{+/-}-Mäusen beobachtet, dass ein verminderter Ca-Einstrom über $Ca_v1.2$ in Kardiomyozyten ebenfalls eine Hypertrophie und Herzversagen auszulösen vermag (Goonasekera et al., 2012). Abschließend lässt sich sagen, dass eine veränderte Expression oder Funktion des *CACNA1C*-Gens bzw. des $Ca_v1.2$ -Kanals eine essentielle Rolle sowohl für die Funktion und Entwicklung des Gehirns, als auch für die Funktion des Herzens einnimmt.

1.1.4 Das Herz und die Psyche

Anhand dieses Einblicks in die Varianten des *CACNA1C*-Gens und den daraus resultierenden Krankheitsbildern lässt sich vermuten, dass psychische Erkrankungen und Herzerkrankungen miteinander in Verbindung stehen könnten. Aber auch unabhängig vom *CACNA1C*-Risikogen stehen die Psyche und das Herz miteinander in Verbindung. Es ist bekannt, dass einige neuropsychiatrische Störungen das Risiko für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöhen können, und umgekehrt steigern Herz-Kreislauf-Erkrankungen das Risiko für die Entwicklung psychiatrischer Krankheitsbilder. Depressionen (Major depressive disorder; MDD) sind als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) auf

derselben Stufe einzuordnen wie die weithin bekannten Risikofaktoren Rauchen, Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes (Headrick et al., 2017; Van der Kooy et al., 2007). Aus einer ganzheitlichen Sichtweise kann man sich diese Zusammenhänge auch gut erklären, denn eine Person, die unter Depressionen leidet, wird wahrscheinlich auch weniger aktiv und sozial stärker isoliert leben. Diese Verhaltensänderungen können zu Gewichtszunahme, Bluthochdruck oder Diabetes führen und all dies vermag wiederum Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu begünstigen. Des Weiteren teilen sich Herz-Kreislauf- und psychiatrische Erkrankungen eine Vielzahl von Risikofaktoren. Das bedeutet, wenn eine Person diesen gemeinsamen Risikofaktoren ausgesetzt ist, dann erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von sowohl psychiatrischen als auch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zudem können Herzerkrankungen, wie die Herzinsuffizienz, zu einer chronisch schlechteren Durchblutung des Gehirns führen. Außerdem korrelieren Herzerkrankungen häufig mit einem vermehrten Auftreten von Schlaganfällen. Beide Effekte können abermals psychiatrische Erkrankungen begünstigen (Doehner et al., 2018). Depressionen beispielsweise werden in 20-40% der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beobachtet, womit dieser Wert ungefähr fünf Mal höher ist als die Prävalenz in der restlichen Bevölkerung (Rutledge et al., 2006). Auch Angststörungen kommen verstärkt bei Patienten mit Herzinsuffizienz vor, wobei statistisch gesehen vor allem Depressionen einen negativen Einfluss auf die Gesamtmortalität der Patienten haben (Sokoreli et al., 2016).

Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass chronischer Stress und Depressionen unabhängig von den oben genannten Faktoren einen direkten Einfluss auf die myokardiale Funktion haben können (Headrick et al., 2017). Depressionen gehen einher mit einer Dysfunktion des autonomen Nervensystems. Dabei kommt es zu einer Überaktivität des Sympathikus bei gleichzeitig reduzierter Vagusaktivität, beides wiederum kann in chronisch erhöhten Konzentrationen an Katecholaminen resultieren. Diese Effekte können am Herzen oxidativen Stress begünstigen oder Arrhythmien auslösen. Des Weiteren gibt es Evidenz dafür, dass auch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA) betroffen ist. Chronischer Stress bewirkt eine erhöhte Ausschüttung an Stresshormonen, wie Cortisol und Katecholaminen, was zu erhöhten Blutdruckwerten und Insulinresistenz führen kann. Letzlich wird zudem eine immuno-inflammatorische Dysfunktion postuliert, die mit einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine einhergeht. Auch erhöhte Entzündungswerte vermögen das Herz auf lange Sicht zu schädigen (Headrick et al., 2017).

Aufgrund dieser Zusammenhänge zwischen den LTCCs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und psychiatrischen Erkrankungen werden zunehmend Studien durchgeführt, die den Einfluss klassischer Herz-Kreislauf-Medikamente und L-Typ-Ca-Kanalblocker auf psychiatrische Erkrankungen untersuchen. In einer dieser Studien zeigten Patienten, die LTCC-Blocker einnahmen, reduzierte Raten psychiatrischer Hospitalisierungen und weniger Einweisungen aufgrund von Selbstverletzungen (Hayes et al., 2019). In einer in Dänemark durchgeführten Studie konnte eine Korrelation zwischen der Einnahme von blutdrucksenkenden Medikamenten und einem verminderten Risiko für das Auftreten von Depressionen beobachtet werden. Diesen Effekt zeigten hierbei einige Substanzen aus unterschiedlichen Klassen von Antihypertensiva, darunter ACE-Hemmer, Betablocker als auch Calciumantagonisten (Kessing et al., 2020). So interessant das Konzept der Therapie psychiatrischer Erkrankungen mit Calciumantagonisten und blutdrucksenkenden Medikamenten auch ist, so bedarf es doch noch weiterer Studien und der Erforschung zugrundeliegender Mechanismen.

Zusammenfassend sind Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises und Herz-Kreislauf-Erkrankungen über gemeinsame Risikofaktoren, systemische und soziale Faktoren, direkte zelluläre Mechanismen und zu guter Letzt das *CACNA1C*-Gen eng miteinander verbunden. Das haploinsuffiziente *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell, dem sich der nächste Abschnitt widmen soll, ist also in vielerlei Hinsicht ein geeignetes Modell, welches es sich auf Verhaltensebene als auch auf Ebene des Herzens zu untersuchen lohnt.

1.1.5 Das *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell

Das haploinsuffiziente *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell wurde initial erzeugt, um die Bedeutung von Ca_v1.2 für psychiatrische Erkrankungen und insbesondere für das Verhalten der Tiere zu untersuchen. Der hierbei induzierte heterozygote Knockout des *CACNA1C*-Gens soll dabei mit einer global verminderten Expression des Gens einhergehen. Das Modell eignet sich insofern gut, da die SNPs, welche mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert wurden, ebenfalls eine Auswirkung auf die Expressionslevel des Gens haben und das codierte Protein nicht funktionell verändern. Ein homozygoter Knockout des Gens ist embryonal letal (Seisenberger et al., 2000) und kann deshalb nicht verwendet werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass diese

heterozygoten *Cacna1c*^{+/-}-Ratten Defizite in pro-sozialem Verhalten aufweisen und Autismus-ähnliche Verhaltensweisen entwickeln (Kisko et al., 2018; Redecker et al., 2019). In einer Studie an weiblichen *Cacna1c*^{+/-}-Mäusen zeigten diese zudem ein vermindertes Explorationsverhalten und erhöhte Ängstlichkeitslevel (Dao et al., 2010). Der heterozygote Knockout des Gens resultiert folglich in einem Verhaltensphänotypen. Zusammengenommen bestätigen diese Befunde somit die wichtige Rolle des *CACNA1C*-Gens für psychiatrische Erkrankungen. Trotz der wichtigen Funktion des Ca_v1.2-Kanals im Herzen und der Verbindung zwischen Herz und Psyche wurde der kardiale Phänotyp des *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodells bis dato nicht untersucht.

1.2 Von der Erregung zur Kontraktion im Herzen

Grundlage der koordinierten Herzarbeit ist die elektromechanische Kopplung in den Herzmuskelzellen, bei der ein elektrischer Impuls in eine mechanische Antwort der Zelle, die Kontraktion, übersetzt wird. Das verbindende Element zwischen der elektrischen Erregung und der resultierenden Kontraktion der Zelle ist das Ca, welches an den kontraktilen Filamenten den Querbrückenzyklus in Gang setzen kann. Am Anfang dieses Mechanismus steht das Aktionspotential, welches über das Erregungsleitungssystem des Herzens zur ventrikulären Herzmuskelzelle gelangt.

1.2.1 Das Erregungsleitungssystem im Herzen

Im gesunden Herzen beginnt die Herzerregung im Sinusknoten, der im rechten Vorhof an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene (*Vena cava superior*) lokalisiert ist. Der Sinusknoten ist der primäre Schrittmacher des Herzens und ist in der Lage, autonom und rhythmisch zu depolarisieren. Der Sinusknoten hat dabei eine Eigenfrequenz von 60-90/min. Bei dem Erregungsleitungssystem des Herzens handelt es sich nicht um Nervenzellen, sondern um eigens auf die Erregungsbildung und -weiterleitung spezialisierte Herzmuskelzellen. Nach Depolarisation des Sinusknotens breitet sich die Erregung zunächst über die Vorhöfe aus. Die Erregungsübertragung von einer Herzmuskelzelle auf die nächste erfolgt dabei über Zell-Zell-

Kontakte, den gap junctions, über die das Zytoplasma benachbarter Zellen verbunden ist. Die sich ausbreitende Vorhoferregung wird jedoch nicht auf das Ventrikelmyokard übertragen, da Kammern und Vorhöfe des Herzens auf der Ebene der Herzklappen durch ein elektrisch inertes Herzskelett voneinander abgeschirmt sind. Für die Erregung der Kammern gelangt das Aktionspotential vom Sinusknoten zunächst zum sekundären Schrittmacher des Herzens, dem AV-Knoten. Auch der AV-Knoten hat eine Schrittmacherfunktion mit einer Eigenfrequenz von 50-60/min. Da die Eigenfrequenz des Sinusknotens deutlich höher liegt, wird der AV-Knoten physiologisch erregt, bevor er selbstständig ein Aktionspotential generieren würde. Nur bei Ausfall des Sinusknotens würde der AV-Knoten seine Funktion als sekundärer Schrittmacher ausüben. Die physiologische Funktion des AV-Knotens liegt darin, die Erregungsweiterleitung in die Ventrikel zu verzögern. Dies ist wichtig, damit die Erregung der Ventrikel zeitlich nach der Vorhoferregung stattfindet und genügend Zeit für die Ventrikelfüllung mit Blut vorhanden ist. Dem AV-Knoten schließt sich das His-Bündel an, welches das elektrisch-inerte Herzskelett durchbricht und so die Erregung in die Ventrikel weiterleiten kann. Im Anschluss teilt sich das Erregungsleitungssystem in die beiden Kammerchen auf, die sich dann in die feineren Purkinje-Fäden aufteilen und die Erregung auf das Ventrikelmyokard übertragen (Anderson et al., 2009; Pape et al., 2019).

1.2.2 Das ventrikuläre Aktionspotential

Die im Arbeitsmyokard ankommende Erregungen führt nun zu einer Depolarisation des Ventrikelmyozyten und löst in diesem wiederum ein Aktionspotential aus. Ein Aktionspotential ist eine vorübergehende Änderung der Membranspannung, die über die Bewegung verschiedener Ionen (Natrium (Na), Calcium (Ca), Kalium (K), Chlorid (Cl)) über die Membran durch Kanäle, Austauscher und Pumpen vermittelt wird (Whalley et al., 1995). Während die Zellen des Erregungsbildungssystems spontan depolarisieren können, besitzen die Zellen des Ventrikelmyokards ein konstantes Ruhemembranpotential (V_R) von etwa -85 mV, welches weitgehend dem Gleichgewichtspotential von Kalium (K) entspricht. Die Aktionspotentiale der Ventrikelmyozyten sind durch eine lange Dauer von 300-400 ms gekennzeichnet und laufen in mehreren Phasen ab. Wird die Herzmuskelzelle durch eine Erregung über das Schwellenpotential von -60 mV depolarisiert (Liu et al., 2016), kommt es zu

einer Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, die einen raschen, aber starken Einstrom von Na^+ -Ionen (I_{Na}) zur Folge hat (Phase 0). Bei dieser schnellen Depolarisation steigt das Membranpotential bis auf +40 mV an. Im Anschluss gehen die Natriumkanäle schnell in einen inaktivierten Zustand über (<1-2 ms) und können erst nach Repolarisation der Zellmembran erneut aktiviert werden. An den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials schließt sich eine Phase der frühen Repolarisation (Phase 1) an, bei der das Potential wieder auf etwa +10 mV abfällt. Grund hierfür ist die schnelle spannungsabhängige Inaktivierung des Natriumstroms und die gleichzeitige Öffnung eines auswärts gerichteten Kaliumstroms (I_{to1}). Hiernach schließt sich die Plateauphase (Phase 2) des Aktionspotentials an. In dieser werden spannungsabhängige Ca-Kanäle ab etwa -40 mV durch die schnelle Depolarisation geöffnet und Ca (I_{Ca}) strömt in die Zelle. Der gleichzeitig auftretende Kaliumausstrom hält sich in der Plateauphase des Aktionspotentials mit dem Ca-Einstrom die Waage, so dass das Membranpotential relativ konstant bleibt. Die Inaktivierung der Ca-Kanäle erfolgt langsam (>100 ms), daher sind diese maßgeblich für die lange Plateauphase verantwortlich. Ein fortschreitender Abfall des Calciumstroms (I_{Ca}) zusammen mit einem erhöhten Kaliumausstrom (I_{K}) beenden letztendlich die Plateauphase und leiten die Repolarisationsphase (Phase 3) ein. Im Zuge der Repolarisation werden einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (I_{K1}) wieder geöffnet (Phase 4) und die Zelle kann ihr Ruhemembranpotential wiederherstellen (Whalley et al., 1995).

1.2.3 Die elektromechanische Kopplung

Die Öffnung der spannungsabhängigen Ca-Kanäle ($\text{Ca}_v1.2$) während des Aktionspotentials und der damit verbundene Ca-Einstrom lösen die elektromechanische Kopplung aus und resultieren in der Kontraktion der Herzmuskelzelle. Der Ventrikelmyozyt besitzt tiefe Einstülpungen der Plasmamembran, die transversalen Tubuli (t-Tubuli), in denen die LTCCs lokalisiert sind. Durch die Invaginationen der t-Tubuli stehen die LTCCs in engem Kontakt mit dem SR der Zelle. In diesen dyadischen Verbindungen, auch *Couplon* genannt, stehen etwa 10-25 LTCCs einer Gruppe von 100-200 auf dem SR lokalisierten Ryanodinrezeptoren (RyR) gegenüber. Dieser enge Verbindungsspalt wird auch *junctional cleft* genannt. Nach Aktivierung der LTCCs steigt die Ca-Konzentration durch den Ca-Einstrom im Bereich dieser

Verbindungsstelle schnell auf 10-20 μM an. Der Ca-Anstieg aktiviert nun wiederum die Ryanodinrezeptoren, die daraufhin öffnen und so eine Calciumfreisetzung aus dem SR zur Folge haben. Dieser Prozess wird Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (Calcium-induced calcium release; CICR) genannt (Abbildung 1-2). Ein Ventrikelmyozyt besitzt etwa 10.000 dieser Couplons, die für die elektromechanische Kopplung der Zelle synchron durch das AP aktiviert werden müssen (Bers, 2004).

Die Termination des Ca-Einstroms über die LTCCs ($I_{\text{Ca,L}}$) erfolgt sowohl spannungsabhängig als auch Ca-abhängig. Das regulatorische Protein Calmodulin (CaM) ist im $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal mit dem C-Terminus der $\alpha1\text{C}$ -Untereinheit assoziiert. Wenn die Ca-Konzentration in der dyadischen Region (durch den Ca-Einstrom oder die Freisetzung aus dem SR) ansteigt, bindet Ca an das präasoziierte CaM. Der Ca-CaM-Komplex bindet nun in der $\alpha1\text{C}$ -Untereinheit an das sogenannte IQ-Motiv und führt so zur Inaktivierung des Kanals (Bers, 2008; Peterson et al., 1999). Diese Ca-abhängige Regulation des Ca-Einstroms schützt die Zelle, im Sinne einer negativen Rückkopplung, vor einer Ca-Überladung (Bers, 2008).

Die Ryanodinrezeptoren (RyR) sind die SR-Ca-Freisetzungskanäle der Myozyten. Die RyR sind groß (565 kDa) und mit vielen weiteren Proteinen assoziiert (Bers, 2004). Im Herzen wird die Isoform 2 (RyR2) des Proteins exprimiert. Die Offenwahrscheinlichkeit der Ryanodinrezeptoren wird sowohl über das zytosolische Ca (außerhalb des SR), als auch über den Ca-Gehalt innerhalb des SR reguliert. Bei erhöhtem SR-Ca-Gehalt sind die RyR2 sensitiver für die Ca-induzierte Aktivierung, was zu einer stärkeren fraktionellen Freisetzung aus dem SR führen kann (Shannon et al., 2000). Auch dies spiegelt einen Mechanismus wider, der den Ca-Gehalt des SR reguliert. Ist der Ca-Gehalt niedrig, so sind auch die RyR2 weniger sensitiv und setzen weniger Ca frei. Weitere Liganden des Rezeptors sind neben Ca auch ATP und Koffein (Fill and Copello, 2002). Letzteres kann in zellulären Experimenten genutzt werden, um eine Ca-Freisetzung aus dem SR zu provozieren (Kong et al., 2008).

Das aus dem SR freigesetzte Ca (im Rahmen der Ca-induzierten Ca-Freisetzung) führt zu einem Konzentrationsanstieg auf 200-400 μM [Ca] im junctional cleft, von wo aus es schnell in das Zytoplasma der Zelle diffundiert (Bers, 2008). Hier bindet Ca an die Myofilamente und setzt den Querbrückenzyklus und damit die Kontraktion der Zelle in Gang.

Die Sarkomere sind die kleinsten kontraktilen Einheiten einer Muskelzelle. Sie bestehen aus den kontraktilen Elementen: dem dünnen Filament Aktin, dem dicken Filament Myosin sowie

regulatorischen Proteinen, zu denen Tropomyosin (Tm) und der Troponinkomplex gehören (Solaro and Rarick, 1998). Troponin (Tn) ist ein Heterotrimer aus verschiedenen Genprodukten. Es besteht aus dem Ca-Sensor Troponin C (TnC), dem Inhibitor der Aktin-Myosin-Interaktion Troponin I (TnI) und dem Tropomyosin-Bindungsprotein, Troponin T (TnT). Sobald Ca an TnC bindet interagiert dieses mit TnI und führt zu einer Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosinkomplexes. Tm bindet nun stärker an Aktin und gibt durch diese Konformationsänderung die Aktinbindestelle für Myosin frei. Über die Aktin-Myosin-Interaktion können nun Querbrücken ausgebildet und der Querbrückenzyklus gestartet werden. Die kardiale Kontraktilität hängt daher mit der Ca-Konzentration zusammen, die Relaxation des Muskels wird dementsprechend durch einen Abfall der Ca-Konzentration eingeleitet (de Tombe, 2003; Solaro and Rarick, 1998).

Für die Relaxation der Herzmuskelzelle und das Einleiten der Diastole muss das Ca wieder aus dem Zytosol entfernt werden. Dies geschieht über verschiedene Routen. Der quantitativ wichtigste Weg der Ca-Erniedrigung ist das Zurückschleusen des Ca in das SR über die SR-Ca-ATPase (SERCA). Für den quantitativ zweitwichtigsten Weg ist, der im Sarkolemm lokalisierte Na/Ca-Austauscher (NCX) verantwortlich, der ein Ca-Ion gegen drei Na-Ionen auszutauschen vermag. Das restliche Ca wird über langsame Systeme wie den mitochondrialen Ca-Uniporter oder die sarkolemmale Ca-ATPase transportiert. In Ventrikelmyozyten von Ratten entfernt die SERCA während eines CaT etwa 92% des zytosolischen Ca, der NCX macht etwa 7% aus und die langsamen Systeme die restlichen 1% (Bers, 2002).

Die SERCA schleust dabei unter ATP-Verbrauch Ca gegen den elektrochemischen Gradienten zurück in das SR. Im Herzen wird die Isoform SERCA2a exprimiert, die auch in Skelett- und Glattmuskeln zu finden ist (Sitsel et al., 2019). Die Aktivität der SERCA wird reguliert durch Phospholamban (PLB), ein kleines Protein in der Membran des SR. PLB kann als Pentamer vorliegen, wobei jedes Monomer eine Masse von etwa 6 kDa besitzt (Fujii et al., 1987). Im unphosphorylierten Zustand bindet PLB an die SERCA und inhibiert deren Aktivität. Nach Phosphorylierung dissoziiert PLB von der SERCA ab, bildet Oligomere und befreit die SERCA von der Inhibition (James et al., 1989; Kockskämper, 2016). Die SERCA hat durch ihre über PLB gesteuerte Aktivität einen wichtigen Einfluss auf die Kinetiken der zellulären CaT. Ihre Aktivität reguliert maßgeblich den zytosolischen Ca-Abfall und damit die Relaxationsgeschwindigkeit der Zelle. Des Weiteren reguliert die SERCA den SR Ca-Gehalt und bestimmt daher auch den Anteil an Ca, der bei der nächsten Kontraktion freigesetzt werden kann (Kockskämper, 2016).

Bei jedem Aktionspotential gelangt Ca über die LTCCs von extrazellulär in die Zelle. Damit die Ca-Balance aufrechterhalten wird, muss ebendieser Anteil an Ca die Zelle auch wieder verlassen. Wie bereits erwähnt, ist dafür der NCX verantwortlich. Der NCX ist ein elektrogener Austauscher der 1 Ca gegen 3 Na austauscht und somit bei Ca-Ausschleusung eine positive Ladung in die Zelle verschiebt (I_{NCX}). Die Richtung, in der der NCX arbeitet, ist prinzipiell reversibel und hängt folglich sowohl von den Konzentrationen der Ionen Ca und Na als auch dem Membranpotential ab. So kann initial im schnellen Aufstrich des Aktionspotentials bei einem Membranpotential von +40 mV und intrazellulär noch sehr geringen Ca-Konzentrationen der „Rückwärtsmodus“ (Na-Efflux – Ca-Influx) thermodynamisch favorisiert sein, so dass der NCX hier auch einen Teil zum Ca-Einstrom und zur frühen Repolarisation beiträgt. Dieser Mechanismus ist allerdings zeitlich sehr begrenzt, da durch den schnellen intrazellulären Anstieg der Ca-Konzentration bei Öffnung der LTCCs wieder der „Vorwärtsmodus“ (Na-Influx – Ca-Efflux) bevorzugt wird (Bers, 2008).

Damit sich das Herz oder der Kardiomyozyt im Gleichgewicht (*steady state*) befinden und eine beständige Funktion ausüben kann, müssen sich auch alle genannten Ca-Ströme in einer Balance befinden. Das aus dem SR freigesetzte Ca muss dem Wiederaufgenommenen entsprechen, ebenso müssen sich der Ca-Influx und -Efflux über das Sarkolemm die Waage halten. Ein Ungleichgewicht dieser Ströme würde sich in Änderungen im SR Ca-Gehalt manifestieren, welche wiederum Änderungen der Herzfunktion nach sich ziehen würden (Eisner, 2018). Natürlich kann eine Verschiebung dieses Gleichgewichts gewollt und sogar überlebensnotwendig sein. Über das sympathische und das parasympathische Nervensystem ist der Körper in der Lage, die Herzfunktion zu modulieren und ständig an die benötigten Bedingungen anzupassen. Grundbaustein einer jedweden Modulation ist dabei das Ca. Der Sympathikus ist für die physiologische Steigerung der Herzleistung verantwortlich. Das nächste Kapitel soll sich daher den Effekten einer Sympathikusaktivierung im Herzen auf zellulärer Ebene widmen.

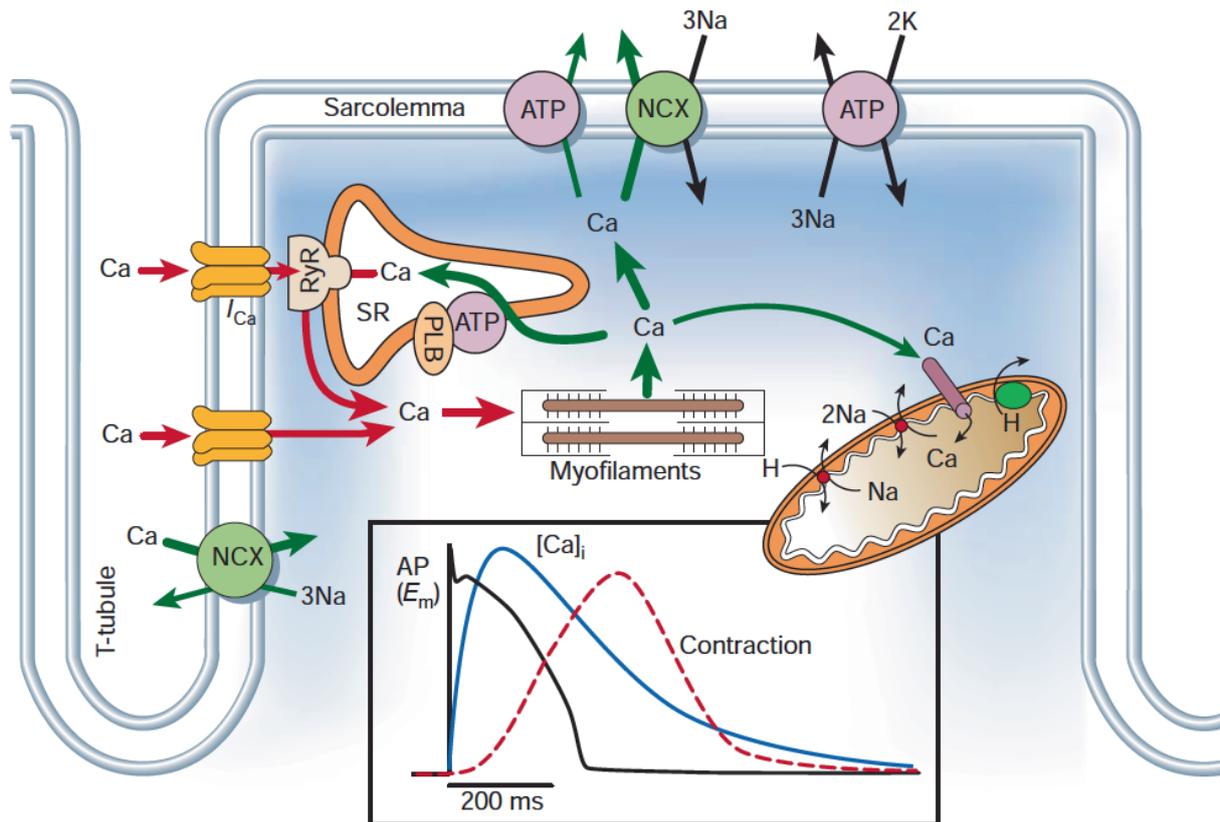


Abbildung 1-2: Elektromechanische Kopplung im Ventrikelmyozyten

Der Ablauf der elektromechanischen Kopplung und die beteiligten Proteine werden im Text erläutert. Im Graphen ist der Zeitverlauf eines Aktionspotentials (schwarz), des Calciumtransienten (blau) und der resultierenden Kontraktion (rot) eines Ventrikelmyozyten abgebildet. Übernommen aus (Bers, 2002).

1.2.5 Effekt der Sympathikusaktivierung in Kardiomyozyten

Die Herzfunktion unterliegt einer ständigen Modulation durch das vegetative Nervensystem, um an wechselnde Anforderungen angepasst zu werden. Dabei wird das Herz von sympathischen und parasympathischen Nervenfasern innerviert, deren Aktivitäten einer dynamischen Balance unterliegen. Das autonome Nervensystem hat hierbei einerseits einen Einfluss auf das Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens, damit also auf die Herzfrequenz (Chronotropie) und die AV-Überleitungsgeschwindigkeit (Dromotropie), aber auch auf die einzelnen Herzmuskelzellen und deren Ca-Homöostase. In diesen kann so die Schlagkraft (Inotropie) und die Relaxationsgeschwindigkeit (Lusitropie) beeinflusst werden. Dabei führt eine Sympathikusaktivierung zu einer Erhöhung (positiv chrono-, dromo-, lusi-, inotrop) genannter Effekte. Auf zellulärer Ebene vermittelt der Sympathikus seine Effekte über die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin und deren Agonismus an adrenergen Rezeptoren der Kardiomyozyten. Sowohl $\beta 1$ - als auch $\beta 2$ -Rezeptoren werden in Ventrikelmyozyten exprimiert, wobei der $\beta 1$ -Rezeptor den vorherrschenden Rezeptorsubtyp vertritt (Hoffman and Lefkowitz, 1982). Im Ventrikel liegt das $\beta 1$: $\beta 2$ -Verhältnis bei etwa 80:20% (Brodde, 1991). Die β -adrenergen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Sowohl $\beta 1$ - als auch $\beta 2$ -Rezeptoren sind G_s -gekoppelt. Bei ihrer Stimulierung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase führt, welche wiederum den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert. Am Ende dieser Kaskade wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die über eine Phosphorylierung der Ca-regulierenden Proteine deren Eigenschaften modulieren kann (Wallukat, 2002). Im Speziellen kommt es dadurch im Ventrikelmyozyten zu einem erhöhten Ca-Einstrom und SR-Ca-Freisetzung, was in einer stärkeren Kontraktion resultiert (positiv inotrop) und zu einem schnelleren Abfall des CaT, was mit einer schnelleren Relaxation einhergeht (positiv lusitrop) (Bers, 2002). Neben der Modulation durch die PKA können die Ca-regulierenden Proteine auch über die Ca-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) reguliert werden. Bei erhöhten Ca-Konzentrationen, die bei Sympathikusaktivierung generiert werden, kann die CaMKII über den Ca-Sensor Calmodulin aktiviert werden und ihrerseits zur Aktivierung und Phosphorylierung der Ca-regulierenden Proteine beitragen. Die Effekte von PKA und CaMKII sind dementsprechend synergistisch (Bers, 2008).

Hinsichtlich dem initialen Ca-Einstrom über $\text{Ca}_v1.2$ können β -adrenerge Agonisten (via cAMP und PKA) die Amplitude des Stroms $I_{\text{Ca,L}}$ erhöhen und die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals hin zu negativeren Potentialen E_m verschieben (Bers, 2008). Hierbei wird allerdings kontrovers diskutiert, welche Phosphorylierungsstellen in der $\alpha1C$ - oder in der $\beta2$ -Untereinheit des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals für diesen Effekt verantwortlich zu machen sind. Postuliert wurden hierfür unter anderem die Aminosäuren Serin (Ser) 1700 (Fu et al., 2014), Threonin (Thr) 1704 (Fuller et al., 2010) und Serin 1928 (Hulme et al., 2006) in der $\alpha1C$ -Untereinheit und die Aminosäuren Serin 478 und Serin 479 in der $\beta2$ -Untereinheit (Bünemann et al., 1999). In einer anderen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass alle bisher angenommen Phosphorylierungsstellen der beiden Untereinheiten für diesen Effekt entbehrlich sind (Katchman et al., 2017; Liu et al., 2020). Die Interaktion zwischen der $\alpha1C$ - und der $\beta2$ -Untereinheit scheint allerdings eine essentielle Rolle für die β -adrenerge Stimulierung des Kanals zu spielen (Yang et al., 2019). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass ein unbekanntes Protein im Bereich des $\text{Ca}_v1.2$ -Proteinkomplexes Ziel der PKA-Phosphorylierung ist und die Aktivität des Kanals, ähnlich der PLB – SERCA-Interaktion, reguliert (Liu et al., 2020). Einigkeit besteht allerdings darin, dass die PKA einen positiv-inotropen Effekt über die Stimulierung der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle vermittelt, auch wenn es hierbei bezüglich des genauen Mechanismus noch der Klärung bedarf.

Die Ryanodinrezeptoraktivität kann sowohl über Phosphorylierung durch die PKA als auch die CaMKII reguliert werden. Die Aminosäure Serin 2809 wird dabei von der PKA phosphoryliert (Marx et al., 2000), Serin 2815 von der CaMKII (Wehrens et al., 2004). Nach β -Rezeptoraktivierung wird die Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 und damit die SR-Ca-Freisetzung erhöht, was wiederum in einer höheren CaT-Amplitude und einem positiv-inotropen Effekt resultiert (Kockskämper, 2016). Im RyR2 der Ratte sind die jeweiligen Phosphorylierungsstellen um eine Aminosäure (Ser 2808, Ser 2814) verschoben (Huke and Bers, 2008).

Für die Aufrechterhaltung eines positiv-inotropen Effektes bedarf es neben einer erhöhten SR-Ca-Freisetzung ebenfalls eines schnelleren Zurückpumpens des Ca in das SR, damit für die folgende Freisetzung wieder genügend Ca zur Verfügung steht. Andernfalls würde der SR-Ca-Gehalt mit der Zeit abnehmen und der positiv-inotrope Effekt verloren gehen. Demzufolge geht ein positiv-inotroper Effekt stets Hand-in-Hand mit einem positiv-lusitropen Effekt. Der positiv-lusitrope Effekt der PKA wird über die Phosphorylierung von PLB vermittelt. Wie zuvor

erwähnt, dissoziiert PLB in phosphoryliertem Zustand von der SERCA ab und befreit diese von ihrer Inhibition. In vivo kann PLB an Serin 16 von der PKA und an Threonin 17 von der CaMKII phosphoryliert werden (Wegener et al., 1989). Die nun enthemmte SERCA trägt den hauptsächlichen Anteil an den schnelleren Abfallzeit-Kinetiken der CaT und der schnelleren Relaxationsgeschwindigkeit. Einen weiteren Beitrag zum positiv-lusitropen Effekt nach Sympathikusaktivierung spielt die PKA-abhängige Phosphorylierung der Myofilamente, genauer gesagt der Phosphorylierung an TnI. Grund hierfür sind schnellere Abdissoziationskinetiken des Ca von den Myofilamenten nach Phosphorylierung (Bers, 2002).

Als Gegenspieler des Sympathikus kann der Parasympathikus mittels des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) über die muskarinischen M₂-Rezeptoren den sympathischen Effekten am Herzen entgegenwirken. Allerdings ist die parasympathische Innervation supraventrikulär stärker ausgeprägt als in den Ventrikeln und daher ergeben sich die Hauptwirkungen am Herzen auf die Frequenz (negativ chronotrop) und die Erregungsleitung (negativ dromotrop) (Dhein et al., 2001).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das *CACNA1C*-Gen und Varianten desselben sind zentral mit Krankheitsbildern verknüpft, die sowohl die Psyche als auch das Herz betreffen. Zudem ist der vom Gen codierte $Ca_v1.2$ -Kanal die wichtigste Isoform im Herzen und dort für den initialen Ca-Einstrom verantwortlich. Trotz dieser Zusammenhänge wurde das *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell bisher nicht auf Ebene des Herzens untersucht.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher eine Charakterisierung des kardialen Phänotyps im *Cacna1c*^{+/-}-Modell mit Hauptaugenmerk auf der Ca-Regulation und der daran beteiligten Proteine in ventrikulären Kardiomyozyten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der heterozygote Knockout des Gens in einem Phänotyp auf Verhaltenesebene resultiert, der mit erhöhter Ängstlichkeit und sozialen Verhaltensdefiziten der Tiere einhergeht. Erhöhte Stresslevel äußern sich physiologisch in einer erhöhten Sympathikusaktivierung, die wiederum einen direkten Einfluss auf das Herz nach sich zieht. Daher schlossen wir an die Charakterisierung der Ca-Regulation unter basalen Bedingungen Untersuchungen in Ventrikelmiozyten an, bei denen eine erhöhte Sympathikusaktivierung im Herzen nachgeahmt wurde.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit widmete sich also der grundlegenden Charakterisierung des *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodells unter basalen Bedingungen, wobei jeweils *Cacna1c*^{+/-}-Tiere mit ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern verglichen wurden. Im zweiten Teil wurde der Einfluss von Stress, im Sinne einer erhöhten Sympathikusaktivierung, auf die Ca-Regulation von Wildtyp (WT) und *Cacna1c*^{+/-}-heterozygoten Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene untersucht.

Die Hauptziele dieser Studie waren:

1. Eine basale Charakterisierung des Rattenmodells auf kardiovaskulärer Ebene im Sinne von in vivo Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz.
2. Der Vergleich basaler elektrisch-stimulierter CaT zwischen WT- und *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikeldomyozyten mit Untersuchung der intrazellulären Ca-Regulation und des SR-Ca-Gehalts.
3. Eine Proteinexpressionsanalyse der wichtigsten Ca-regulierenden Proteine und ihrer PKA- und CaMKII-abhängigen Phosphorylierung in linksventrikulärem Myokard der Tiere.
4. Die Untersuchung der intrazellulären Ca-Regulation und des SR-Ca-Gehalts elektrisch stimulierter CaT unter dem Einfluss sympathischen Stresses mithilfe des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (ISO).
5. Die Aufklärung möglicher Mechanismen die zu Unterschieden in der Ca-Regulation unter gestressten Bedingungen führen.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche haploinsuffiziente *Cacna1c*^{+/-}-Sprague-Dawley Ratten (*Cacna1c*^{+/-}, +/-) und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister (*Cacna1c*^{+/+}, +/+, WT) im Alter von 9-15 Monaten untersucht. Die Ratten wurden in einem Versuchsvorhaben von der AG Dr. Markus Wöhr (FB Psychologie; MR20/35 Nr. 19/2014; DFG-FOR2107) gezüchtet und an uns weitergegeben. Für in-vivo-Blutdruckmessungen wurden die lebenden Tiere verwendet, für alle weiteren Experimente wurden die Tiere vor der Herzentnahme mit Isofluran betäubt und anschließend mit einer Guillotine dekapitiert. Die Versuchsvorhaben inklusive der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach §4 (3) TSchG wurden den Tierschutzbeauftragten angezeigt, von ihnen genehmigt (AK-3-2017-Kockskämper; AK-2-2018-Kockskämper; AK-16-2020-Kockskämper) und verliefen in Übereinstimmung mit der Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

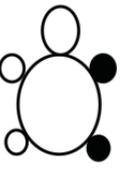
2.1.1 Erzeugung des heterozygoten Knockouts des *Cacna1c*-Gens

Der Knockout eines Allels des *Cacna1c*-Gens wurde von SAGE Labs (jetzt Horizon Discovery Ltd, UK) durchgeführt. Hierbei wurde mittels Zinkfinger-Nuklease-Technik eine Deletion von vier Basenpaaren (460649bp – 460652bp) im Exon 6 des Gens herbeigeführt. Diese Deletion von vier Basenpaaren führt zu einer Rasterverschiebung in der mRNA, welche in einem frühen Stoppcodon im Exon 6 resultiert. Eine vollständige Translation des Proteins ist somit nicht mehr möglich. Die haploinsuffizienten Tiere wurden anschließend in der AG Wöhr weiterverpaart und gezüchtet. Der Knockout wurde nach einem vorher etablierten Protokoll (Geurts et al., 2009) in Tieren der Linie Sprague-Dawley erzeugt.

2.1.2 Pfotenmarkierungssystem

Alle Versuche, mit Ausnahme der Western-Blot-Untersuchungen, wurden verblindet durchgeführt. Nach der Überführung der Ratte aus dem Tierstall in unser Labor wurden dafür zunächst die Pfotenmarkierungen überprüft und dokumentiert. Anhand der Tabelle (Tabelle 2-1) ist ersichtlich, inwiefern die Tätowierungen der Pfoten für eine Nummer codieren. Diese Tiernummer wurde kombiniert mit der Nummer des Käfigs, aus dem das jeweilige Tier stammte. Nach Abschluss der Versuche fand die Entblindung statt und die notierten Nummern konnten den jeweiligen Genotypen zugeordnet werden. Zusätzlich wurde bei den meisten Tieren ein Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und bei -20°C gelagert. Nach Abschluss einer Versuchsreihe fand im Sinne einer doppelten Bestätigung eine erneute Genotypisierung dieser Gewebeprobe statt.

Tabelle 2-1: Pfotenmarkierungssystem Bauchansicht (*ventral*)

| | | | |
|---|---|---|---|
|  P1 |  P2 |  P3 |  P4 |
|  P5 |  P6 |  P7 |  P8 |
|  P9 |  P10 |  P11 |  P12 |
|  P13 |  P14 |  P15 |  P16 |

2.2 In-vivo Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen

Die Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen wurden mit einem nicht invasiven CODA™ Tail-cuff-System von Kent Scientific (USA) durchgeführt. Für die Versuche wurden die Ratten in eine ihrer Größe entsprechenden Haltevorrichtung gelockt (*CODA™ Animal Holders*), die anschließend von hinten verschlossen wurde, so dass nur der Schwanz herauschaute. Anschließend wurde die Ratte in der Haltevorrichtung auf einer CODA™-Wärmeplattform platziert und der Schwanz zusätzlich mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Die Erwärmung war wichtig, um die Durchblutung und damit das Blutvolumen in der Schwanzarterie zu erhöhen. Bei zu geringer Schwanzdurchblutung konnte das Setup keine Blutdruckwerte erfassen. Als nächstes wurde eine Verschlussmanschette (*Occlusion Cuff*) bis zur Schwanzwurzel des Tieres geschoben und distal von dieser eine Volumen-Druck-Sensor-Manschette (*Volume-pressure-recording Cuff*) angelegt. Die Verschlussmanschette wurde über Luftdruck vom System aufgeblasen und okkludierte so den Blutfluss in der Schwanzarterie. Durch langsames Luftablassen der Manschette wurde der Druck auf die Schwanzarterie allmählich reduziert. War der systolische Blutdruck größer als der Druck in der Verschlussmanschette, so konnte Blut fließen und die Sensormanschette den systolischen Blutdruck erfassen. Bedingt durch Systole und Diastole des Herzens kommt es zu einer periodischen Schwankung des Blutdrucks. Mittels dieser konnte die Herzfrequenz ermittelt werden. An dem Punkt, an dem der Druck der Verschlussmanschette den diastolischen Blutdruck unterschritt, war dieser Puls nicht mehr wahrnehmbar. An dieser unteren Grenze wurde der diastolische Blutdruck ermittelt (Malkoff, 2005). Über einen Computer mit CODA™ Database-Software konnte das Messgerät angesteuert und die Messergebnisse gespeichert werden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Bewegung oder Aufregung der Ratten zu vermeiden, wurden mindestens zehn Zyklen von Okklusion und anschließender Blutdruckmessung durchgeführt und deren Ergebnisse anschließend gemittelt.

2.3 Chemische Substanzen und Lösungen

Die meisten verwendeten Substanzen wurden entweder von Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Für alle verwendeten Substanzen werden im Weiteren die Firmen im Text oder in den zugehörigen Tabellen genannt. Alle im Labor selbthergestellten Lösungen oder Puffer wurden mit demineralisiertem Reinstwasser Typ 1 (ddH₂O), gefiltert durch ein Milli-Q™ Reference A⁺ System (Merck Millipore), hergestellt. Für alle benutzten Substanzen und Lösungen wurde auf eine spezifische und sachgerechte Lagerung geachtet (Aufbewahrung im Sicherheitsschrank bei Raumtemperatur, im Kühlschrank bei +8°C oder gefroren im -20°C- bzw. im -80°C-Gefrierschrank).

2.3.1 Pharmakologische Substanzen

2.3.1.1 Koffein

Koffein ist chemisch gesehen ein dreifach-methyliertes Xanthin und gehört zu den Purinalkaloiden. Gemeinhin bekannt ist die Substanz als stimulierendes Genussmittel, welches in der Kaffeebohne, dem Teestrauch und vielen weiteren Pflanzen natürlich vorkommt (Fredholm, 2011).

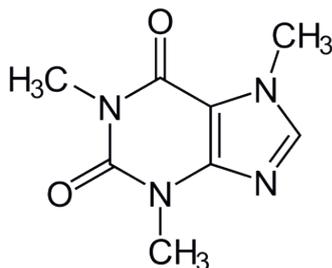


Abbildung 2-1: Strukturformel Koffein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substanz verwendet, um in isolierten Myozyten eine schlagartige Freisetzung des Ca aus den intrazellulären Calciumspeichern hervorzurufen. In einer supraphysiologischen Konzentration von 10-20 mM ist Koffein in der Lage, an die RyR2, die in der Membran des SR lokalisiert sind, zu binden und diese zu öffnen (Kong et al., 2008). Daraufhin kommt es zu einer spontanen Entleerung der SR-Calciumspeicher. Mit dieser

Methode können Rückschlüsse auf den Gesamtgehalt an Ca im SR einer Zelle gezogen werden. Weiterhin kann analysiert werden, welcher Anteil des SR-Ca-Gehalts bei einem elektrisch stimulierten CaT freigesetzt wird (= fraktionelle Ca-Freisetzung).

Dafür wurde eine 20 mM Koffeinlösung (Tabelle 2-2) hergestellt (Koffein; CAS-Nr.: 58-08-2; Best.-Nr.: 27600-100G, Sigma). Mittels einer Bolusapplikation wurde die Koffeinlösung in die Messkammer pipettiert. Das Kammervolumen entsprach dabei dem Applikationsvolumen, so dass sich eine Endkonzentration von 10 mM Koffein in der Messkammer ergab.

Tabelle 2-2: Koffeinlösung

| Koffein | Messlösung | Konzentration |
|----------|------------|---------------|
| 38.83 mg | 10 ml | 20 mM |

2.3.1.2 Isoprenalin

Isoprenalin oder auch Isoproterenol ist ein Derivat des Noradrenalins und damit ein Wirkstoff aus der Gruppe der Sympathomimetika. Chemisch gesehen gehört es zu den Phenylalkylaminen und entspricht einem am Stickstoff isopropylierten Noradrenalin.

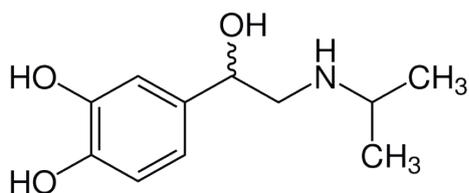


Abbildung 2-2: Strukturformel Isoprenalin

Im Gegensatz zu Noradrenalin, welches eine hohe Affinität für α -Rezeptoren besitzt, wirkt Isoprenalin nahezu ausschließlich an β -Adrenozeptoren. Dafür verantwortlich ist der Isopropylrest der Substanz. Am Herzen wirkt diese Substanz als Agonist an den β -Rezeptoren also stimulierend, d.h. positiv-chronotrop, -dromotrop, -inotrop und -lusitrop (Elliott, 1966). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ganze Herzen am Langendorff-System sowie isolierte Kardiomyozyten am Konfokalmikroskop mit der Substanz behandelt.

Die Isoprenalinlösungen (Tabelle 2-3) wurden jeweils am Tag des Versuches frisch hergestellt. Dafür wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 1 mM hergestellt, aus der alle weiteren Lösungen hergestellt wurden. Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Substanz wurde Isoprenalin (Isoprenalin-HCl; Best.-Nr.: I5627-5G, Sigma-Aldrich) nach dem Abwiegen in einer Ascorbinsäurelösung (5 mM) gelöst und unter Lichtausschluss dunkel gelagert.

Tabelle 2-3: Isoprenalinlösungen

Stammlösung Isoprenalin

| | Isoprenalin-HCl | 5 mM Ascorbinsäure | Konzentration |
|-------------|-----------------|--------------------|---------------|
| Stammlösung | 1 mg | 4 ml | 1 mM |

Isoprenalinlösungen

| | 1 mM Stammlösung | Messlösung (ad) |
|--------------------|------------------|-----------------|
| 100 nM Isoprenalin | 10 µl | 100 ml |
| 1 µM Isoprenalin | 100 µl | 100 ml |

Folgende Lösungen wurden aus der 1 µM Isoprenalinlösung hergestellt:

| | 1 µM Isoprenalinlösung | Messlösung (ad) |
|-------------------|------------------------|-----------------|
| 1 nM Isoprenalin | 100 µl | 100 ml |
| 3 nM Isoprenalin | 300 µl | 100 ml |
| 10 nM Isoprenalin | 1 ml | 100 ml |
| 30 nM Isoprenalin | 3 ml | 100 ml |

2.3.1.3 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein irreversibler Hemmstoff der SERCA sowie ein Tumor-Promotor in Säugetierzellen. Thapsigargin ist ein Sekundärmetabolit des Doldenblütlers *Thapsia garganica*, der seinen Hauptverbreitungsraum rund um das Mittelmeer hat. Chemisch gesehen handelt es sich bei Thapsigargin um ein Sesquiterpenlacton.

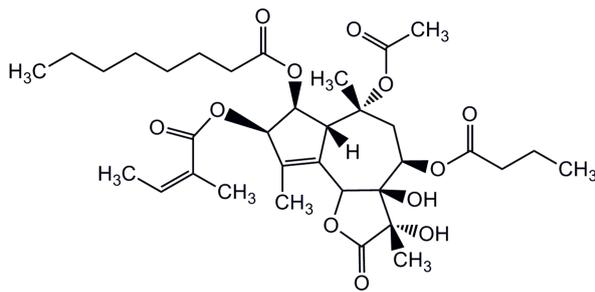


Abbildung 2-3: Strukturformel Thapsigargin

Im Rahmen der Arbeit wurde die Eigenschaft von Thapsigargin nutzbar gemacht, als nicht-kompetitiver, irreversibler Hemmstoff der SERCA deren Aktivität in Kardiomyozyten zu inhibieren (Rogers et al., 1995).

Für die Thapsigarginlösungen (Tabelle 2-4) wurde zunächst die Substanz (Thapsigargin - high purity; CAS-Nr.:67526-95-8; Best.-Nr.: AG-CN2-0003, Biomol, Deutschland) in DMSO gelöst und anschließend mit ddH₂O verdünnt, so dass sich Aliquots der Konzentration 0.5 mM ergaben. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Am Messtag wurde die 1 µM Thapsigargin-Messlösung aus den Aliquots frisch hergestellt.

Tabelle 2-4: Thapsigarginlösungen

Thapsigargin Stammlösung

| | ddH ₂ O | Konzentration |
|-------------------|--------------------|---------------|
| 5 mg Thapsigargin | 15.38 ml | 0.5 mM |

Thapsigargin-Messlösung

| 0.5 mM Thapsigargin | Messlösung | Konzentration |
|---------------------|------------|---------------|
| 200 µl | 100 ml | 1 µM |

2.4 Herzentnahme

Vor der Herzentnahme wurden die Ratten durch Inhalation von Isofluran (FORENE® 100% (V/V), AbbVie, Deutschland) in einer Styroporbox betäubt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch ein Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes der Ratte bestätigt. Hierbei wurde mit einer chirurgischen Pinzette in den Mittelfuß der Hinterpfote gezwickt. Bei noch positivem Reflex bewegte das Tier ruckartig das Bein nach hinten. War dieser Reflex nur noch schwach vorhanden oder blieb vollständig aus, sprach das für eine ausreichende Narkosetiefe. Das anästhesierte Tier wurde dann gewogen und im Anschluss mithilfe einer Guillotine dekapitiert. Der in Rückenlage fixierten Ratte wurde nun der Bauchraum eröffnet, das Diaphragma durchtrennt und zuletzt der Thorax geöffnet und die Rippen durchtrennt. Im eröffneten Thorax wurde das Herz von Lungen und Gefäßen freipräpariert. Als letzter Schritt wurden die arteriellen und venösen Gefäßstiele (Porta venosa und Porta arteriosa) durchtrennt und das Herz in eine Petrischale mit eisgekühlter Kardioplegielösung überführt. Für die Untersuchung von Herzgewebe wurden an dieser Stelle die Kammern des Herzens getrennt und separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Dafür wurden zunächst die Vorhöfe des Herzens abgetrennt und anschließend die Kammern entlang der Herzscheidewand voneinander separiert.

Für die Isolation von Myozyten und auch der Isoprenalinbehandlung ganzer Herzen fand an dem sich in der Kardioplegielösung befindenden Herzen an dieser Stelle die Kanülierung der Aorta mit anschließender Anbringung an die Langendorff-Apparatur statt, welche nachfolgend erläutert werden soll.

2.5 Isolation von Ventrikelmyozyten

Die Technik zur Gewinnung von qualitativ hochwertigen Myozyten mithilfe einer Langendorff-Apparatur ist eine in unserer Arbeitsgruppe gut etablierte Methode, die regelmäßig durchgeführt wird. Sie stellt einen maßgeblichen Teil der Forschung dieser Arbeit dar. Im Folgenden sollen die Prinzipien der retrograden Herzperfusion, das Myozyten-Isolationsverfahren, sowie die Zusammensetzung und Aufgabe der dafür eingesetzten Lösungen erläutert werden.

2.5.1 Retrograde Herzperfusion an der Langendorff-Apparatur

Die Anfänge der Methodik gehen auf die erste Perfusion von Säugetierherzen im Jahre 1846 durch Carl Ludwig zurück. Weiterentwickelt wurde diese Technik von dem deutschen Physiologen Oscar Langendorff, der im Jahre 1895 die Methode der retrograden Aortenperfusion an der nach ihm benannten Langendorff-Apparatur etablierte (Zimmer, 1998). Bei dieser Methode wird eine Kanüle in den aufsteigenden Teil der Aorta (*Aorta ascendens*) eines frisch exzidierten Herzens eingeführt und dieses entgegengesetzt (retrograd) des natürlichen Blutflusses mit einer physiologischen Pufferlösung perfundiert. Im Folgenden soll auf die anatomischen Grundlagen dieser Technik eingegangen werden, um das Prinzip verständlich zu machen.

Im Herzen *in vivo* wird das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf über die obere und untere große Hohlvene (*Vena cava superior/inferior*) im rechten Vorhof gesammelt. Von hier gelangt das Blut über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel, der das Blut dann über die Pulmonalklappe und den *Truncus pulmonalis* in den Lungenkreislauf pumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Das nun sauerstoffreiche Blut gelangt über die vier Pulmonalvenen (*Venae pulmonales*) zunächst in den linken Vorhof und von dort über die Mitralklappe in den linken Ventrikel. In der Ventrikelsystole gelangt das Blut nun aus dem linken Ventrikel über die Aortenklappe zunächst in den aufsteigenden Teil der Aorta (*Aorta ascendens*), der in den Aortenbogen (*Arcus aortae*) übergeht und über den absteigenden Teil (*Aorta descendens*) weiter in den Körperkreislauf. Diejenigen Gefäße, die das Herz selbst mit

Sauerstoff versorgen (*Vasa privata*), sind die Koronararterien. Die Eintrittsstellen der rechten und linken Koronararterie (*Arteria coronaria dextra/sinistra*) liegen in der Aorta direkt oberhalb der Aortenklappe. In der Diastole des Herzens drückt die Blutsäule aus dem Körperkreislauf auf die Aortenklappe und verschließt diese. In dieser Phase kann das Blut nun in die Herzkranzgefäße fließen und das Herz unter anderem mit Sauerstoff versorgen. Die Koronarvenen, die ebenfalls zu den *Vasa privata* des Herzens gehören, sammeln das sauerstoffarme Blut und führen es durch die Mündungsstelle des *Sinus coronarius* (*Ostium sinus coronarii*) zurück in den rechten Vorhof, von wo aus der Kreislauf von vorne beginnt. Durch diese Erläuterung des Blutflusses im Herzen wird das Prinzip der retrograden Perfusion am Langendorff-System verständlich.

Das kanülierte Herz wurde an das Langendorff-System angeschlossen und mittels einer Peristaltikpumpe kontinuierlich mit einer oxygenierten, isohydrischen, isotonischen Pufferlösung (siehe Tyrode-Lösung) perfundiert. Mittels eines Wasserbadsystems wurde die Pufferlösung bei Durchlaufen des Langendorff-Systems auf 37°C erwärmt. Durch die oben genannte retrograde Perfusion blieb die Aortenklappe aufgrund des Flüssigkeitsdrucks verschlossen und der Puffer perfundierte die Koronargefäße des Herzens. Über die Koronarvenen gelangte der Puffer zurück in den rechten Vorhof. Von dort konnte dieser das Herz entweder über die Hohlvenen oder über den rechten Ventrikel und die abgeschnittene Lungenarterie verlassen. (Bell et al., 2011)

Diese grundlegende Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit für zwei Versuchsdurchführungen angewendet. Zum einen für die Gewinnung isolierter Kardiomyozyten, mittels Perfusion des Herzens mit einer Enzymlösung, zum anderen für die Isoprenalinbehandlung ganzer Herzen zwecks anschließender Western-Blot-Untersuchungen des Gewebes.

2.5.2 Lösungen für die Zellisolierung

2.5.2.1 Tyrode-Lösung

Eine Tyrode-Lösung ist eine Lösung von Elektrolyten in physiologischer Zusammensetzung in Wasser. Der Name dieser Lösung geht auf den Pharmakologen Maurice Tyrode zurück. In unserem Labor wurde eine leicht modifizierte Tyrode-Lösung (Tabelle 2-5) verwendet, auf der alle weiteren Isolations- und Messlösungen basierten (Tabelle 2-6). Die Lösung wurde jeweils zu Beginn der Woche frisch hergestellt und bis zur Verwendung im +8°C-Kühlschrank aufbewahrt. Wie bereits erwähnt, hatte dieser Basispuffer die Aufgabe, physiologische Elektrolyt- und pH-Bedingungen nachzuahmen. Hierzu wurde der physiologische pH-Wert von 7.4 mit 1 M NaOH eingestellt und durch ein Puffersystem bestehend aus NaH_2PO_4 und HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure] aufrechterhalten.

Tabelle 2-5: Standard Tyrode-Lösung (1 l)

| Substanz | Einwaage/ Menge | Endkonzentration | Firma |
|---|-----------------|------------------|-------|
| NaCl | 7.597 g | 130 mM | Roth |
| 1M KCl | 5.4 ml | 5.4 mM | Roth |
| 1 M MgCl_2 | 0.5 ml | 0.5 mM | Sigma |
| 0.33 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 1 ml | 0.33 mM | Roth |
| HEPES | 5.958 g | 25 mM | Roth |
| Glucose x H_2O | 4.356 g | 22 mM | Roth |

Einstellung der Lösung auf pH 7.4 mit 1 M NaOH

2.5.2.2 Isolationslösungen

Tabelle 2-6: Lösungen für die Zellisolation

| Lösung | Tyrode-Lösung | Substanz | Menge | Endkonzentration | Firma |
|---------------------------|---|---|-----------|------------------|-------------|
| Kanülierungslösung | 250 ml | 1 M CaCl ₂ | 37.5 µl | 0.15 mM | Sigma |
| | | 5000 I.E./ml Heparin-Na ⁺ | 100 µl | 2 U/ml | Roth |
| Kardioplegielösung | 98 ml Kanülierungs- lösung (s.o.) | 1 M KCl | 2 ml | 20 mM | Roth |
| Calciumfreie Lösung | 50 ml | 100 mM EGTA | 200 µl | 0.4 mM | Roth |
| | | BDM | 50 mg | 1 mg/ml | Roth |
| | | 5000 I.E./ml Heparin-Na ⁺ | 20 µl | 2 U/ml | Roth |
| Enzymlösung | 50 ml | Kollagenase Typ-2 (~300 U/mg) | 30 mg | 180 U/ml | Worthington |
| | | Protease Typ XIV | 2.5 mg | 0.05 mg/ml | Sigma |
| | | 1 M CaCl ₂ | 10 µl | 0.2 mM | Sigma |
| | | BDM | 50 mg | 1mg/ml | Roth |
| Stopp-Lösung | 15 ml | 1 M CaCl ₂ | 7.5 µl | 0.5 mM | Sigma |
| | | BDM | 15 mg | 1 mg/ml | Roth |
| | | BSA | 30 mg | 2 mg/ml | Roth |
| 1 mM Calcium- lösung | 15 ml | 1 M CaCl ₂ | 15 µl | 1 mM | Sigma |
| | | BSA | 30 mg | 2 mg/ml | Roth |
| 1.5 mM Calcium- lösung | 100 ml | 1 M CaCl ₂ | 150 µl | 1.5 mM | Sigma |

2.5.2.3 Kardioplegielösung

Nach der Exzision des Herzens aus dem Thorax der Ratte wurde das Herz zunächst in eine Petrischale mit Kardioplegielösung (Tabelle 2-6) überführt. Die Lösung war dabei kalt und die Petrischale stand auf Eis. Des Weiteren wurde die Lösung vor Überführung des Herzens mit reinem Sauerstoff oxygeniert. Die kardioplege Lösung zeichnet sich durch eine hohe Kaliumkonzentration (20 mM) aus, die weit über der physiologischen Extrazellularkonzentration von Kalium (3.5-5 mM) liegt. Die hohe Kaliumkonzentration verschiebt das Ruhemembranpotential des Herzens in einen positiveren Bereich. In der Folge können die Zellen nach einer Depolarisation nicht mehr so weit repolarisieren, dass die spannungsabhängigen Natriumkanäle wieder in einen aktivierbaren Zustand gelangen. Infolgedessen ist das Myokard nicht wieder erregbar und das Herz funktionell gelähmt (*Kardioplegie*). Diesen Zustand macht man sich zunutze, um die Aorta zu kanülieren und das Herzgewebe vor einem zu hohen Energieverbrauch und dadurch bedingten ischämischen Ereignissen zu schützen (Carvajal et al., 2020; Melrose et al., 1955).

2.5.2.4 Kanülierungslösung

Zunächst wurde das sich in der Kardioplegielösung befindende Herz kanüliert und die Aorta auf der Kanüle festgeknotet. Aufgabe der Kanülierungslösung (Tabelle 2-6) war es, die Koronargefäße des Herzens zu durchspülen und von restlichem Blut zu befreien. Der Zusatz von Heparin in der Lösung wirkte der Gefahr von Thrombenbildung entgegen. Bei der Durchspülung des Herzens mit der calciumhaltigen Kanülierungslösung wurde die Herzlähmung wieder aufgehoben und das Herz begann zu kontrahieren. Diese Kontraktion war wichtig für eine zusätzliche Entleerung von Restblut. Die Kanülierungslösung wurde vor der Verwendung ebenfalls oxygeniert.

2.5.2.4 Calciumfreie Lösung

Nach der Kanülierung und Durchspülung der Koronararterien wurde das Herz an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Hier wurde das Herz zunächst mit calciumfreier Lösung perfundiert (Tabelle 2-6). Die Calciumfreiheit der Lösung wurde durch Zusatz des Chelatbildners EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), welcher noch eventuell vorhandene Calciumionen abfängt, sichergestellt. Weiterhin enthielt die Lösung BDM (Diacetylmonoxim). Bei BDM handelt es sich chemisch gesehen um ein Oxim. Oxime können als nicht-spezifische Phosphatase agieren und so zu einer Dephosphorylierung der Calcium-regulierenden-Proteine des Herzens führen. Desweiteren schützt BDM das Myokard vor Schäden, in dem es durch eine reversible Hemmung der myofibrillaren ATPase die Kontraktion des Herzens verringert und so den Energieverbrauch geringhält (Adams et al., 1998; Sellin and McArdle, 1994). Hauptaufgabe der calciumfreien Lösung war es, die Myozyten auf Ebene der Glanzstreifen, welches mechanische Zell-Zell-Verbindungen sind, voneinander zu trennen (Plačkić and Kockskämper, 2018). Wichtig war bei der Perfusion mit calciumfreier Lösung außerdem, dass eine Perfusionsdauer von etwa vier Minuten nicht überschritten wurde (Plačkić and Kockskämper, 2018). Eine längeranhaltende Ca-Depletion im Gewebe mit anschließender Wiederaufnahme von extrazellulärem Ca kann zu Schäden der Herzmuskelzellen führen, was gemeinhin als Calcium-Paradox beschrieben wird (Powell, 1983). Die calciumfreie Lösung enthielt Heparin und wurde ebenfalls oxygeniert.

2.5.2.5 Enzymlösung

Im Anschluss an die calciumfreie Lösung wurde das Herz mit der Enzymlösung perfundiert (Tabelle 2-6). Hauptbestandteil dieser Lösung waren die Enzyme Kollagenase Typ 2 sowie in geringerer Konzentration Protease Typ XIV. Beide Enzyme stellen jeweils eine Mischung aus verschiedenen Enzymen dar. Aufgabe der Enzyme war es, die Kardiomyozyten aus dem Kollagenverband und der extrazellulären Matrix herauszulösen, sowie Zell-Zell-Kontakte aufzubrechen. Der Verdau des Herzens mittels Enzymlösung dauerte etwa 45-60 Minuten. Dabei war die Dauer des enzymatischen Verdaus abhängig von der Größe des Herzens, sowie dem Alter des Tieres. Mit höherem Alter geht unter anderem auch ein höherer Fibrosegrad des Herzens einher, was die benötigte Zeit für den Verdau verlängert. Die Enzymlösung

enthielt nun wieder Ca, welches als Cofaktor für die Enzyme fungiert, sowie BDM. Die Lösung wurde ebenfalls oxygeniert.

2.5.2.6 Stopp-Lösung

Nach Abschluss des enzymatischen Verdau, wurden die Ventrikel des Herzens in kleine Stücke geschnitten und in die Stopp-Lösung (Tabelle 2-6) überführt. Aufgabe der Stopp-Lösung war es, die Aktivität der Enzyme zu hemmen, damit diese nicht die Membran der nun isoliert vorliegenden Ventrikelmyozyten angreifen konnten. Realisiert wurde dies durch Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA). Im Überschuss vorliegend sättigte BSA die noch vorhandenen Enzyme ab. Die Stopp-Lösung enthielt BDM und wurde vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.5.2.7 Calciumlösungen

Nach der Überführung in die Stopp-Lösung wurde die Myozytensuspension durch ein Sieb gegeben und im Anschluss die Calciumkonzentration schrittweise auf 1.5 mM $[Ca^{2+}]$ angehoben. Dafür wurde nach Sedimentation der Myozyten zunächst die überschüssige Stopp-Lösung (0.5 mM $[Ca^{2+}]$) abgenommen und durch 1 mM Calciumlösung (Tabelle 2-6) ausgetauscht. Auch die 1 mM Calciumlösung enthielt BSA. Nun wurde den Zellen etwa zehn Minuten Zeit für die Adaptation an die höhere Calciumkonzentration gegeben. Anschließend wurde der Überstand der 1 mM Calciumlösung durch die 1.5 mM Calciumlösung ausgetauscht. Eine schonende Adaptation an die Calcium-Endkonzentration war hierbei entscheidend, um eine hohe Ausbeute vitaler Ventrikelmyozyten zu erreichen.

2.5.3 Isolationsverfahren der Ventrikelmyozyten

Im Folgenden soll das Verfahren zur Gewinnung isolierter Myozyten beschrieben werden. Die Ausführungen ergänzen sich mit den bereits genannten Funktionen der einzelnen Isolationslösungen.

Nach Anästhesierung und Dekapitation des Tieres fand, wie bereits beschrieben, die Herzentnahme statt, bei der das Herz in eine Petrischale mit eisgekühlter Kardioplegielösung überführt wurde. In dieser Lösung, in der sich das Herz im Stadium der Herzlähmung befand, wurde die Kanüle in die Aorta eingeführt und diese mit chirurgischem Faden festgeknotet. Wichtig hierbei war, die Kanüle nicht zu tief in die Aorta zu schieben, um die Aortenklappe nicht zu durchstoßen. Die Kanüle musste dabei oberhalb der Aortenklappe enden, damit bei verschlossener Klappe die Lösung ungehindert in die Koronararterien fließen konnte. Als nächstes wurde das Herz mit etwa zehn Milliliter Kanülierungslösung durchspült und von Blut befreit. In der dafür verwendeten Spritze durften sich keine Luftblasen befinden, um eine intravasale Luftembolie zu vermeiden. Entscheidend war außerdem die Zeitdauer von der Tötung des Tieres bis zur Kanülierung des Herzens, da bei zunehmender Dauer das Risiko für thrombotische Ereignisse stieg. Im Idealfall lag diese unter fünf Minuten. Das an der Kanüle befestigte Herz wurde im nächsten Schritt an das Langendorff-System (Abbildung 2-4) angeschlossen, welches zu diesem Zeitpunkt auf 37°C temperiert ①⑤ und mit oxygenierter Kanülierungslösung befüllt war. Nach Anbringen des Herzens an die Apparatur ⑥ wurde eine vierminütige Perfusion mit oxygenierter ④ calciumfreier Lösung ③ über die Peristaltikpumpe ② gestartet. Die Flussgeschwindigkeit der Perfusion betrug hierbei etwa 3 ml/min. Sobald die calciumfreie Lösung über das System im Herzen angekommen war, kamen die Kontraktionen des Herzens zum Erliegen. Im Anschluss an die calciumfreie Lösung erfolgte die Perfusion mit der Enzymlösung ③. Sobald die Enzymlösung im Herzen angekommen war, wurde das Organbad ⑦ von unten verschlossen, so dass es sich mit Enzymlösung füllen konnte und das Herz vollständig umgab. Die benötigte Dauer des enzymatischen Verdau war mit 45-60 Minuten variabel und wurde für jedes Herz individuell entschieden. Der Status des Verdau wurde optisch und haptisch überprüft. Kriterien hierfür waren ein blasser Herz, eine weichere Konsistenz sowie der allmähliche Formverlust des Herzens. Als zusätzliche Kontrolle wurde mit einer Pipette ein Tropfen Enzymlösung, der das Herz verlassen hatte, unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In diesem befanden sich bei ausreichendem Verdau bereits isoliert

vorliegende Myozyten. Die richtige Abschätzung des enzymatischen Verdau war entscheidend, um qualitativ hochwertige Zellen sowie eine hohe Ausbeute an lebenden Zellen zu erhalten. Bei einem zu kurzen Verdau werden die Zellen noch nicht ausreichend aus ihrem Verband gelöst, was mit einer geringen Ausbeute einhergeht. Bei zu langem Verdau leidet die Qualität der Zellen, denn hierbei können die Enzyme die Membran der Myozyten beschädigen.

Von dem ausreichend verdauten Herzen wurden dann die Ventrikel abgeschnitten und in ein Becherglas mit Stopp-Lösung überführt. In diesem wurden die Ventrikel mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und das Becherglas für einige Minuten auf eine Schüttelplattform gestellt, um ein weiteres Herauslösen der Myozyten aus dem Gewebeverband zu bezwecken. Im Anschluss wurde die Suspension durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 300 μm (Kobe, Marburg) gegeben. Nach Sedimentation der Zellen wurde der Überstand abpipettiert und durch 1 mM Calciumlösung ersetzt. Nach weiteren zehn Minuten wurde auch dieser Überstand wieder abpipettiert und durch 1.5 mM Calciumlösung ersetzt. Eine schrittweise und schonende Adaptation an die höheren Calciumkonzentrationen war ausschlaggebend für eine gute Zellausbeute. Die fertig adaptierte Zellsuspension mit der Endkonzentration von 1.5 mM Calcium konnte bei Raumtemperatur mehrere Stunden gelagert und verwendet werden (Plačkić and Kockskämper, 2018).



Abbildung 2-4: Langendorff-Apparatur

(1) Wasserbad, (2) Peristaltikpumpe, (3) Gefäß mit Perfusionslösung, (4) O₂-Zufuhr, (5) Spiralwärmetauscher, (6) Kanüle mit Herz, (7) temperierte Organbad-Kammer (Übernommen aus: (Kiess, 2019))

2.5.4 Ausplattieren der Ventrikelmyozyten

Kulturschälchen mit Glasboden (WillCo Wells, Niederlande) wurden zunächst für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lamininlösung [50 µg/ml] beschichtet. Laminin (Sigma-Aldrich, München) ist ein kollagenähnliches Glykoprotein, welches an Zellmembranen binden kann und so ein Anhaften der Myozyten an die Kulturschälchen bewirkt. Das überschüssige Laminin wurde abpipettiert und die Zellsuspension ausplattiert. Den Zellen wurde nun 20 Minuten Zeit gegeben, um an das Laminin anzuhafte, bevor die Beladung mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgte (siehe 2.6.3).

2.5.5 Isoprenalinbehandlung von Herzen an der Langendorff-Apparatur

An der Langendorff-Apparatur kann man auch ganze Herzen mit pharmakologischen Substanzen behandeln. Eine weitere Möglichkeit der Nutzung des Systems ist die Messung der Kontraktionskraft und Schlagfrequenz eines Herzens mittels eines in die Kammer eingeführten Ballonkatheters. Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Langendorff-System Herzen mit Isoprenalin (Tabelle 2-8) behandelt und deren Gewebe anschließend mittels Western Blot untersucht. Die Prozedur von der Herzextraktion über die Kanülierung bis hin zur Anbringung an die Langendorff-Apparatur war dabei identisch mit der bereits für das Myozytenisoliationsverfahren beschriebenen. Im Gegensatz zum Isoliationsverfahren wurde das Herz nun für fünf Minuten mit einer BDM-haltigen Lösung perfundiert (Tabelle 2-7), die der Kanülierungslösung mit Zusatz von BDM entsprach. BDM wurde zugesetzt, um als unspezifische Phosphatase die Phosphorylierungen der Ca-regulierenden-Proteine zu reduzieren und somit den Grundphosphorylierungszustand der Herzen weitgehend anzugleichen. Im Anschluss wurden die Herzen für fünf Minuten entweder mit einer Kontrolllösung oder mit einer Isoprenalinlösung (100 nM) behandelt. Nach der fünfminütigen Behandlung wurde das Herz abgenommen, die Vorhöfe abgetrennt, sowie der linke vom rechten Ventrikel separiert, in Kryotubes überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden im -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

Ziel dieser Isoprenalinbehandlungen war es, den Phosphorylierungsstatus (bzw. dessen Anstieg) der Ca-regulierenden-Proteine von Ventrikeln unter Kontroll- und Isoprenalinbedingungen im jeweiligen Genotyp zu untersuchen.

Tabelle 2-7: Lösungen zur Herzbehandlung an der Langendorff-Apparatur

| Lösung | Tyrode Lösung | Substanz | Menge | End-konzentration | Firma |
|--------------------------|---------------|-----------------------|---------|-------------------|-------|
| BDM-Lösung | 250 ml | 1 M CaCl ₂ | 37.5 µl | 0.15 mM | Sigma |
| | | BDM | 250 mg | 1 mg/ml | Roth |
| Kontrolllösung | 250 ml | 1 M CaCl ₂ | 37.5 µl | 0.15 mM | Sigma |
| Isoprenalinlösung | 400 ml | 1 M CaCl ₂ | 60 µl | 0.15 mM | Roth |
| | | 1 mM Isoprenalin | 40 µl | 100 nM | Sigma |

2.6 Calciummessungen am Konfokalmikroskop

2.6.1 Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie, 1955 von Marvin Minsky erfunden, erlebte Ende der 1980er Jahre mit Entwicklung des ersten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops ihren Durchbruch. Aufgrund ihrer Überlegenheit gegenüber gängigen Epifluoreszenzmikroskopen sind Konfokalmikroskope heutzutage aus der Forschung nicht mehr wegzudenken. In der Lichtmikroskopie wird das Licht durch die Probe geleitet. Ist die Probe allerdings dicker als die Abbildungstiefe des Objektivs, dann wird auch Licht von Ebenen ober und unterhalb der Fokusebene zum Detektor gelangen. In der Epifluoreszenzmikroskopie gelangt so Fluoreszenzlicht aus anderen, nicht im Fokus liegenden Ebenen zum Detektor, überlappt mit dem eigentlichen Signal und bedingt eine gewisse Unschärfe.

Die Konfokalmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, in der die Lichtsammeloptiken denselben Punkt der Probe fokussieren, der auch vom anregenden Licht fokussiert wird.

Hierbei wird dementsprechend nicht das gesamte Präparat auf einmal belichtet, sondern es wird nur ein kleiner Teil bzw. ein Punkt aufgenommen. Um ein vollständiges Bild zu erzeugen, muss dieser Punkt über das Präparat bewegt werden und es rastern. Das Bild kann dann aus den einzelnen Punktaufnahmen konstruiert werden. Vorteil dieser Technik ist, dass die Teile des Präparats, die nicht im Fokus liegen, wenig zu dem Endbild beitragen. So gelingt es, auch in Proben größerer Schichtdicke eine hohe Auflösung zu erreichen.

Im Konfokalmikroskop wird Licht einer punktförmigen Lichtquelle gespiegelt und durch das Objektiv auf einen Punkt im Präparat fokussiert (Abbildung 2-5). Das von diesem Punkt emittierte Licht durchtritt wieder das Objektiv und wird weiter oberhalb mittels einer zweiten Linse, der Tubuslinse, erneut in einem Punkt vereint. Dieser Punkt sowie der beleuchtete Punkt im Präparat sind gleichzeitig im Fokus, d.h. sie sind zueinander konfokal. An diesem zweiten Fokuspunkt durchtreten die Lichtstrahlen eine Lochblende (Pinhole). Dieses Pinhole blendet Lichtstrahlen, die nicht aus exakt der konfokalen Ebene des Präparats kommen, aus. Das durchgelassene Licht trifft anschließend auf einen Detektor mit Photomultiplier, der das Signal verstärkt und die Intensitätswerte detektiert. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anwendung fand, befindet sich an der Stelle des Spiegels ein dichroitischer Spiegel. Dieser reflektiert das kurzwellige Licht der Anregungswellenlänge

des Lasers und ist durchlässig für das vom Präparat emittierte wellenlängenverschobene (längerwellige) Licht (Stokes shift). Den im Präparat (bzw. der Zelle) beschriebenen angeregten Punkt muss man sich als ein dreidimensionales Volumen vorstellen, welches auch als Punktspreizfunktion (point spread function) bezeichnet wird. Weiterhin werden bei der Anregung auch Teile des Präparates, die außerhalb dieser Punktspreizfunktion liegen, zum Beispiel ober- und unterhalb, angeregt. Die Emissionsstrahlen aus diesen Teilen fokussieren sich jedoch nicht in derselben konfokalen Ebene und werden daher vom Pinhole blockiert und nicht zum Detektor durchgelassen. Bei einem weiter gestellten Pinhole wird also ein größerer Anteil des Fluoreszenzlichts detektiert, gleichzeitig sinkt aber auch die Auflösung. (Dean, 1998; Paddock, 1999)

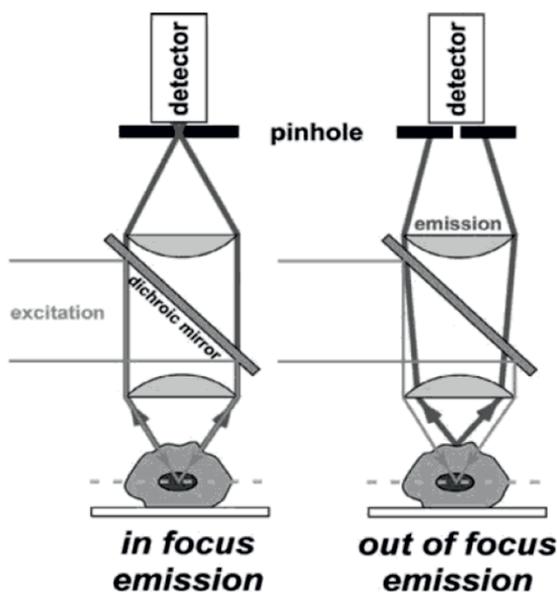


Abbildung 2-5: Konfokales Prinzip am Laser-Scanning-Mikroskop

Die emittierten Lichtstrahlen aus der Fokusebene durchqueren das Pinhole. Strahlen aus nicht-fokussierten Ebenen werden geblockt. (Übernommen aus: (Kaestner, 2013), Kapitel 3.2)

2.6.2 Chemische Calciumindikatoren

Um die Rolle von Ca in zellulären Prozessen besser zu erforschen, wurde eine Vielzahl verschiedener Calciumfarbstoffe entwickelt. Chemische Calciumindikatoren sind kleine Moleküle, die in der Lage sind, Ca zu komplexieren. Ihre grundlegende Struktur basiert auf der Kombination des Chelators BAPTA (1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraacetat) mit einem fluoreszierenden Chromophor, das häufig ein Fluoreszein-Analogon ist (Gee et al., 2000). Im Wesentlichen weisen diese Farbstoffe veränderte Fluoreszenzeigenschaften auf, wenn sie Ca gebunden haben. Man sollte beachten, dass ein Großteil des Ca in der Zelle nicht frei diffundiert, sondern in gepufferter Form vorliegt. Calciumindikatoren binden nur das frei diffundierende Ca und agieren selbst auch als Calciumpuffer und beeinflussen damit Amplitude und Kinetiken der Ca-Transienten. Folgende Kriterien der Indikatoren müssen in Betracht gezogen werden, um eine geeignete Wahl für das Versuchsvorhaben zu treffen:

Calciumaffinität der Indikatoren

Die Dissoziationskonstante K_d beschreibt, wie stark ein Indikator Calciumionen bindet. Entspricht die Calciumkonzentration dem K_d -Wert, liegt die Hälfte der Indikatormoleküle in Ca-gebundener Form vor. Im Idealfall sollten die Indikatoren in der Lage sein, Ca-Konzentrationen zwischen 0.1 und 10-mal ihres K_d -Wertes zu messen, da es bei der Messung von Calciumtransienten zu entsprechenden Konzentrationsänderungen kommt. Die zu messenden Calciumkonzentrationen sollten also im Bereich der Dissoziationskonstante des verwendeten Indikators liegen. Des Weiteren ist der K_d -Wert abhängig von pH, Temperatur, Viskosität, Proteinbindung und der Anwesenheit anderer Ionen. So kann es sein, dass sich der K_d -Wert eines Indikators *in-vivo* von den *in-vitro*-Werten unterscheidet. Bei der Messung von Calciumtransienten ist auch entscheidend, wie schnell der Indikator Ca zu binden vermag. Die Bindungsgeschwindigkeit wird durch die Assoziationskonstante K_a beschrieben. Sie ist definiert als die Ca-Bindungsrate (k_{on} : $M^{-1} s^{-1}$) über der Ca-Dissoziationskonstante (k_{off} : s^{-1}). (Paredes et al., 2008)

Spektraleigenschaften der Indikatoren

Calciumindikatoren können in ratiometrische und nicht-ratiometrische Farbstoffe unterteilt werden. Ratiometrische Farbstoffe haben in Ca-gebundener Form ein verschobenes Anregungs- oder Emissionsspektrum. Mit einem geeigneten Setup kann das Verhältnis von freiem und Ca-gebundenem Indikator gemessen werden. Der Vorteil hierbei ist, dass sich

dieses Verhältnis bei Unterschieden in der Farbstoffbeladung, Photobleaching oder Zellgröße, nicht ändert und diese Störgrößen weitgehend korrigiert werden. Nicht-ratiometrische Indikatoren (single wavelength) erfahren eine calciumabhängige Intensitätserhöhung ihrer Fluoreszenz, ohne dass es zu einer großen Verschiebung ihrer Anregungs- oder Emissionsspektren kommt (Paredes et al., 2008). Die Auswahl eines geeigneten Indikators richtet sich also nach den intrazellulären Calciumbedingungen, den Anregungs- und Emissionsspektren, dem vorhandenen Setup mit Lichtquellen und Filtern und der Praktikabilität in der Handhabung.

Fluo-4

Die Calciummessungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Fluo-4 durchgeführt. Fluo-4 ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff, der sein Absorptionsmaximum (λ_{ex}) bei 494 nm und sein Emissionsmaximum bei 516 nm (λ_{em}) hat (Abbildung 2-6). Nach Ca-Bindung kommt es nur zu einer geringen Wellenlängenverschiebung und zu einer mehr als hundertfachen Fluoreszenzintensitätserhöhung. Im Vergleich zu Fluo-3 weist Fluo-4 eine größere Absorption bei 488 nm auf und kann so gut mit einem Argon-Laser angeregt werden (Powell, 1983). Mit einem K_d -Wert von 345 nM gehört Fluo-4 zu den hoch-affinen Calciumindikatoren mit einem hohen dynamischen Messbereich. Zudem ist es einfach zu handhaben, da es in der veresterten AM-Form (Acetoxymethylester) membrangängig ist und somit leicht in die Zellen gelangt.

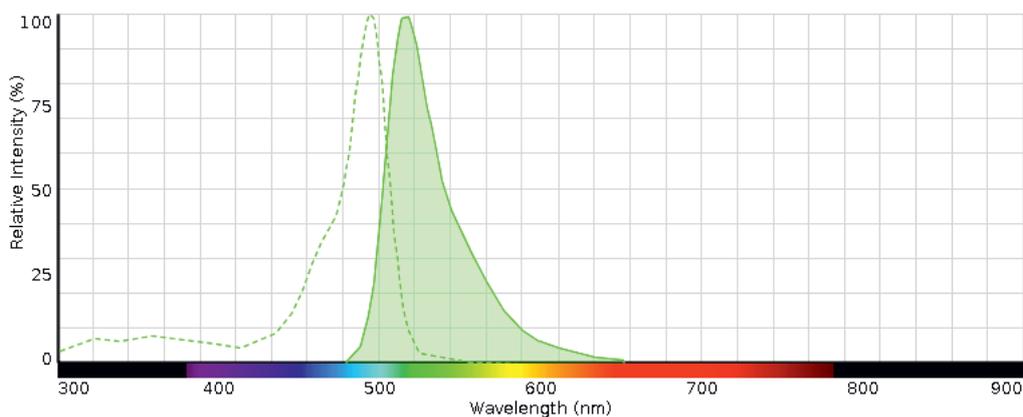


Abbildung 2-6: Spektraleigenschaften von Fluo-4

Ca-abhängiges Absorptionsspektrum (grün gestrichelte Linie) von Fluo-4 mit Maximum bei 494 nm und Emissionsspektrum (grün hinterlegt) von Fluo-4 mit Maximum bei 516 nm (Aus Molecular Probes Handbuch – Kapitel 19.3).

2.6.3 Beladung der Zellen mit Fluo-4/AM

Fluo-4 ist in seiner Salzform hydrophil und somit nicht in der Lage, die Zellmembran zu überschreiten. In der AM-Form (Abbildung 2-7) sind die Carboxylgruppen mit Acetoxymethylgruppen verestert und das Molekül somit lipophil. Fluo-4/AM diffundiert durch die Zellmembran, und im Zytosol der Zelle werden die AM-Gruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten, so dass wieder die Carboxylform vorliegt. Diese ist hydrophil und kann die Zelle nicht wieder verlassen. Somit findet ein unidirektionaler Transport über die Zellmembran statt, und der Farbstoff reichert sich in der Zelle an. So können Farbstoffkonzentration von 1-5 μM außerhalb der Zelle in einer zytosolischen Konzentration von über 100 μM resultieren (Paredes et al., 2008).

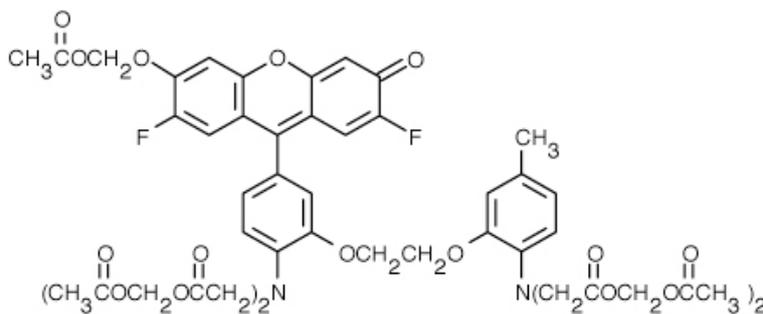


Abbildung 2-7: Struktur von Fluo-4/AM

Zunächst wurden 1 mM Fluo-4/AM (Invitrogen)-Aliquots hergestellt. Dafür wurde die Substanz in DMSO mit 20% (w/v) Pluronic® F-127 (Invitrogen) gelöst. Die Substanzen erhöhen die Löslichkeit des Farbstoffs in wässrigen Medien. Ein weiterer Vorteil ist, dass DMSO die vorzeitige Hydrolyse der Estergruppen inhibiert (Paredes et al., 2008). Für die Beladung der Zellen wurde ein 1 mM Fluo-4/AM-Aliquot mit Messlösung auf 6.6 μM verdünnt und für 20 Minuten auf die ausplattierten Ventrikelmyozyten gegeben. Im Anschluss an den Ladevorgang wurde die Farbstofflösung abpipettiert und durch Messlösung ersetzt. Dieser 20-minütige Entladevorgang diente dem Zweck, den Esterasen innerhalb der Zellen genügend Zeit zu geben, die Esterbindungen des Farbstoffs ausreichend hydrolysieren zu können.

Die Messlösung (Tabelle 2-8), die für die Farbstoffbeladung benutzt wurde, war ebenso die Basislösung für alle zellulären Calciummessungen. Sie ist eine modifizierte Tyrode-Lösung mit einer Calciumkonzentration von 1.5 mM.

Tabelle 2-8: Messlösung (1 l)

| Substanz | Einwaage/ Menge | Endkonzentration | Firma |
|----------------------------|-----------------|------------------|-------|
| NaCl | 7.597 g | 130 mM | Roth |
| 1 M KCl | 5.4 ml | 5.4 mM | Roth |
| 1 M MgCl ₂ | 0.5 ml | 0.5 mM | Sigma |
| 1 M CaCl ₂ | 1.5 ml | 1.5 mM | Sigma |
| HEPES | 2.383 g | 10 mM | Roth |
| Glucose x H ₂ O | 1.982 g | 10 mM | Roth |

Einstellung der Lösung auf pH 7.4 mit 1 M NaOH

2.6.4 Calciummessungen am Zeiss-LSM 510

Um Calciumtransienten (CaT) in Kardiomyozyten messen zu können, bedurfte es einer elektrischen Stimulation der Zellen. Mittels eines Stimulators (MyoPacer, IonOptix) und zweier in das Kulturschälchen ragender Platinelektroden wurde ein elektrisches Feld erzeugt (40 V), und die Zellen konnten mit ausgewählten Stimulationsfrequenzen (0.5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz) elektrisch stimuliert werden. Zudem wurden die Zellen über ein Superfusionssystem kontinuierlich mit Messlösung umspült. Ein Großteil der Experimente wurde am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 der Firma Zeiss, Jena (Abbildung 2-8) durchgeführt. Es wurde ein Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Apochromat, 63x/1.4 Oil DIC M27) verwendet, und die Anregung erfolgte mittels eines Argon-Lasers bei 488 nm, die Detektion bei >505 nm. Bei den Aufnahmen wurde der Linescan-Modus des Mikroskops verwendet. Bei diesem wurde eine Linie transversal und unter Vermeidung der Zellkerne durch die Zelle gelegt und über eine vorgegebene Zeit wiederholt gescannt (Abbildung 2-9). Die Scandauer für eine Linie betrug dabei 3.07 ms bei einer Bildtiefe von 12 bit. Die kumulierten Scans ergaben den CaT der Zelle über die Zeit am Ort der Linie. Im Vergleich zur Messung einer gesamten konfokalen Ebene ist der Linescan-Modus um ein Vielfaches schneller und ermöglicht so auch eine genaue Analyse

kinetischer Parameter der CaT. Für die konfokalen Messungen wurde der Durchmesser der Lochblende stets kleiner als $140\ \mu\text{m}$ gehalten, was einer konfokalen Schichtdicke von $\approx 1\ \mu\text{m}$ in der Zelle entsprach.

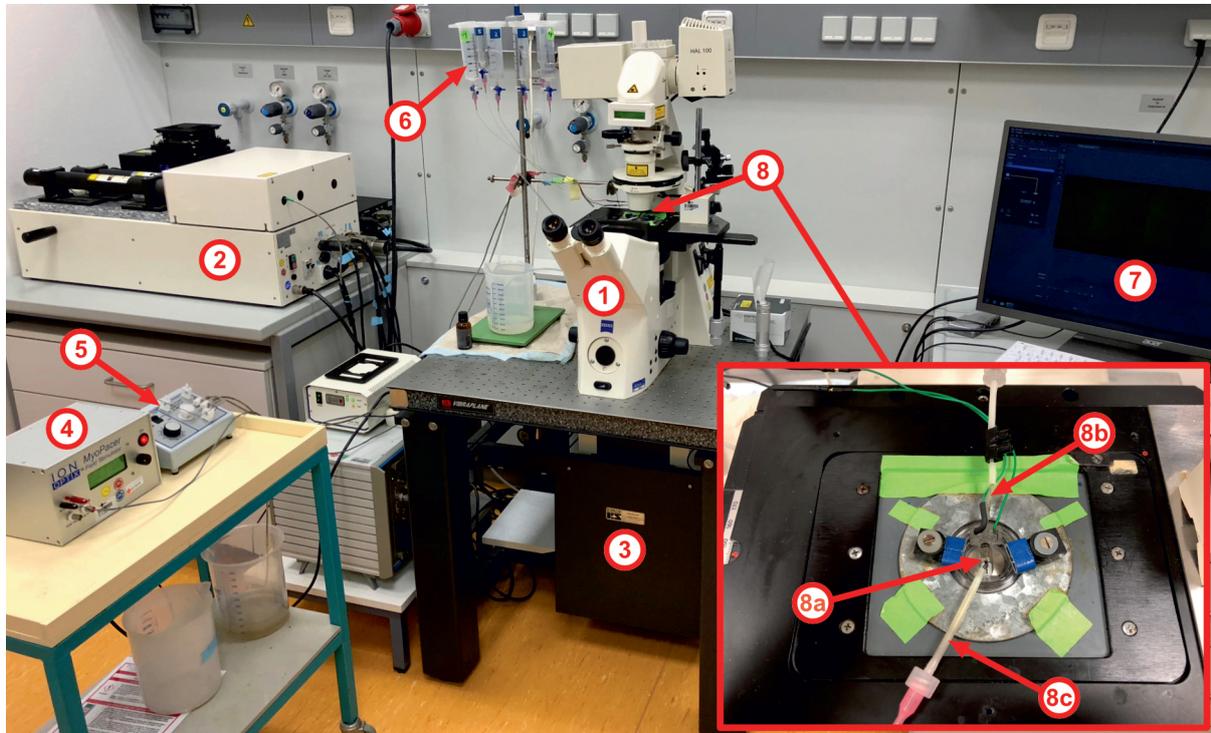


Abbildung 2-8: Zeiss LSM 510 Setup

(1) Axiovert 100 M Lichtmikroskop, (2) Lasermodul, (3) Scanmodul, (4) MyoPacer, (5) Peristaltikpumpe, (6) Superfusionslösung, (7) Computer und Monitor mit Software, (8) Superfusionskammer-System, (8a) Platinelektroden, (8b) Kammerzulauf, (8c) Absaugschlauch (Übernommen aus (Kieß, 2019)).

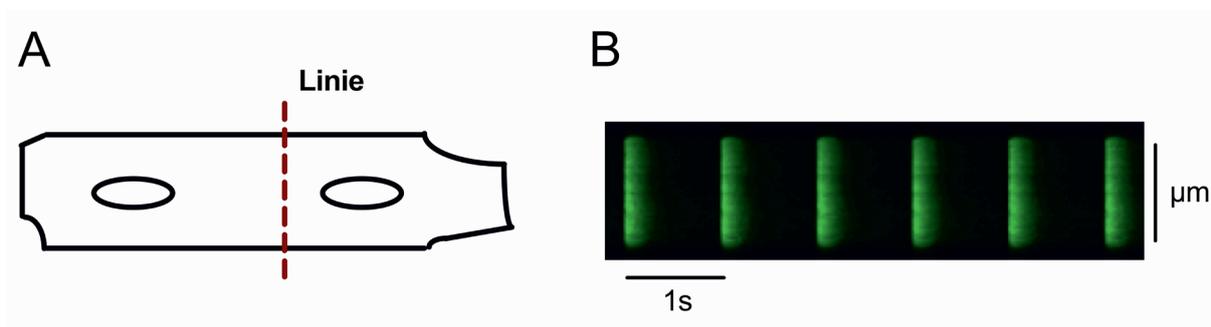


Abbildung 2-9: Linescan-Modus

(A) Beispielhafter Ventrikelmiozyt mit transversaler Linie, die repetitiv abgetastet wurde (Linescan);
 (B) Beispielhafte Calciumtransienten im Linescan-Modus

2.6.5 Calciummessungen am Visitech-2D-Konfokalmikroskop

Die beladenen Zellen wurden auch an diesem Messstand (VT-Hawk, Visitech, UK) mit einem MyoPacer stimuliert und mit Messlösung superfundiert. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, hierbei wurde ein Öl-Immersionsobjektiv (UPlanSApo, 60x/1.35 Oil) verwendet. Das grundlegende Prinzip dieses Setups ist, dass hier ein zweidimensionaler Bereich des Präparats mittels einer Vielzahl an parallel gerichteten Laserstrahlen gleichzeitig gescannt wird. Im Unterschied zu Single-Beam-Setups (wie dem Zeiss-LSM 510) werden also viele konfokale Punkte simultan gescannt. Diese gescannte zweidimensionale Fläche wird über einen Spiegel über das Präparat bewegt und rastert dieses. Die Mikrolinsen, welche die parallelen Laserstrahlen generieren, sowie der Bereich der Pinholes, sind hierbei fest verankert. (Kaestner and Lipp, 2018)

Mit dem Visitech-2D-Konfokalmikroskop wurde ein großer Bereich des Ventrikelmyozyten (Abbildung 2-10) und nicht lediglich eine Linie in diesem, wie beim Linescan-Modus, in Echtzeit gemessen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Bildrate von 55.3 fps. Die zeitliche Auflösung ist damit an diesem Setup schlechter als am Zeiss-LSM 510 im Linescan-Modus, dafür kann man aber einen größeren Bereich der Zelle aufnehmen.

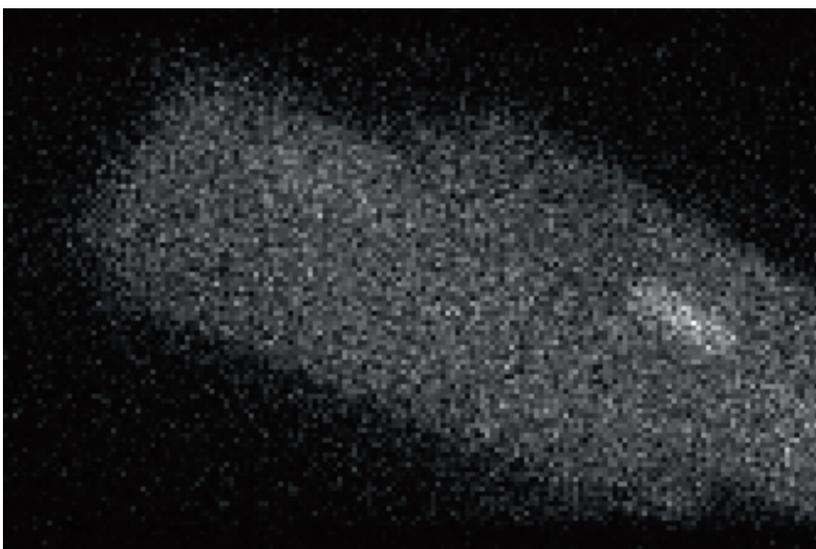


Abbildung 2-10: Ventrikelmyozyt am Visitech-2D-Konfokalmikroskop

Großer Bereich eines Ventrikelmyozyten mit hellem Zellkern.

2.6.6 Auswertung der Calciumtransienten

Die konfokalen Linescan-Aufnahmen (Zeiss-LSM 510) sowie die 2D-Aufnahmen (Visitech-2D-Konfokalmikroskop) wurden im ersten Schritt mithilfe von FIJI (ImageJ, NIH, Bethesda, USA) analysiert. Hier wurde zunächst ein Bereich neben der Zelle ausgewählt, um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln und diese vom Bild zu subtrahieren. Anschließend wurde der Bereich innerhalb der Zelle ausgewählt und die Fluoreszenzwerte der Linescan-Aufnahme dargestellt. In dem so generierten Bild erhält man Transienten, da die horizontale Achse des Bildes dem zeitlichen Verlauf des Scans entspricht. Die Werte dieser Transienten wurden nach Excel exportiert. Für die weitere Auswertung wurden im Anschluss vier bis fünf Calciumtransienten gemittelt. In dem gemittelten Transienten wurden dann die folgenden Parameter analysiert (Abbildung 2-11): Diastolisches Ca (F_0), systolisches Ca (F), Amplitude (ΔF), Anstiegszeit des Transienten (*Rise time 10-90%*), Abfallzeit des Transienten (*Decay time 90-10%*), sowie die Abfallzeitkonstante Tau (*Tau of decay, τ*). Das diastolische Ca (F_0) entspricht der Grundlinien-Fluoreszenz des Transienten, wohingegen das systolische Ca (F) dem höchsten Punkt (*Peak*) des Transienten entspricht. Die Amplitude ist die Differenz aus systolischen und diastolischen Fluoreszenzwerten. In den Transienten wurden auch die genannten kinetischen Parameter bestimmt. Die Anstiegszeit (*Rise time 10-90%*) ist die Zeit, die für den Anstieg des Transienten von der Grundlinie bis zur Spitze benötigt wird. Hier wurde die Zeit von dem Punkt, an dem 10% der maximalen Fluoreszenz (*Peak*) erreicht sind bis zum Zeitpunkt, an dem 90% der Spitzenfluoreszenz erreicht sind, ermittelt. Die Abfallzeit (*Decay time 90-10%*) ist die Zeit, die benötigt wird, um von der Spitze (90% der Spitzenfluoreszenz) wieder zurück zur Grundlinie (10% der Spitzenfluoreszenz) zu gelangen. Die Abfallzeitkonstante Tau (τ) wurde ermittelt anhand einer mono-exponentiellen Funktion, die dem Abfall des Transienten angepasst wurde. Um Schwankungen in der Farbstoffbeladung der Zellen zu korrigieren, wurden die Fluoreszenzwerte (F , F_0) auf die Ruhefluoreszenz, F_{rest} , der Zelle, d.h. die Grundfluoreszenz ohne elektrische Stimulation, normalisiert. Die Ruhefluoreszenz wurde jeweils vor Beginn des eigentlichen Protokolls gemessen.

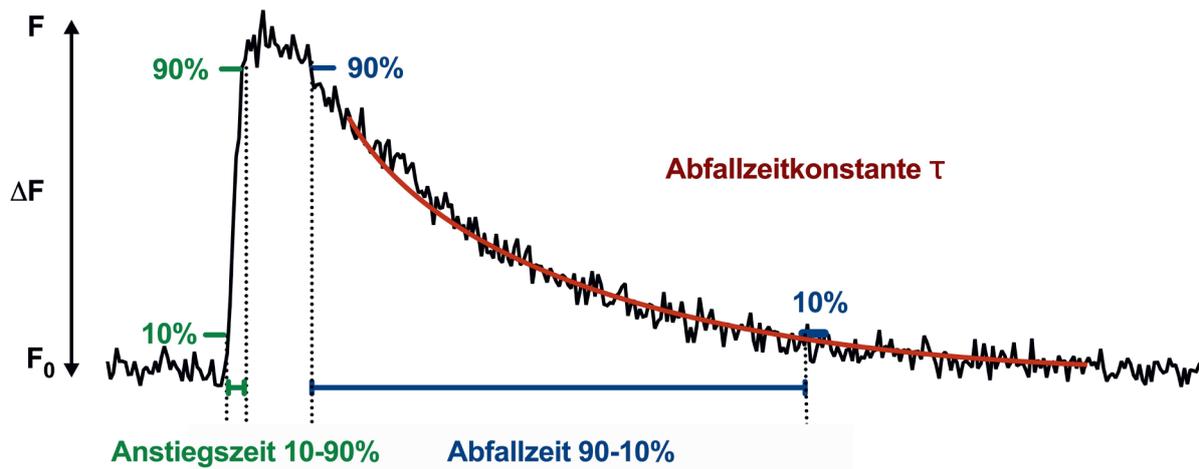


Abbildung 2-11: Beispiel-CaT mit analysierten Parametern

F_0 (diastolisches Ca), F (systolisches Ca), ΔF (CaT-Amplitude), Anstiegszeit 10-90%, Abfallzeit 90-10%, Abfallzeitkonstante Tau

2.6.7 Messung der Calciumtransienten unter basalen Bedingungen

Für eine Charakterisierung der Zellen unter basalen Bedingungen wurden die Zellen am Zeiss-LSM 510 und am Visitech-2D-Konfokalmikroskop jeweils mit Messlösung superfundiert und mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Nach etwa vier Minuten befanden sich die Myozyten in einem Gleichgewicht (*steady state*), in dem die CaT stabil blieben, und die Messung wurde gestartet.

2.6.8 Messung der Calciumtransienten unter gestressten Bedingungen

Die Grundidee der gestressten Bedingungen war es, eine erhöhte Sympathikusaktivität nachzuahmen. Die zugehörigen Protokolle wurden am Zeiss-LSM 510 durchgeführt. In einem Frequenzprotokoll wurde die mit Sympathikusaktivierung einhergehende Erhöhung der

Herzfrequenz (positive Chronotropie) simuliert. Nachdem sich die Zelle im Gleichgewicht befand (1 Hz), wurde die Stimulation für 20 Sekunden auf 2 Hz und im Anschluss für weitere 20 Sekunden auf 4 Hz erhöht.

In einem Isoprenalinprotokoll wurde die mit Sympathikusaktivierung einhergehende Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren simuliert. Dafür wurden die Zellen, nachdem sie sich in einem Gleichgewicht befanden (1 Hz), für vier Minuten mit einer Isoprenalinlösung (100 nM) superfundiert. An dieses Isoprenalinprotokoll wurde das Frequenzprotokoll angeschlossen und beide Protokolle somit kombiniert.

Des Weiteren wurde die SR-Calciumbeladung bestimmt, eine ISO-Konzentrations-Wirkungskurve etabliert, sowie ein Thapsigargin Protokoll durchgeführt, bei dem der sarkolemmale Ca-Einstrom gemessen wurde.

2.6.9 Bildbearbeitung der originalen Linescan-Abbildungen

Um eine ausreichende Helligkeit der in dieser Arbeit präsentierten Linescan-Aufnahmen zu gewährleisten, wurden die Bilder wie folgt bearbeitet: Mittels FIJI (ImageJ) wurde zunächst für jede Spur die Hintergrundfluoreszenz ermittelt und vom Bild subtrahiert. Im nächsten Schritt wurde im Sinne einer Kontrasterhöhung die Display Range angepasst (Image – Adjust – Brightness/Contrast – Set Display Range). Dabei wurde für alle Bilder einer Abbildung dieselbe Display Range gewählt. Anschließend wurden die Spuren ein Mal geglättet (Process – Smooth).

2.7 Western Blot-Untersuchungen

2.7.1 Homogenisierung von Herzgewebe

Die Homogenisierung des Gewebes wurde von Hand durchgeführt und fand kontinuierlich auf Eis statt. Dafür wurden kleine gefrorene Gewebestücke vom linken Ventrikel in Mörser (Micro tissue grinder, Wheaton, UK) mit 100 µl Homogenisierungspuffer (Tabelle 2-10) gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Glaspistill gründlich gemörsert und dann bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem Eppendorfggefäß (*Collecting Tube*) gesammelt. Weitere 100 µl Homogenisierungspuffer wurden in den Mörser gegeben und das verbliebene Gewebe erneut gemörsert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation wieder in den Collecting Tubes gesammelt. Je nachdem wieviel Geweberest noch vorhanden war, wurde ein dritter oder vierter Durchgang derselben Prozedur angeschlossen. Die gesammelten Überstände in den Collecting Tubes wurden für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der finale Überstand aus den Collecting Tubes wurde in ein weiteres Eppendorfggefäß (*Final Tube*) überführt. Aus den Final Tubes wurde dann Homogenat für die quantitative Proteinbestimmung entnommen, bevor die Tubes in den -80°C-Gefrierschrank überführt wurden.

2.7.2 Homogenisierungspuffer

Da bei der Homogenisierung endogene Proteasen und weitere abbauende Enzyme freigesetzt werden können, ist in dem Homogenisierungspuffer (Tabelle 2-9) eine Mischung aus verschiedenen Inhibitoren enthalten. Der Basishomogenisierungspuffer wurde im Vorhinein hergestellt und in 9.22 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Die Inhibitoren wurden erst am Tag der Homogenisierung frisch dazugegeben.

Zu den Protease-Inhibitoren gehören: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, sowie für Metalloproteasen die Chelatoren EGTA und EDTA.

Zu den Phosphatase-Inhibitoren gehören: β -Glycerolphosphat, NaF, Na-Pyrophosphat sowie Na_3VO_4 .

Tabelle 2-9: Homogenisierungspuffer, 100 ml

| Substanz | Menge | Endkonzentration | Firma |
|---------------------------|--------|------------------|---------------|
| NP-40 (Igepal) | 1 ml | 1% | Sigma-Aldrich |
| Glycerol | 10 ml | 10% | Roth |
| NaCl | 0.8 g | 137 mM | Roth |
| 1 M Tris-HCl | 2 ml | 20 mM | Roth |
| β -Glycerolphosphat | 1.53 g | 50 mM | Sigma-Aldrich |
| 100 mM EDTA (pH 8) | 10 ml | 10 mM | Sigma-Aldrich |
| 100 mM EGTA (pH 7) | 1 ml | 1 mM | Sigma-Aldrich |

Inhibitorzugabe zu 9.22 ml Homogenisierungspuffer (am Tag der Homogenisierung)

| Inhibitor | Menge | Endkonzentration | Firma |
|--|-------------|------------------|---------------|
| NaF (20 mM) | 400 μ l | 20 mM | Sigma-Aldrich |
| Na-Pyrophosphat (1 mM) | 100 μ l | 1 mM | Sigma-Aldrich |
| Na ₃ VO ₄ (1 mM) | 100 μ l | 1 mM | Sigma-Aldrich |
| Aprotinin (4 mg/ml) | 10 μ l | 4 μ g/ml | Roth |
| Leupeptin (4 mg/ml) | 10 μ l | 4 μ g/ml | Roth |
| Pepstatin A (4 mg/ml) | 60 μ l | 4 μ g/ml | Roth |
| PMSF (1 mM) | 100 μ l | 1 mM | Sigma-Aldrich |

2.7.3 Quantitative Proteinbestimmung der Homogenate

Die Proteinkonzentration der Homogenate wurde mit einem BCA-Test (Pierce™ BCA Assay Kit, Thermo Scientific, Deutschland) bestimmt. Bei dem BCA-Test gehen Peptidbindungen einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen (Cu^{2+}) ein (Biuret-Reaktion). In alkalischer Lösung wird hierbei Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Die in alkalischer Lösung stabile Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit Cu^{1+} einen violetten Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist (Abbildung 2-12). Der Test ist sensitiv und zeigt eine starke lineare Korrelation bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (Smith et al., 1985).

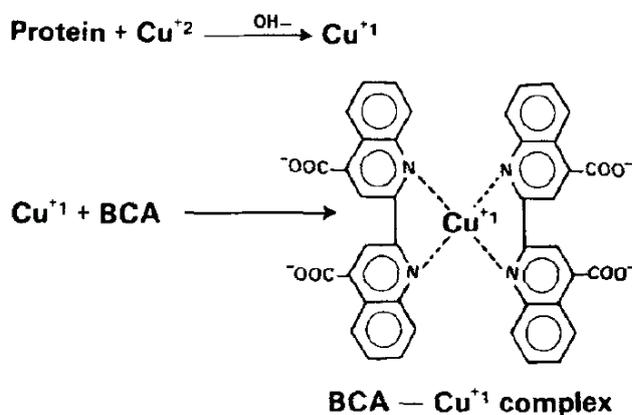


Abbildung 2-12: BCA-Reaktion

Zwei BCA-Moleküle bilden einen Komplex mit einem Cu^{1+} -Ion (Smith et al., 1985)

Zunächst wurde das BCA-Reagenz nach Herstelleranweisung angesetzt (Lösung A:B im Verhältnis 1:50). Die Homogenate wurden in Homogenisierungspuffer um den Faktor 50 verdünnt. Für die Farbreaktion wurden in doppelter Ausführung 5 μl Homogenat (1:50), 20 μl ddH₂O und 200 μl Reagenz zusammengegeben. Diese Proben wurden dann für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit direkt auf Eis gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 562 nm wurde mittels eines Microplate Readers bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben konnte mittels einer BSA-Standardkurve (0-1 mg/ml), die gemeinsam mit den Proben vermessen wurde, errechnet werden. Die BSA-Verdünnungsreihe wurde am Tag der Homogenisierung aus einem 2 mg/ml Albumin-Standard (Thermo Scientific) hergestellt.

2.7.4 Western Blot

Western Blot ist eine lang etablierte biochemische Methode, mittels derer man Proteine semi-quantitativ bestimmen kann. Sie basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach Größe (SDS-PAGE), dem anschließenden Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und der Detektion der Proteine mithilfe einer Antikörperreaktion (Nach: „Western Blot, Principles and methods, GE Healthcare Bio-Sciences, 2011“).

2.7.4.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Die Homogenate wurden zunächst auf eine Konzentration von 2.5 µg/µl verdünnt. Auf Eis wurden dann 8 µl Probe (entspricht einer Proteinmenge von 20 µg) mit 4 µl 4xLämmli-Puffer (enthält 5% β-Mercaptoethanol) (Tabelle 2-10) und 8 µl Homogenisierungspuffer gemischt, gevortext, zentrifugiert und im Anschluss in die Taschen des Gels gegeben. In die Tasche am linken Rand des Gels wurden stets 4 µl eines Größenmarkers pipettiert (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific).

Tabelle 2-10: 4x Lämmli-Puffer, 20 ml

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|--------------------------|--------|------------------|
| 100 mM EGTA (pH 7.4) | 3.2 ml | 16 mM |
| 20% SDS-Lösung | 4 ml | 4% |
| 1 M Tris-HCl (pH 6.8) | 800 µl | 40 mM |
| 1 M Dithiothreitol (DTT) | 320 µl | 16 mM |
| Glycerol | 9.4 ml | 47% |
| 1% Bromphenolblau | 1 ml | 0.05% |

Der Lämmli-Puffer wurde im Vorhinein hergestellt, aliquottiert und bei -20°C gelagert. β-Mercaptoethanol wurde frisch am Versuchstag dazugegeben.

2.7.4.2 Gelvorbereitung

Für die meisten Proteine wurden Gradientengele (4-20% Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad, München) verwendet. Um bei Proteinen mit einem Molekulargewicht von unter 30 kDa eine gute Auftrennung zu erreichen, wurden Tris-Tricin-Gele mit einem 6%-igen Sammel- und einem 16%-igen Trenngel an einer Gelcast-Apparatur (Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand & Clamp, Bio-Rad) gegossen (Tabelle 2-11). Die jeweils verwendeten Gele der untersuchten Proteine sind der Antikörper-Tabelle (Tabelle 2-16) zu entnehmen.

Tabelle 2-11: Tris-Tricin-Gele

Trenngel 16%, Zusammensetzung für 2 Gele (18 ml)

| Substanz | Menge |
|--------------------|--------|
| ddH ₂ O | 2.3 ml |
| 30% PAA/BIS | 9.6 ml |
| 3 M Tris-HCl / SDS | 6 ml |
| 10% APS | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |

Sammelgel 6%, Zusammensetzung für 2 Gele (6 ml)

| Substanz | Menge |
|--------------------|--------|
| ddH ₂ O | 2.8 ml |
| 30% PAA/BIS | 1.2 ml |
| 3 M Tris-HCl / SDS | 2 ml |
| 10% APS | 25 µl |
| TEMED | 10 µl |

2.7.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die geladenen Gele wurden in den Tank (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) überführt, welcher mit gelspezifischem Puffer gefüllt wurde (Tabelle 2-12). Bei der Elektrophorese der Gradientengele wurde zunächst für 1 Stunde eine Spannung von 90 V angelegt, die dann bishin zur suffizienten Auftrennung der Proteine auf 120 V erhöht wurde. Für die Tris-Tricin-Gele wurde für die ersten 30 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt, die dann bis zum Ende der Elektrophorese auf 80 V reduziert wurde.

Tabelle 2-12: Elektrophoresepuffer

Zusammensetzung eines 10x Elektrophoresepuffers für Gradientengele, 1 l

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|-----------|--------|------------------|
| TRIS-Base | 30.2 g | 0.25 M |
| Glycin | 144 g | 1.9 M |
| SDS | 10 g | 1% |

Der zehnfach konzentrierte Puffer wurde am Tag des Versuchs mit ddH₂O auf 1x verdünnt.

Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer für Tris-Tricin-Gele

Kathodenpuffer (innen), 1 l

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|-----------|--------|------------------|
| Tris-Base | 12.1 g | 100 mM |
| Tricin | 17.9 g | 100 mM |
| SDS | 1 g | 0.1% |

Anodenpuffer (außen), 1 l

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|-----------|--------|------------------|
| Tris-Base | 24.2 g | 200 mM |
| 5 M HCl | q.s. | pH 8.9 |

2.7.4.4 Transfer

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine in einem Nass-Elektrotransfer-Verfahren (*Wet electroblotting*) auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0.45 µm (Bio-Rad) transferiert (Towbin et al., 1979). Der Transferpuffer wurde am Versuchstag aus einem 10-fach konzentrierten Transferpuffervorrat (Tabelle 2-13) hergestellt und enthielt 20% Methanol bzw. 20% Ethanol. Aufgabe des Alkohols war es, die Proteine in der Nitrozellulosemembran zu fixieren. Vor dem Transfer wurden die Filterpapiere und Schwämme für das Blot-Sandwich sowie die passend geschnittenen Nitrozellulosemembranen für 10 Minuten in kalten Transferpuffer gegeben. Das Blot-Sandwich wurde wie folgt zusammengesetzt:

- **Schwarze Elektrode (Kathode)**
- Schwamm
- Dickes Filterpapier
- **Gel**
- **Nitrozellulosemembran**
- Dünnes Filterpapier
- Dickes Filterpapier
- Schwamm
- **Weiße Elektrode (Anode)**

Die Blot-Sandwichs wurden in die Tanks gegeben und diese mit Transferpuffer gefüllt. Zudem wurde ein Kühlakku sowie ein Rührfisch mit in die Tanks gelegt. Der Transfer fand über Nacht im Kühlraum (4°C) statt. Pro Gel wurde zunächst ein Stromfluss von 100 mA (200 mA für zwei Gele) für zwei Stunden angelegt und dieser wurde auf 15 mA/Gel über Nacht reduziert. Für kleinere Proteine wurde die Transferzeit reduziert. Hier wurde der Transfer bereits nach den ersten zwei Stunden beendet.

Tabelle 2-13: 10x Transferpuffer, 1 l

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|-----------|--------|------------------|
| Tris-Base | 39.4 g | 0.33 M |
| Glycin | 144 g | 1.92 M |

Für 1x Transferpuffer wurden 100 ml 10x Transferpuffer, 200 ml Methanol oder Ethanol und 700 ml ddH₂O zusammengegeben.

2.7.4.5 Immundetektion

Im Anschluss an den Transfer wurden die Nitrozellulosemembranen für 3x 10 Minuten mit TBST-Puffer (Tabelle 2-14) gewaschen und im Anschluss für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 5% Milchpulver (Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich) in TBST geblockt. Die Membranen wurden dann über Nacht mit dem Primärantikörper (in 5% Milch in TSBT) inkubiert (Tabelle 2-16). Nach Primärantikörperinkubation wurden die Membranen erneut für 3x 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit den Meerrettichperoxidase-konjugierten (HRP) Zweitantikörpern (in 5% Milch in TBST) für 1 Stunde inkubiert (Tabelle 2-17). Abschließend wurden die Membranen ein weiteres Mal für 3x 10 Minuten mit TSBT gewaschen. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde am Chemidoc-XRS-System (Bio-Rad, Deutschland) mit dem Reagenz HRP Juice bzw. dem sensitiveren Reagenz HRP Juice Plus (PKJ GmbH, Deutschland) detektiert. Bei der Chemilumineszenzreaktion katalysieren die an die Zweitantikörper gekoppelten Peroxidasen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die Oxidation von Luminol. Diese Oxidation führt zu der Formation eines Aminophthalations in einem angeregten Zustand, welches Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert, sobald es in seinen Grundzustand zurückkehrt (Marquette and Blum, 2006). Bei einigen Membranen wurden nach der Detektion die gebundenen Antikörper wieder entfernt (*Stripping*) und die Membranen mit einer Antikörperlösung für ein anderes Protein inkubiert. Für diese Technik wurde die Membran zunächst mit Stripping-Puffer (Tabelle 2-15) für 10 Minuten gewaschen und anschließend 2x 10 Minuten mit TBST-Puffer. Aufgrund eines sauren pH-Wertes und einer hohen Konzentration des Detergens Tween ist der Stripping-Puffer in der Lage Antikörper-Antigen-Bindungen zu lösen. Die gestrippten Membranen wurden dann über Nacht mit dem neuen Primärantikörper (in 5% Milch) inkubiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik nur angewandt, sofern der nach Stripping verwendete neue Primärantikörper einer anderen Spezies entstammte als der vorherige Primärantikörper. Über die dadurch bedingte Verwendung eines anderen Sekundärantikörpers konnte ausgeschlossen werden, dass dieser an noch eventuell vorhandenen Primärantikörper der vorherigen Detektion binden kann. Als Ladekontrollen und zur Normalisierung wurden die Proteine GAPDH, Calsequestrin oder Aktin verwendet. Die Auswertung wurde mit FIJI (ImageJ, Bethesda, USA) vorgenommen.

Tabelle 2-14: TBST-Puffer, 1 l

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|-----------|--------|------------------|
| NaCl | 9.91 g | 170 mM |
| Tris-Base | 1.21 g | 10 mM |
| Tween 20 | 1 ml | 0.1% |
| 6 M HCl | q.s. | pH 7.5 |

Tabelle 2-15: Stripping-Puffer, 200 ml

| Substanz | Menge | Endkonzentration |
|----------|-------|------------------|
| Glycin | 3 g | 0.2 M |
| SDS | 0.2 g | 0.1% |
| Tween 20 | 2 ml | 1% |
| 6 M HCl | q.s. | pH 2.2 |

Tabelle 2-16: Liste der verwendeten Antikörper

Liste der Primärantikörper

| Protein (kDa) | Antikörper | Firma, Katalog-nummer | Wirtsspezies | Konz. | Gel |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------------|--------------|----------|---------------------|
| Aktin (44) | Mouse Anti-Actin, mAb (Clone:C4) | MP Biomedicals LLC, #69100 | Maus | 1:100000 | 16% Tricingel |
| GAPDH (34) | Anti-GAPDH Mouse mAb (6c5) | Calbiochem, #CB1001 | Maus | 1:50000 | 4-20% Gradientengel |
| Ca β 2 (78) | Anti-CACNB2 Antibody | Alomone, #ACC-105 | Kaninchen | 1:800 | 4-20% Gradientengel |
| Ca ν 1.2 (250) | Anti Ca ν 1.2 (CACNA1C) Antibody | Alomone labs, #ACC-003 | Kaninchen | 1:1000 | 4-20% Gradientengel |
| Ca ν 1.2 pSer1928 | L-type Ca channel (Cav1.2) (pSer1928) | Badrilla, #A010-70 | Kaninchen | 1:1000 | 4-20% Gradientengel |
| Ca ν 1.3 (250) | Anti-Ca ν 1.3 (CACNA1D) Antibody | Alomone, #ACC-005 | Kaninchen | 1:200 | 4-20% Gradientengel |
| CSQ (55) | Anti-Calsequestrin pAb | Thermo-Scientific, #PA1-913 | Kaninchen | 1:2500 | 4-20% Gradientengel |
| NCX1 (120) | Anti-NCX1 mAb | Thermo-Scientific, #MA1-4672 | Maus | 1:1000 | 4-20% Gradientengel |
| RyR (565) | Anti-RyR mAb (C3-33) | Thermo Scientific, #MA3-916 | Maus | 1:5000 | 4-20% Gradientengel |
| RyR2 pSer2808 | Anti-phospho-RyR2(Ser-2808) pAb | Badrilla, #A010-30 | Kaninchen | 1:5000 | 4-20% Gradientengel |
| RyR2 pSer2814 | Anti-phospho-RyR2 (Ser-2814) pAb | Badrilla, #A010-31 | Kaninchen | 1:5000 | 4-20% Gradientengel |
| SERCA2a (100) | Anti-SERCA2a pAb | Badrilla, #A010-20 | Kaninchen | 1:5000 | 4-20% Gradientengel |
| PLB (25) | Anti-Phospholamban (PLN, PLB) A1 | Badrilla, #A010-14 | Maus | 1:5000 | 16% Tricingel |
| PLB pSer16 | Anti-Phospholamban Phospho-Ser16 | Badrilla, #A010-12 | Kaninchen | 1:5000 | 16% Tricingel |
| PLB pThr17 | Anti-Phospholamban Phospho-Thr17 | Badrilla, #A010-13 | Kaninchen | 1:5000 | 16% Tricingel |

| Sekundärantikörper | Firma, Katalognummer | Konzentration |
|--|--|---------------|
| Immunopure Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated | Thermo Scientific, Deutschland; #31430 | 1:5000 |
| Immunopure Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated | Thermo Scientific, Deutschland; #31460 | 1:5000 |

2.7.6 Auswertung der Western Blots

Die aufgenommenen Bilder wurden mithilfe von FIJI (ImageJ) analysiert. Dabei wurden die Intensitäten der Banden ermittelt und jeweils auf eine Ladekontrolle normalisiert (GAPDH, Calsequestrin, Aktin). Auf jeder Membran wurden vier WT- (*Cacna1c*^{+/+}) mit vier *Cacna1c*^{+/-}-Proben verglichen. Dabei wurden die WT-Signale auf 100% gesetzt und die Signale der *Cacna1c*^{+/-}-Proben dazu in Relation gesetzt. Die Werte der relativen Expression (8 WT- und 8 *Cacna1c*^{+/-}-Proben) wurden anschließend zusammen statistisch ausgewertet.

Für die Untersuchung der ISO-behandelten Herzen an der Langendorff-Apparatur (siehe 2.5.6) wurde auf einer Membran jeweils ein Genotyp untersucht. Dafür wurden immer vier ISO-behandelte Proben zusammen mit vier Kontrollproben (ohne ISO) desselben Genotyps aufgetragen. Hierbei wurden die Signale der Kontrollbedingungen auf 100% gesetzt und die Signale der ISO behandelten Proben dazu in Relation gesetzt. Ziel der Untersuchung war ein Vergleich der beiden Genotypen hinsichtlich der Steigerung des Phosphorylierungsgrades Ca-regulierender-Proteine durch die ISO-Behandlung.

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA). Mittels D'Agostino & Pearson-Test wurden die Gruppen zunächst auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Gruppen wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test angewendet. Für nicht-normalverteilte Daten erfolgte die Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen kam eine einfaktorielle ANOVA und ein Tukey-Test zum Einsatz. Im Frequenzprotokoll fand die Auswertung mittels Zweifach-ANOVA und Bonferroni-Test statt. Für die ISO-Konzentrations-Wirkungskurve wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse mittels eines vier-Parameter logistischen Regressionsmodells (4PL) durchgeführt. Das untere Plateau der Kurve wurde auf den Wert = 0 und das obere Plateau auf den Wert = 1 begrenzt. Mittels F-Test (extra-sum-of-squares F-Test) wurden die Regressionskurven auf folgende Nullhypothese getestet: $\log EC_{50}$ ist für beide Datensätze identisch; beide Datensätze können mit einer Regressionskurve beschrieben werden. Im Folgenden werden die Daten unter Nennung des Mittelwerts \pm Standardfehler (SEM) mit n = Anzahl der Kardiomyozyten und N = Anzahl der Tiere präsentiert. Unterschiede zwischen Gruppen werden als signifikant (*) bezeichnet, sobald $p < 0.05$, (**) sobald $p < 0.01$ und (***) wenn $p < 0.001$. Die genauen p-Werte sind den Graphen zu entnehmen.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodells

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines heterozygoten Knockouts des *CACNA1C*-Gens (*Cacna1c*^{+/-}) auf die kardiale Calciumregulation im Rattenmodell untersucht. Für die Studien kamen haploinsuffiziente *Cacna1c*^{+/-}-Ratten der Zuchtlinie Sprague-Dawley im Alter von 9-15 Monaten zum Einsatz. Als Kontrolltiere wurden die Wildtyp-Wurfgeschwister (*Cacna1c*^{+/+}, WT) dieser Tiere genutzt. Die Untersuchungen wurden an weiblichen Tieren vorgenommen.

In den Studien an diesem Rattenmodell fand zunächst eine Charakterisierung unter basalen Bedingungen statt. Diese beinhaltete Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen am lebenden Tier, sowie Untersuchungen der Ca-Regulation in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten, als auch Immunoblot-Untersuchungen der Proteinexpression und des Phosphorylierungsstatus in ventrikulärem Gewebe der Tiere.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Charakterisierung des Modells unter Bedingungen, die sympathischen Stress simulieren. Unter diesen gestressten Bedingungen wurde ebenfalls die Ca-Regulation in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten untersucht, insbesondere die Fähigkeit der Myozyten, einen positiv-inotropen und -lusitropen Effekt zu generieren. Des Weiteren wurde die ISO-induzierte Phosphorylierung der Calcium-regulierenden-Proteine in ventrikulärem Gewebe der *Cacna1c*^{+/-}-Tiere untersucht und mit dem Wildtyp verglichen.

3.2 Basale Bedingungen

3.2.1 Heterozygote *Cacna1c*^{+/-}-Ratten entwickeln keine Hypo- oder Hypertrophie des Herzens

Als eine erste basale Charakterisierung der Tiere wurden die Herzen auf Anzeichen einer Hypo- oder Hypertrophie untersucht. Dabei wurde das Herzgewicht untersucht und auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres normalisiert. Als zusätzliche Einschätzung wurde das Gewicht der Ventrikel auf die Tibiallänge (Schienbein) der Tiere normalisiert (Abbildung 3-1). Bei dieser Variante wurde die Größe des Tieres und nicht das Körpergewicht berücksichtigt. Zwischen beiden Genotypen war kein Unterschied zwischen den Herzgewichten, die auf das Körpergewicht normalisiert wurden, zu erkennen (*Cacna1c*^{+/-}: 2.93±0.1 mg/g vs WT: 2.97±0.1 mg/g; p=0.697). Auch bei der Normalisierung des Gewichts der Kammern auf die Tibiallänge des Tieres waren keine Unterschiede zwischen den linksventrikulären Gewichten (*Cacna1c*^{+/-}: 20.89±1.2 mg/mm vs WT: 21.78±1.3 mg/mm; p=0.631), als auch den rechtsventrikulären Gewichten (*Cacna1c*^{+/-}: 4.23±0.2 mg/mm vs WT: 4.05±0.2 mg/mm; p=0.556) zu erkennen. Dementsprechend zeigten *Cacna1c*^{+/-}-Tiere keine Anzeichen einer Rechts- oder Linksherz-Hypertrophie oder -Hypotrophie.

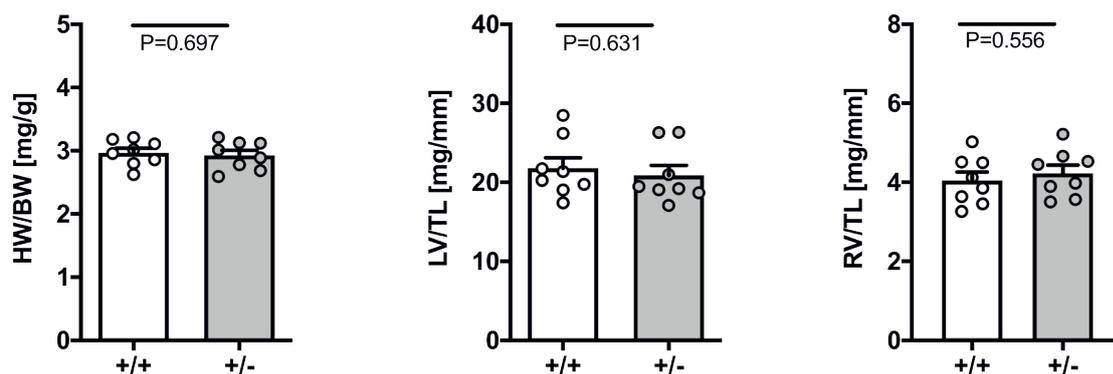


Abbildung 3-1: *Cacna1c*^{+/-}-Tiere zeigen keine Anzeichen einer Herzhyper- oder -hypotrophie. Normalisierung des Herzgewichts auf das Körpergewicht (HW/BW). Normalisierung des linksventrikulären Gewichts auf die Tibiallänge (LV/TL), und des rechtsventrikulären Gewichts auf die Tibiallänge (RV/TL). N=8 (WT); N=8 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test. Diese Daten wurden von Dr. Jelena Plačkić erhoben und mit ihrem Einverständnis in diese Arbeit aufgenommen.

3.2.1 *Cacna1c*^{+/-}-Tiere zeigen einen verminderten Blutdruck bei unveränderter Herzfrequenz

Als eine weitere basale Charakterisierung des Rattenmodells wurden in vivo sowohl der Blutdruck als auch die Herzfrequenz der Tiere untersucht. Diese Versuche wurden mit einem nicht-invasiven CODA™ Tail-cuff-System durchgeführt. Während die Ratten sich in einer Haltevorrichtung befanden, wurde mittels am Schwanz angebrachter Manschetten der Blutdruck gemessen. Pro Tier wurden mindestens zehn unabhängige Messzyklen durchgeführt und gemittelt. Bei diesen Messungen (Abbildung 3-2) zeigten Tiere des Genotyps *Cacna1c*^{+/-} signifikant niedrigere diastolische (*Cacna1c*^{+/-}: 80.3±1.3 mmHg vs WT: 87.9±2.5 mmHg; p=0.006) und systolische (*Cacna1c*^{+/-}: 120.8±1.7 mmHg vs WT: 130.0±2.7 mmHg; p=0.006) Blutdruckwerte um annähernd ≈10 mmHg im Vergleich zum Wildtyp. Diese erniedrigten Blutdruckwerte waren unabhängig von der Herzfrequenz, die mit ≈400 Schlägen pro Minute in beiden Gruppen vergleichbar war (*Cacna1c*^{+/-}: 414±11 bpm vs WT: 396±11 bpm; p=0.282).

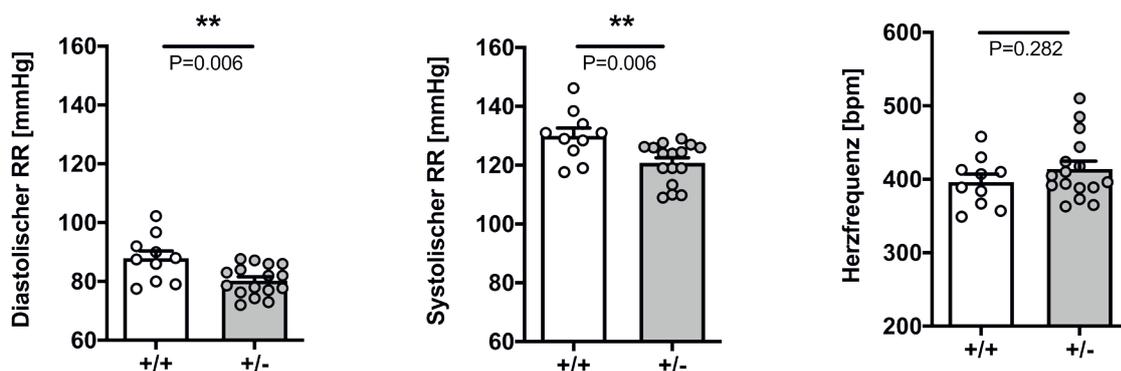


Abbildung 3-2: *Cacna1c*^{+/-}-Tiere zeigen niedrigere diastolische und systolische Blutdruckwerte, bei unveränderter Herzfrequenz

N=10 (WT); N=16 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test.

3.2.2 Expression der Calcium-regulierenden Proteine im Ventrikelmyokard unter basalen Bedingungen

3.2.2.1 Verminderte Cav1.2-Expression aber stärkere Phosphorylierung an Ser1928 in *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikelmyokard

Zunächst wurde in Western Blot-Experimenten die Expression der Cav1.2-Proteinlevel in linksventrikulärem (LV) Gewebe von *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Tieren untersucht (Abbildung 3-3). Wie in Abb. 3-3 a) zu sehen ist, war die Expression von Cav1.2 in *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikelmyokard um etwa ~30% signifikant reduziert (*Cacna1c*^{+/-}: 0.67 ± 0.07 vs WT: 1.00 ± 0.08 ; $p=0.008$). Der Ca-Strom durch die Kanäle wird allerdings nicht allein über die Proteinexpression, sondern auch über deren Phosphorylierungsgrad und die Expression von akzessorischen Untereinheiten reguliert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass der Phosphorylierungsgrad von Cav1.2 an der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser1928 (Abb.3-3, b) in *Cacna1c*^{+/-} signifikant erhöht war (*Cacna1c*^{+/-}: 1.69 ± 0.24 vs WT: 1.00 ± 0.08 ; $p=0.021$).

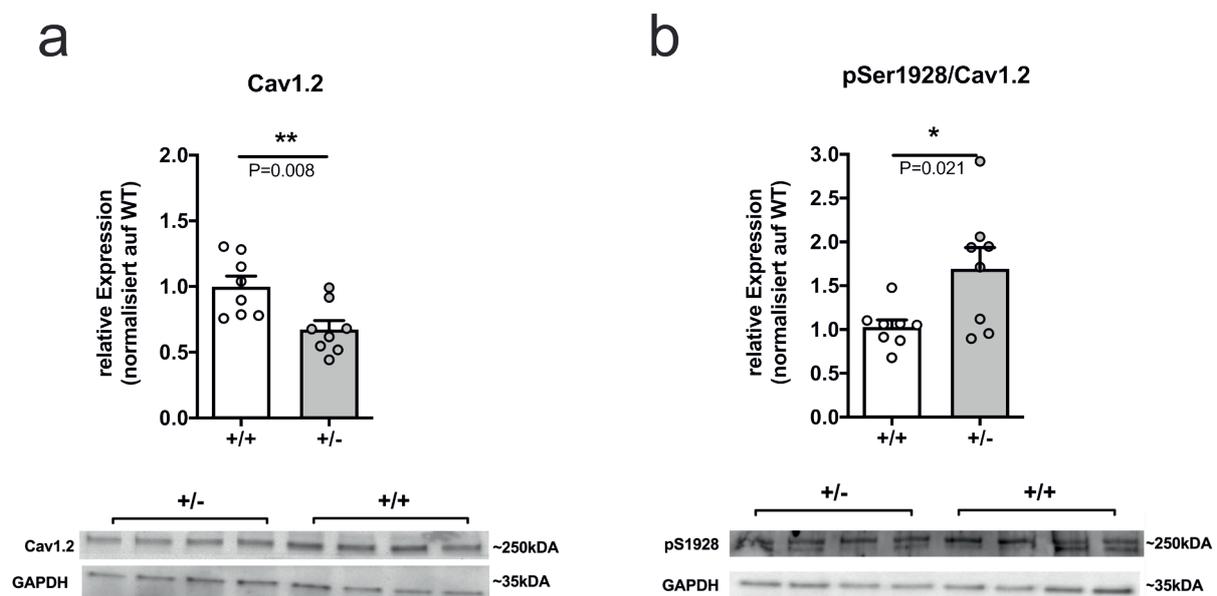


Abbildung 3-3: Ca_v1.2-Western Blots von LV Gewebe

(a) verminderte Expression von Cav1.2 in *Cacna1c*^{+/-} aber (b) stärkerer Phosphorylierungsgrad an pSer1928. Normalisiert auf GAPDH. N=8 (WT); N=8 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test.

3.2.2.2 Unveränderte Expression von $Ca_v1.3$ und $Ca_v\beta2$ in $Cacna1c^{+/-}$ -Ventrikulmyokard

Im nächsten Schritt wurde in LV Gewebe die Proteinexpression der $Ca_v1.3$ -Isoform, welche hauptsächlich in atrialen Myozyten vorkommt, untersucht. Untersucht wurde hierbei, ob in Folge verminderter $Ca_v1.2$ Expression kompensatorisch die $Ca_v1.3$ -Isoform oder die $Ca_v\beta2$ -Untereinheit stärker exprimiert wird. Die Proteinlevel der $Ca_v1.3$ -Isoform (Abbildung 2-4 (a)) waren allerdings nicht stärker exprimiert, sondern im Gegenteil um etwa $\approx 25\%$ reduziert ($Cacna1c^{+/-}$: 0.75 ± 0.09 vs WT: 1.00 ± 0.04 ; $p=0.018$). Die Expression der Untereinheit $Ca_v\beta2$ (b), die eine Rolle im Transport des Kanals zur Zellmembran spielen soll, lag in beiden Genotypen auf demselben Level ($Cacna1c^{+/-}$: 1.03 ± 0.09 vs WT: 1.00 ± 0.07 ; $p=0.793$).

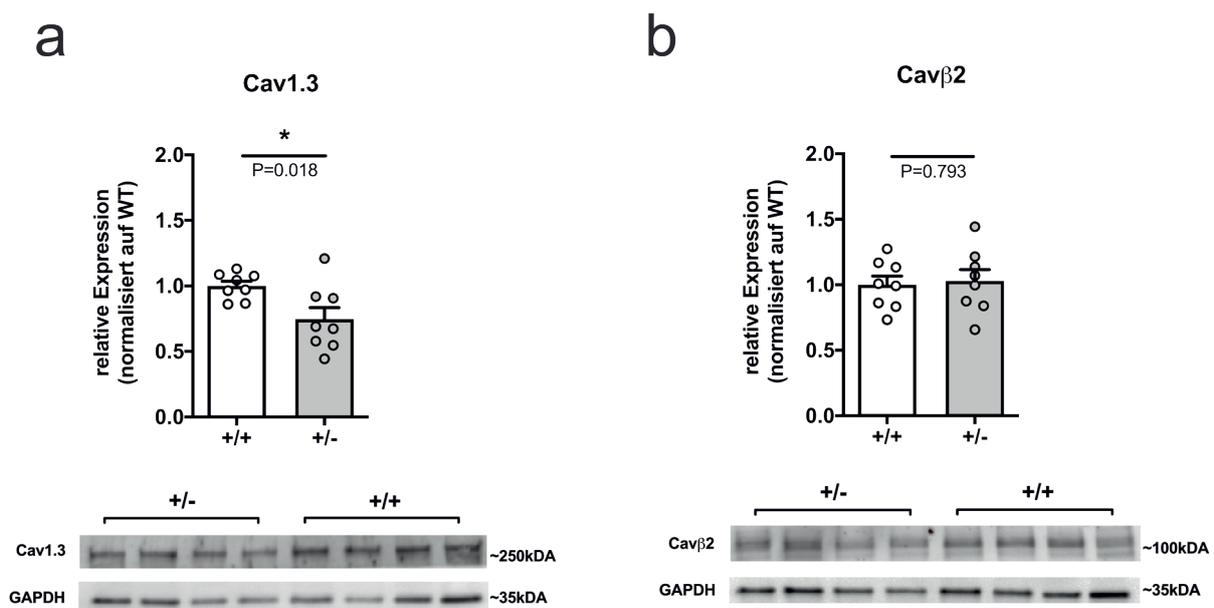


Abbildung 3-4: $Ca_v1.3$ - und $Ca_v\beta2$ -Western Blots von LV Gewebe

(a) Verminderte Expression von $Ca_v1.3$ in $Cacna1c^{+/-}$ bei (b) gleichbleibender Expression der $Ca_v\beta2$ -Untereinheit. N=8 (WT); N=8 ($Cacna1c^{+/-}$); zweiseitiger t-Test.

3.2.2.3 Calcium-regulierende Proteine in LV Myokard von *Cacna1c*^{+/-}-Tieren unterliegen einem Remodeling

In Western Blot-Experimenten von LV Gewebe wurde außerdem die Expression und Phosphorylierung der wichtigsten Calcium-regulierenden Proteine untersucht. In Abbildung 3-5 werden dazu unter A) originale Western Blots gezeigt und unter B) die auf die Expression des WT normalisierten Ergebnisse. Hierbei zeigte sich, dass die Calcium-regulierenden Proteine in *Cacna1c*^{+/-} einem substantiellen Remodeling unterliegen. Die Expression des im SR als Calciumpuffer fungierenden Proteins Calsequestrin (CSQ) war hierbei in *Cacna1c*^{+/-} unverändert (*Cacna1c*^{+/-}: 1.11±0.07 vs WT: 1.00±0.06; p=0.236). Ebenso lagen die Proteinlevel des Ryanodin-Rezeptors (RyR2) (*Cacna1c*^{+/-}: 0.91±0.09 vs WT: 1.00±0.06; p=0.452), sowie die Expressionslevel von Phospholamban (PLB) (*Cacna1c*^{+/-}: 0.83±0.05 vs WT: 1.00±0.10; p=0.149) in beiden Genotypen auf einem ähnlichen Niveau. Bei den Proteinen, die Ca aus dem Zytosol ausschleusen, konnte allerdings eine signifikant höhere Expression der Proteinlevel festgestellt werden. Expressionslevel des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) waren hierbei um etwa ≈20% erhöht (*Cacna1c*^{+/-}: 1.20±0.07 vs WT: 1.00±0.06; p=0.049) und die der SR/ER-Ca-ATPase (SERCA2a) um annähernd ≈50% (*Cacna1c*^{+/-}: 1.46±0.17 vs WT: 1.00±0.10; p=0.035). Im Weiteren wurden in den Proteinen RyR2 und PLB die Ziele der PKA- und CaMKII-abhängigen Phosphorylierung untersucht. In Bezug auf die Phosphorylierungsstellen des RyR2 waren Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen. In *Cacna1c*^{+/-} war das PKA-Ziel Ser2808 mit einer 2-fachen Steigerung signifikant stärker phosphoryliert als im WT (*Cacna1c*^{+/-}: 2.19±0.26 vs WT: 1.0±0.10; p<0.001). Phosphorylierungen am CaMKII-Ziel Ser2814 zeigten hingegen einen nicht signifikanten Trend zu reduzierten Leveln (≈25%) im Vergleich zum WT (*Cacna1c*^{+/-}: 0.75±0.11 vs WT: 1.0±0.15; p=0.205). In Hinsicht auf den Phosphorylierungsgrad des Proteins PLB waren sowohl die PKA-Phosphorylierung an Ser16 (*Cacna1c*^{+/-}: 1.09±0.09 vs WT: 1.0±0.16; p=0.780), als auch die CaMKII-Phosphorylierung an Thr17 (*Cacna1c*^{+/-}: 1.24±0.22 vs WT: 1.0±0.16; p=0.432) unverändert.

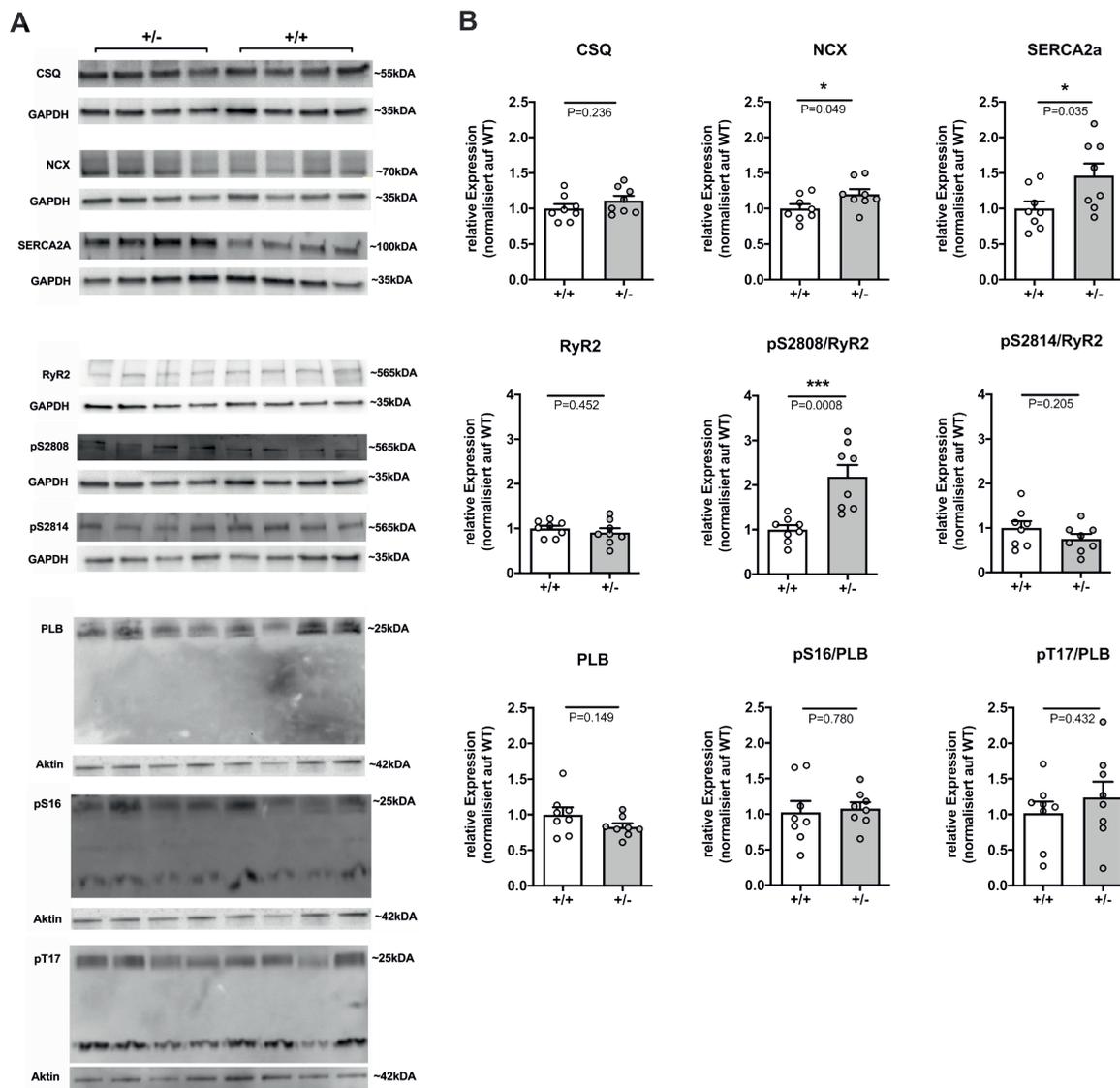


Abbildung 3-5 Expression und Phosphorylierung der Calcium-regulierenden Proteine

(A) Original Western Blots der wichtigsten Ca-regulierenden Proteine. (B) Remodeling in *Cacna1c*^{+/-}- linksventrikulärem Myokard einhergehend mit einer gesteigerten Expression von NCX, SERCA2a und RyR2pS2808. N=8 (WT); N=8 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test.

3.2.3 Calcium-Regulation in elektrisch-stimulierten Ventrikelmyozyten unter basalen Bedingungen

3.2.3.1 Elektrisch-stimulierte Calciumtransienten in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten sind unverändert

Elektrisch-stimulierte Calciumtransienten (CaT) wurden in mit Fluo-4 beladenen, isolierten Ventrikelmyozyten an zwei unterschiedlichen Messständen untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert und die Protokolle sowohl am Zeiss LSM510 im Linescan-Modus als auch am Visitech-2D-Konfokalmikroskop durchgeführt. In Abbildung 3-6 sind unter (A) beispielhafte CaT sowie die zugehörigen originalen Linescan-Aufnahmen der jeweiligen Genotypen abgebildet. Bei einer basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz konnte am Zeiss LSM510 (Abb. 3-6, B) kein Unterschied der CaT zwischen WT und *Cacna1c*^{+/-} festgestellt werden. Sowohl das diastolische Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 1.28 ± 0.02 F_0/F_{rest} vs WT: 1.31 ± 0.03 F_0/F_{rest} ; $p=0.158$) als auch das systolische Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 5.23 ± 0.13 F/F_{rest} vs WT: 5.43 ± 0.20 F/F_{rest} ; $p=0.812$) waren vergleichbar. Dementsprechend zeigten sich auch keine Unterschiede hinsichtlich der CaT-Amplitude (*Cacna1c*^{+/-}: 3.96 ± 0.12 dF/F_{rest} vs WT: 4.12 ± 0.20 dF/F_{rest} ; $p=0.954$). Im Hinblick auf die kinetischen Parameter der CaT zeichneten sich ebenfalls keine Veränderungen ab. Sowohl die Anstiegszeit der Transienten (*Cacna1c*^{+/-}: 27.5 ± 1.3 ms vs WT: 31.4 ± 2.0 ms; $p=0.169$) als auch die Werte der Abfallzeitkonstante Tau (*Cacna1c*^{+/-}: 246 ± 9 ms vs WT: 254 ± 13 ms; $p=0.622$) waren nicht vom WT zu unterscheiden.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse an einem zweiten Messstand, dem Visitech-2D-Konfokalmikroskop (Abb. 3-6, C), an dem ein größerer Bereich der Zelle gemessen werden konnte. Auch hier lagen das diastolische Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 1.49 ± 0.07 F_0/F_{rest} vs WT: 1.30 ± 0.07 F_0/F_{rest} ; $p=0.080$), das systolische Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 5.62 ± 0.24 F/F_{rest} vs WT: 5.36 ± 0.30 F/F_{rest} ; $p=0.519$) und die CaT-Amplitude (*Cacna1c*^{+/-}: 4.13 ± 0.24 dF/F_{rest} vs WT: 4.06 ± 0.29 dF/F_{rest} ; $p=0.871$) unverändert vor. Eine Unterscheidung der Genotypen bezüglich der kinetischen Parameter Anstiegszeit (*Cacna1c*^{+/-}: 48.5 ± 1.1 ms vs WT: 52.7 ± 2.0 ms, $p=0.116$) und Abfallzeitkonstante Tau (*Cacna1c*^{+/-}: 369 ± 28 ms vs WT: 354 ± 38 ms; $p=0.735$) war auch an diesem Messstand nicht möglich.

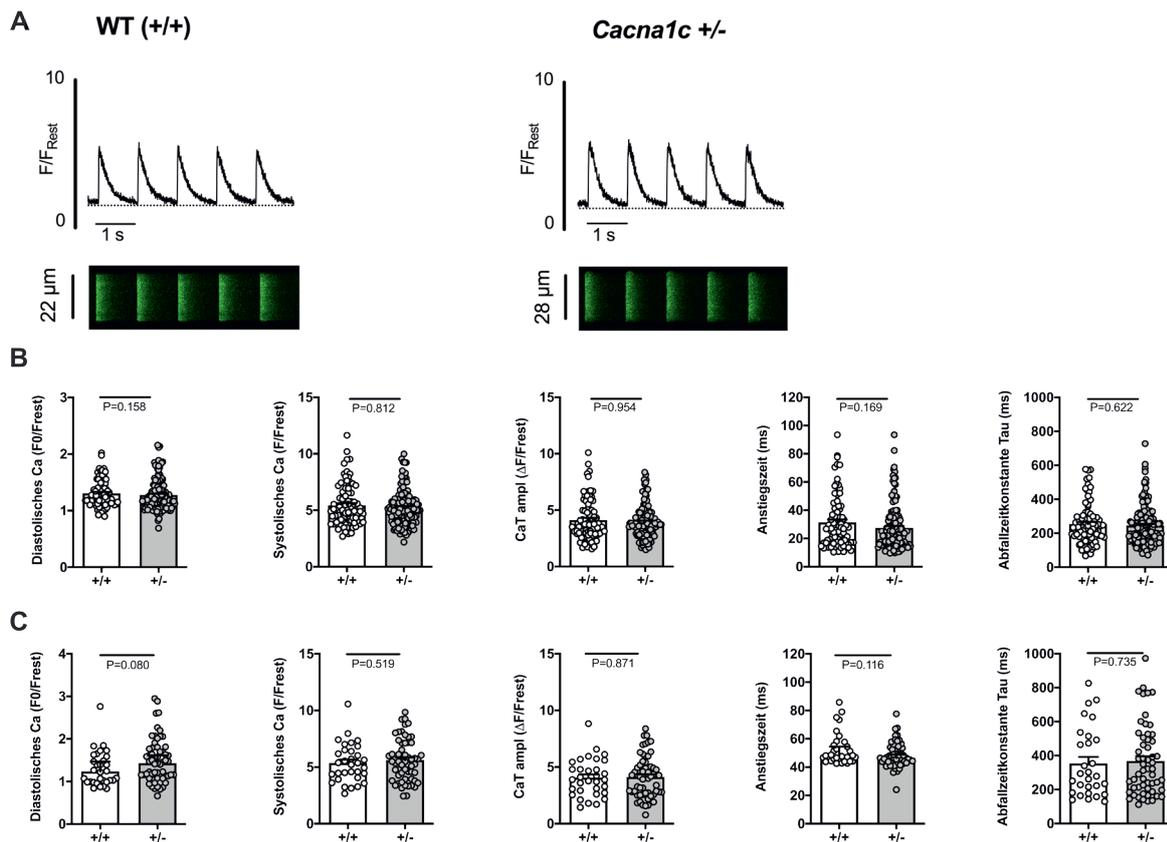


Abbildung 3-6: Messung elektrisch-stimulierter CaT unter basalen Bedingungen (1 Hz)

(A) Originale LineScan-Bilder und zugehörige CaT für WT und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten. (B) Analytierte Parameter der CaT am LSM 510 im LineScan-Modus. n=85, N=8 (WT); n=145, N=14 (*Cacna1c*^{+/-}); Mann-Whitney U-Test (C) Parameter der CaT am 2D-Konfokalmikroskop. n=32, N=3 (WT); n=59, N=6 (*Cacna1c*^{+/-}); Mann-Whitney U-Test. Die Display Range der LineScan-Bilder beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-600.

3.2.3.2 Unveränderte SR-Ca-Beladung und fraktionelle Ca-Freisetzung in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten

Zur Bestimmung der SR-Calciumbeladung und der fraktionellen Ca-Freisetzung aus dem SR wurde am Zeiss LSM510 im Linescan-Modus ein Koffeinprotokoll durchgeführt (Abbildung 3-7). Bei diesem wurden die Zellen zunächst elektrisch stimuliert (1 Hz), im Anschluss die Stimulation gestoppt und ein Koffeinbolus (20 mM) in die Kammer gegeben (Abb. 3-7, A). Der Koffeinbolus führte zu einer Freisetzung des gesamten SR-Ca-Gehalts, welches in einem Koffeintransienten resultierte. Als ein Maß für die SR-Ca-Beladung wurde die Amplitude des Koffeintransienten herangezogen (Abb. 3-7, B). Die Amplitude der elektrisch-stimulierten CaT bei 1 Hz normiert auf die Amplitude des Koffeintransienten entspricht der fraktionellen Ca-Freisetzung. In diesem Protokoll (Abb. 3-7, C) zeigten sich keine Unterschiede in den Amplituden der Koffeintransienten (*Cacna1c*^{+/-}: 5.67 ± 0.35 dF/ F_{rest} vs WT: 4.98 ± 0.43 dF/ F_{rest} ; $p=0.223$) und damit in der SR-Ca-Beladung zwischen WT und *Cacna1c*^{+/-}. Der pro Stimulation aus dem SR freigesetzte Ca-Anteil war mit einer fraktionellen Ca-Freisetzung von $\approx 60\%$ ebenfalls vergleichbar zwischen beiden Gruppen (*Cacna1c*^{+/-}: 0.64 ± 0.04 vs WT: 0.62 ± 0.07 ; $p=0.844$). Auch die Abfallzeitkonstante Tau des Koffeintransienten unterschied sich nicht (*Cacna1c*^{+/-}: 2078 ± 239 ms vs WT: 1983 ± 202 ms; $p=0.780$).

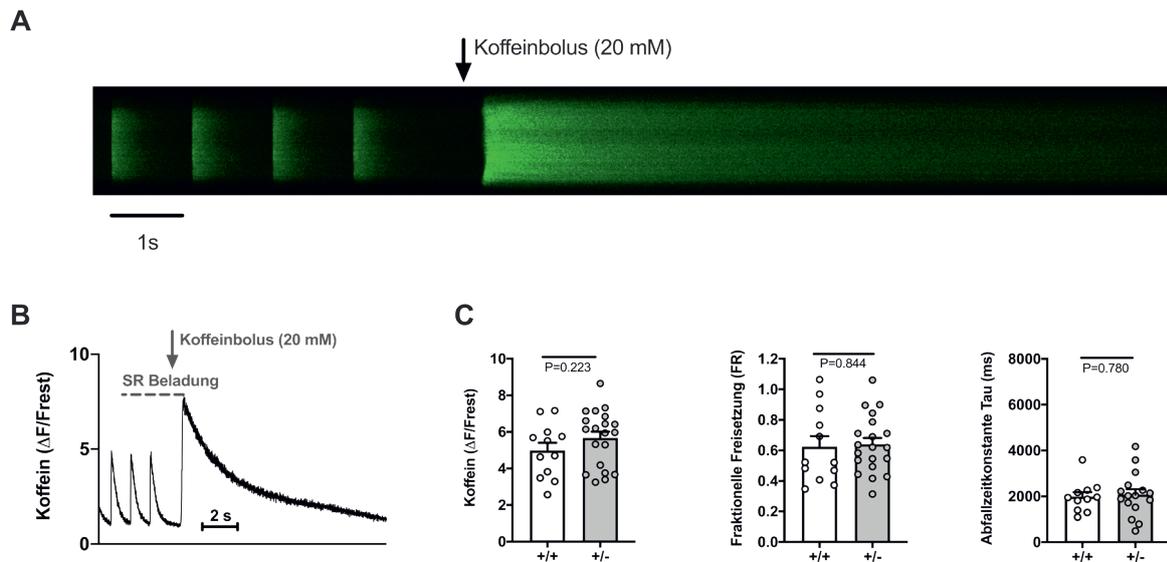


Abbildung 3-7: Koffeinapplikation unter basalen Bedingungen

(A) Originale Linescan-Aufnahme mit vier elektrisch-stimulierten CaT und einem Koffeintransienten nach Bolusapplikation. (B) Koffeinprotokoll zur Messung der SR-Ca-Beladung und der fraktionellen Ca-Freisetzung. (C) *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten zeigten keine Unterschiede in der Amplitude des Koffeintransienten und der fraktionellen Ca-Freisetzung. n=12, N=4 (WT); n=20, N=3 (*Cacna1c*^{+/-}); Tau: n=11 (WT); n=16 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test. Die Zellzahl für Tau ist aus einem der folgenden Gründe reduziert: Die Messung war beendet, bevor der Abfall komplett war; der Abfall folgte keinem exponentiellen Trend; die Zelle bewegte sich aus dem Sichtfeld der Messung. Die Display Range der originalen Linescan-Aufnahme beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-2000.

3.3 Stress-Bedingungen: Nachahmung erhöhter Sympathikusaktivität

3.3.1 Die ISO-vermittelte Erhöhung des CaT ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer ausgeprägt

Als nächstes sollte die mit Sympathikusaktivierung einhergehende, physiologisch vorkommende Erhöhung des CaT in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten untersucht werden. Hierzu wurde ISO (100 nM) verwendet, welches als β -adrenerger Agonist in der Lage ist, an die β -Adrenozeptoren (AR) der Kardiomyozyten zu binden, den β AR-cAMP-PKA-Signalweg zu aktivieren und somit die intrazelluläre Ca-Konzentration zu erhöhen und die Transienten zu beschleunigen (Ginsburg and Bers, 2004). Dabei wurde eine ISO-Konzentration von 100 nM gewählt, um einen annähernd maximalen Effekt zu erreichen.

Die Ventrikelmyozyten wurden hierzu am Zeiss-LSM 510 im Linescan-Modus zunächst mit Mess-Lösung superfundiert und mit 1 Hz stimuliert. Nach einer basalen Aufnahme der CaT wurde auf 100 nM ISO umgestellt und die CaT der Zellen nach vier Minuten Behandlung gemessen. In Abbildung 3-8, (A) sind originale Linescan-Aufnahmen und die daraus resultierenden CaT unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit 100 nM ISO im WT abgebildet. Isoprenalin führte hier zu einer deutlichen Vergrößerung der CaT-Amplitude und zu einer Beschleunigung der Transienten. In den Originalspuren von *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten (Abb. 3-8, B) beschleunigte und vergrößerte ISO die CaT ebenfalls. Die ISO-vermittelte Erhöhung der CaT war in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten jedoch sichtlich schwächer ausgeprägt.

In Abb. 3-8 (C) ist zu erkennen, dass das diastolische Ca unter Kontrollbedingungen (links) keinen Unterschied zwischen den Gruppen aufwies (*Cacna1c*^{+/-}: 1.19 ± 0.03 F/F_{rest} vs WT: 1.23 ± 0.03 F/F_{rest}). Die ISO-Behandlung führte in beiden Genotypen zu einer ebenbürtigen Erhöhung des diastolischen Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 1.40 ± 0.04 F/F_{rest} vs WT: 1.37 ± 0.06 F/F_{rest}). Die systolischen Ca-Werte (D) lagen unter basalen Bedingungen ebenfalls auf demselben Level (*Cacna1c*^{+/-}: 5.23 ± 0.29 F/F_{rest} vs WT: 5.91 ± 0.51 F/F_{rest}). Die ISO-abhängige Erhöhung des systolischen Ca war jedoch in den *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten deutlich schwächer ausgeprägt, so dass sich hier ein Unterschied zwischen den Gruppen mit signifikant niedrigeren Werten in

Cacna1c^{+/-}-Myozyten ergab (*Cacna1c*^{+/-}: 8.85±0.37 F/F_{rest} vs WT: 10.73±0.44 F/F_{rest}). Ebenso war die CaT-Amplitude (E) unter basalen Bedingungen vergleichbar (*Cacna1c*^{+/-}: 4.04±0.28 dF/F_{rest} vs WT: 4.69±0.50 dF/F_{rest}), nach ISO Behandlung jedoch signifikant kleiner in den *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten (*Cacna1c*^{+/-}: 7.45±0.37 dF/F_{rest} vs WT: 9.36±0.40 dF/F_{rest}).

Die ISO-Behandlung führte außerdem zu einer deutlichen Beschleunigung der Abfallzeitkinetiken der CaT, welche sowohl in WT- als auch *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ähnlich groß war. Unter basalen Bedingungen lagen die Werte der Abfallzeitkonstante Tau in beiden Gruppen bei etwa ≈230 ms (*Cacna1c*^{+/-}: 223.3±9.97 ms vs WT: 235.6±21.86 ms), nach Behandlung mit dem β-adrenergen Agonisten beschleunigte sich diese auf etwa ≈90 ms in WT und *Cacna1c*^{+/-} (*Cacna1c*^{+/-}: 89.98±5.00 ms vs WT: 87.50±4.55 ms).

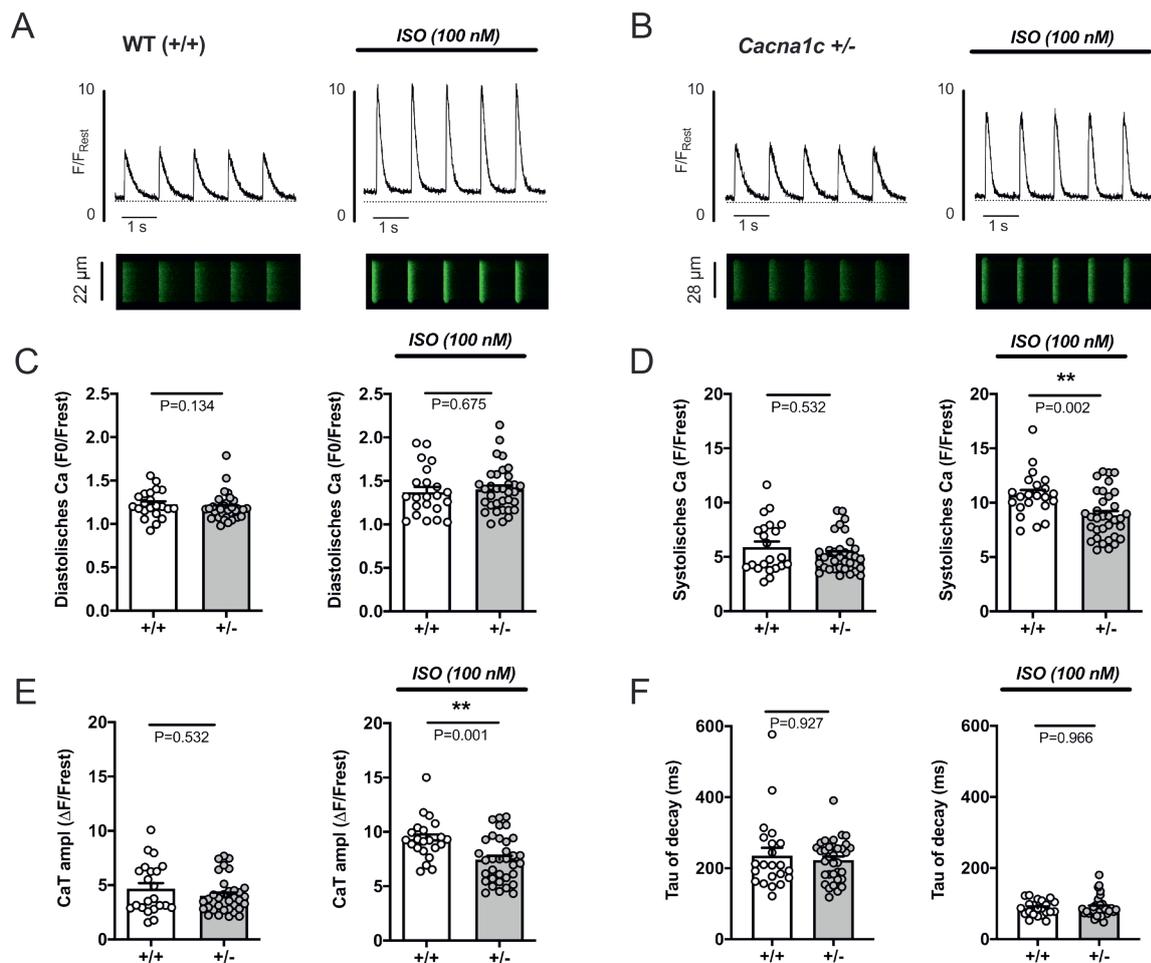


Abbildung 3-8 Isoprenalin-Behandlung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten

Originale Linescan-Bilder und entsprechende CaT vor und nach Behandlung mit ISO (100 nM) für (A) WT- und (B) *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten. Der linke Graph zeigt jeweils die Daten vor ISO-Behandlung, der rechte danach. (C) Das diastolische Ca erhöht sich durch ISO in beiden Gruppen vergleichbar stark. (D) Das systolische Ca ist nach ISO-Behandlung erhöht, jedoch signifikant kleiner in *Cacna1c*^{+/-}. (E) Die ISO-vermittelte Erhöhung der CaT-Amplitude ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ebenfalls weniger stark ausgeprägt. (F) Die Beschleunigung der Abfallzeitkonstante ist in beiden Gruppen vergleichbar. n=22, N=5 (WT); n=34, N=8 (*Cacna1c*^{+/-}); Mann-Whitney U-Test. Die Display Range der Linescan-Bilder nach Hintergrundkorrektur beträgt 0-800.

3.3.2 Die ISO-vermittelte Erhöhung der fraktionellen Ca-Freisetzung ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer ausgeprägt

In einem Koffeinprotokoll wurde die SR-Ca-Regulation in Gegenwart von ISO (100 nM) untersucht. Dafür wurde im Anschluss an die ISO-Behandlung ein Koffeinprotokoll (entsprechend Abbildung 3-7 (A,B)) durchgeführt. Die dabei resultierenden Koffeintransienten (Abbildung 3-9) unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht hinsichtlich ihrer Amplitude (*Cacna1c*^{+/-}: 3.18 ± 0.31 dF/ F_{rest} vs WT: 3.63 ± 0.33 dF/ F_{rest}), was auf eine vergleichbare SR-Ca-Beladung schließen ließ. Nach ISO-Behandlung erhöhte sich, im Vergleich zu den Untersuchungen bei basalen Bedingungen (siehe 3.2.3.2), in beiden Genotypen die fraktionelle Ca-Freisetzung. Im WT erhöhte sich der Anteil des freigesetzten Ca dabei von ≈ 64 % unter basalen Bedingungen auf ≈ 92 % unter Einfluss von ISO. In *Cacna1c*^{+/-} hingegen lag die fraktionelle Ca-Freisetzung unter basalen Bedingungen bei ≈ 62 % und erhöhte sich lediglich auf ≈ 76 % nach Behandlung mit ISO. Damit war die ISO-vermittelte Erhöhung der fraktionellen Ca-Freisetzung deutlich schwächer ausgeprägt in *Cacna1c*^{+/-} und resultierte somit in einer signifikant kleineren fraktionellen Ca-Freisetzung in *Cacna1c*^{+/-} (*Cacna1c*^{+/-}: 0.76 ± 0.03 vs WT: 0.92 ± 0.03). Die Abfallzeitkonstante Tau der durch Koffein-induzierten CaT war in beiden Gruppen unverändert (*Cacna1c*^{+/-}: 1778 ± 211 ms vs WT: 1836 ± 350 ms), ebenso wie unter basalen Bedingungen beobachtet.

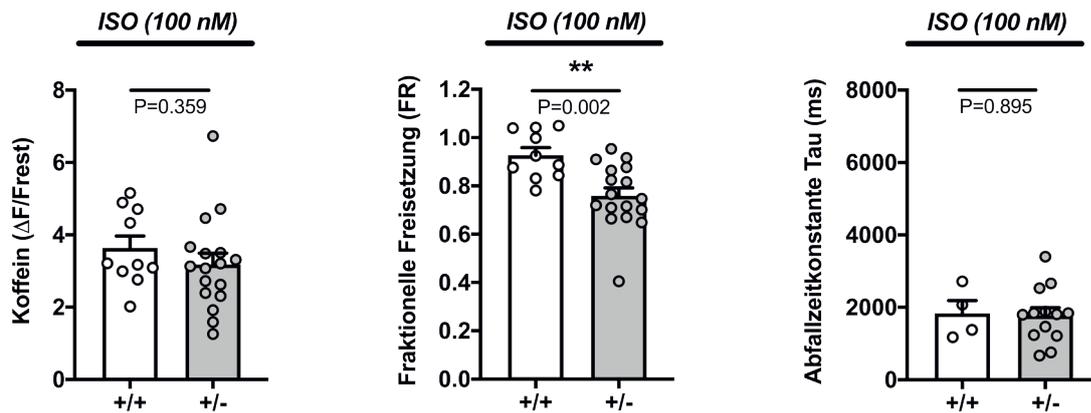


Abbildung 3-9: Koffeinapplikation in Gegenwart von ISO (100 nM)

Vergleichbarer SR-Ca-Gehalt in den Genotypen ohne signifikante Unterschiede in der Amplitude der Koffeintransienten. *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten zeigen eine signifikant kleinere fraktionelle Ca-Freisetzung nach ISO-Behandlung als WT-Myozyten. Unveränderte Abfallzeitkonstante Tau. n=10, N=2 (WT), n=17, N=3 (*Cacna1c*^{+/-}); für die Abfallzeitkonstante Tau: n=4 (WT), n=13 (*Cacna1c*^{+/-}); zweiseitiger t-Test. Die Zellzahl für Tau ist aus einem der folgenden Gründe reduziert: Die Messung war beendet, bevor der Abfall komplett war; der Abfall folgte keinem exponentiellen Trend; die Zelle bewegte sich aus dem Sichtfeld der Messung.

3.3.3 Frequenzabhängigkeit der CaT: Kleinere CaT-Amplitude in Gegenwart von ISO bei allen untersuchten Frequenzen in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten

Für die Nachahmung einer bei Sympathikusaktivierung auftretenden Erhöhung der Herzfrequenz (positive Chronotropie), wurde die Frequenzabhängigkeit der CaT in isolierten Myozyten am LSM 510 untersucht. Dabei wurde die ISO-Behandlung mit dem Frequenzprotokoll kombiniert, da auch physiologischerweise beide Effekte gemeinsam auftreten. In dem Protokoll wurde nach Behandlung mit ISO (100 nM) schrittweise die Stimulationsfrequenz von 1 Hz über 2 Hz auf 4 Hz erhöht und die CaT jeweils nach 20 Sekunden gemessen.

In Gegenwart von ISO erhöhte sich das diastolische Ca mit steigenden Frequenzen in beiden Genotypen gleichermaßen stark (Abbildung 3-10). Das durch die vorherige ISO-Behandlung bereits angehobene systolische Ca erhöhte sich nicht mit steigenden Frequenzen weiter, sondern blieb in beiden Genotypen über die Protokolldauer nahezu konstant. Die CaT-Amplituden beider Genotypen verzeichneten mit steigenden Frequenzen eine leichte Abnahme. Die Abfallzeitkonstanten waren bei allen untersuchten Frequenzen in beiden Gruppen nahezu identisch.

Wie bereits in 3.3.1 erläutert wurde, zeigten *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten einen abgeschwächten ISO-Effekt einhergehend mit kleineren CaT-Amplituden und niedrigeren systolischen Ca-Leveln bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz. In *Cacna1c*^{+/-} und WT stieg das diastolische Ca bei einer Frequenz von 2 Hz im gleichen Maße an (*Cacna1c*^{+/-}: 1.72 ± 0.08 F/F_{rest} vs WT: 1.65 ± 0.09 F/F_{rest}, $p > 0.99$) und erhöhte sich noch stärker bei einer Frequenz von 4 Hz (4 Hz *Cacna1c*^{+/-}: 2.47 ± 0.15 F/F_{rest} vs WT: 2.46 ± 0.18 F/F_{rest}, $p > 0.99$). Die nach ISO-Behandlung zuvor beobachtete kleinere CaT-Amplitude bei 1 Hz blieb sowohl bei einer Frequenz von 2 Hz (*Cacna1c*^{+/-}: 7.53 ± 0.41 dF/F_{rest} vs WT: 9.13 ± 0.42 dF/F_{rest}; $p = 0.027$) als auch bei 4 Hz signifikant kleiner als die des WT (*Cacna1c*^{+/-}: 6.75 ± 0.35 dF/F_{rest} vs WT: 8.57 ± 0.44 dF/F_{rest}; $p = 0.009$). Dasselbe traf auf die systolischen Ca-Werte zu, die ebenfalls bei 2 Hz (*Cacna1c*^{+/-}: 9.25 ± 0.44 F/F_{rest} vs WT: 10.78 ± 0.48 F/F_{rest}; $p = 0.076$) und 4 Hz deutlich niedriger blieben als die der Kontrollgruppe (4 Hz *Cacna1c*^{+/-}: 9.23 ± 0.42 F/F_{rest} vs WT: 11.04 ± 0.57 F/F_{rest}; $p = 0.024$). Entsprechend der

Untersuchungen bei 1 Hz in Gegenwart von ISO zeigten sich auch bei höheren Frequenzen keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Abfallzeitkonstante Tau (4 Hz *Cacna1c*^{+/-}: 85.7±4.6 ms vs WT: 80.2±2.9 ms; p>0.99).

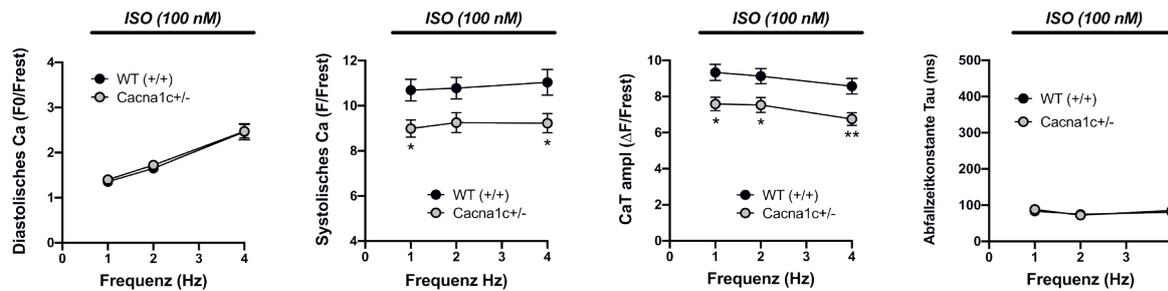


Abbildung 3-10: Frequenzabhängigkeit der CaT in Gegenwart von ISO

Sowohl das diastolische als auch das systolische Ca steigt in beiden Gruppen mit höheren Frequenzen an. Das diastolische Ca beider Genotypen steigt mit höheren Frequenzen in gleichem Maße an. Sowohl das systolische Ca als auch die CaT-Amplitude bleiben in *Cacna1c*^{+/-} bei Frequenzen von 2 Hz und 4 Hz im Vergleich zum WT signifikant kleiner. In der Abfallzeitkonstante Tau sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. n=18, N=5 (WT); n=32, N=8 (*Cacna1c*^{+/-}), Zweifache-ANOVA gefolgt von Bonferroni's multiple comparisons Test. *p<0.05, ** p<0.01.

3.3.4 Die ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten rechtsverschoben

Im nächsten Schritt wurde die Konzentrationsabhängigkeit der durch ISO-vermittelten Erhöhung der CaT-Amplitude in Myozyten von WT und *Cacna1c*^{+/-} untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 1 Hz stimuliert und mit steigenden ISO-Konzentrationen (1 - 100 nM) behandelt. Pro Zelle wurden dabei zwei bis drei unterschiedliche ISO-Konzentrationen für je vier Minuten appliziert, jede Zelle wurde abschließend 100 nM ISO superfundiert. Zunächst wurden die ermittelten CaT um den Rundown der CaT-Amplitude korrigiert, den unbehandelte Kontrollzellen (Abbildung 3-11) zum entsprechenden Zeitpunkt des Protokolls aufwiesen. Die Kontrollzellen für *Cacna1c*^{+/-} und WT zeigten hierbei ähnliche Amplitudenverkleinerungen auf $\approx 85\%$ der Ausgangsamplitude nach vier Minuten im WT und $\approx 88\%$ in *Cacna1c*^{+/-} (*Cacna1c*^{+/-}: $88.2 \pm 2.6\%$ vs WT: $84.7 \pm 2.4\%$; $p > 0.99$). Nach acht Minuten betrug die Amplitude in WT-Myozyten $\approx 76\%$ und in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten $\approx 78\%$ (*Cacna1c*^{+/-}: $78.5 \pm 3.3\%$ vs WT: $75.9 \pm 3.6\%$; $p > 0.99$) und nach zwölf Minuten in beiden Gruppen $\approx 68\%$ des Ausgangswertes (*Cacna1c*^{+/-}: $68.4 \pm 3.2\%$ vs WT: $68.7 \pm 4.3\%$; $p > 0.99$).

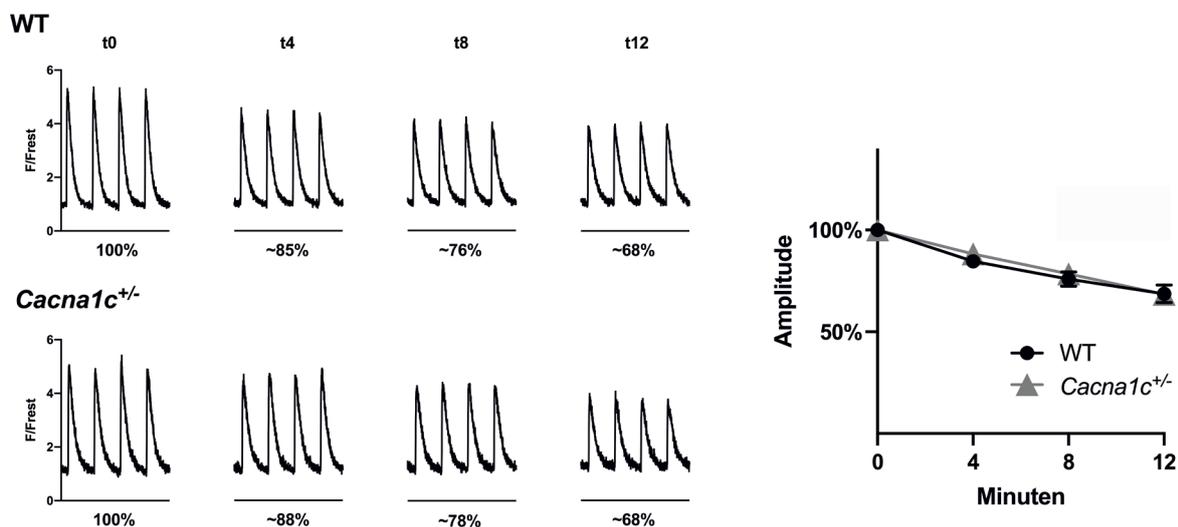


Abbildung 3-11: Zeitabhängige Verringerung (Rundown) der CaT-Amplitude

Unbehandelte Kontrollzellen für WT und *Cacna1c*^{+/-} zeigen einen vergleichbaren Rundown der CaT-Amplitude (Mittelwerte sind angegeben) über die Dauer des Protokolls von 12 Minuten. $n=17$, $N=6$ (WT); $n=22$, $N=5$ (*Cacna1c*^{+/-}), Zweifache-ANOVA gefolgt von Bonferroni's multiple comparisons Test.

Im Anschluss an die Rundown-Korrektur wurden die CaT-Amplituden der jeweiligen ISO-Konzentrationen auf die maximale Antwort bei 100 nM ISO normalisiert. Hierbei entsprach die Amplitude vor ISO-Behandlung (0 nM) einem Effekt von 0% und die erzielte Amplitude bei 100 nM ISO einem Effekt von 100%.

In Abbildung 3-12 (A) sind originale CaT des beschriebenen Protokolls für WT und *Cacna1c*^{+/-} abgebildet. Die resultierenden ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den normalisierten CaT sind in (B) zu sehen. Die daraus resultierende Regressionskurve der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten (grau) war dabei im Vergleich zur Kurve der WT-Myozyten (schwarz) nach rechts verschoben. Diese Rechtsverschiebung entspricht höherer benötigter ISO-Konzentrationen zur Erzielung des gleichen Effekts im Vergleich zum WT. Aus der Regressionsanalyse ergaben sich signifikant unterschiedliche EC₅₀-Werte von 13.0 nM für *Cacna1c*^{+/-} und von 4.1 nM für WT.

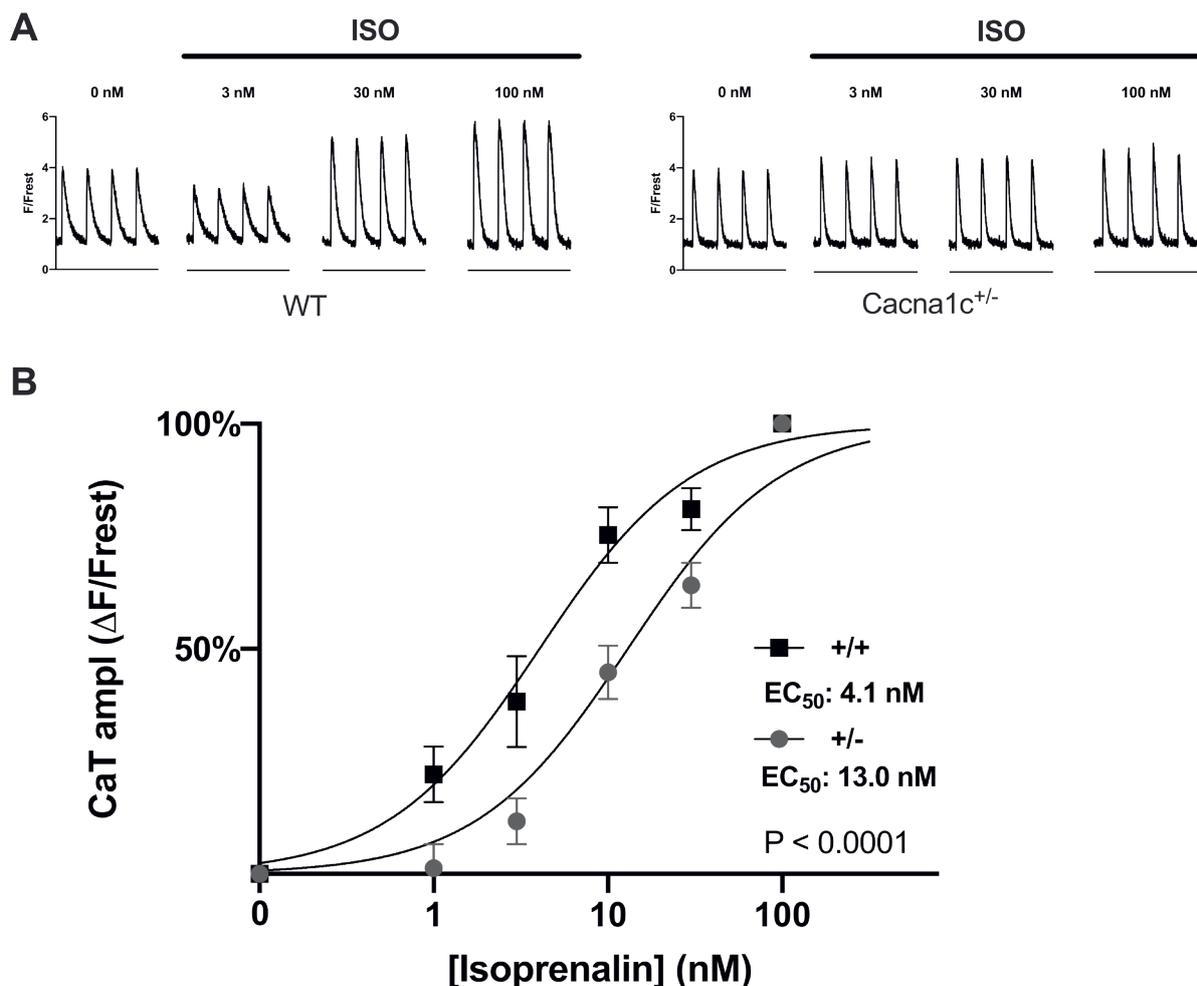


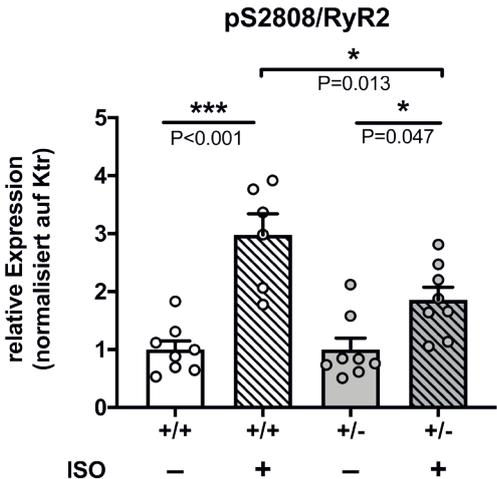
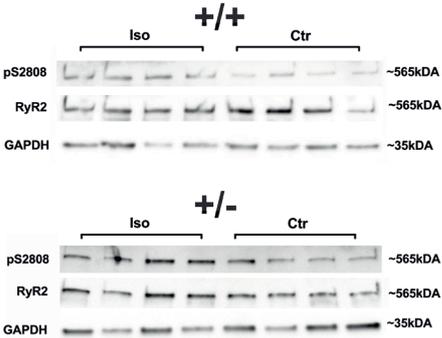
Abbildung 3-12: Die ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten rechtsverschoben

(A) Beispielspuren der CaT von WT- und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten bei Behandlung mit steigenden ISO-Konzentrationen. (B) ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurven der normalisierten CaT-Amplituden für *Cacna1c*^{+/-} (grau) und WT (schwarz). Die Rechtsverschiebung resultiert in einem EC₅₀-Wert von 13.0 nM in *Cacna1c*^{+/-} und von 4.1 nM im WT ($p < 0.0001$). 0 nM: $n=52/55$, $N=10/10$ (WT/*Cacna1c*^{+/-}); 1 nM: $n=27/17$, $N=5/4$; 3 nM: $n=17/26$, $N=4/6$; 10 nM: $n=22/24$, $N=5/6$; 30 nM: $n=21/31$, $N=5/6$; 100 nM: $n=52/55$, $N=10/10$; Nicht-lineare-Regressions-Analyse gefolgt von extra-sum-of-squares F-Test, mit dem auf die Nullhypothese getestet wurde, ob beide Kurven denselben LogEC₅₀ besitzen.

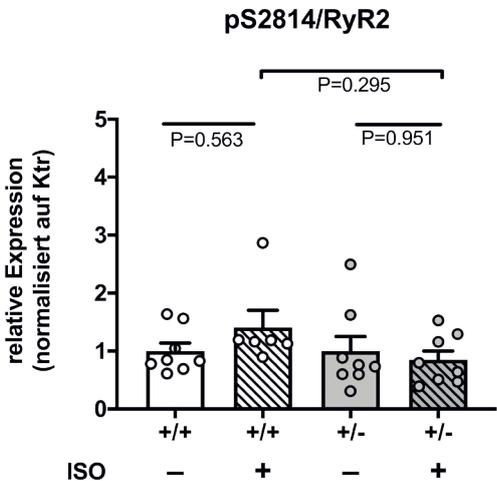
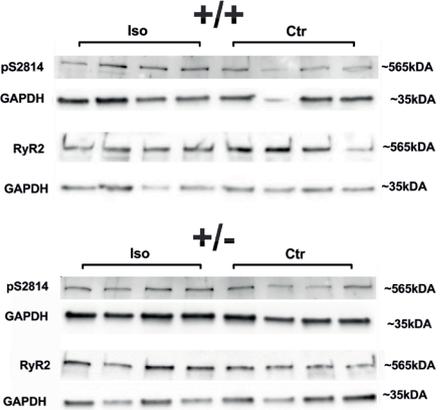
3.3.5 ISO-behandelte Herzen: Geringere Steigerung der RyR2-Phosphorylierung an Ser2808 in *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikeln

Um den Einfluss von sympathischem Stress auf den Phosphorylierungsstatus der Ca-regulierenden Proteine zu untersuchen, wurden ganze Herzen an der Langendorff-Apparatur entweder mit 100 nM ISO-Lösung oder mit einer Kontrolllösung ohne ISO perfundiert. Im Anschluss wurden die Homogenate des LV Gewebes dieser Herzen mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von RyR2, Cav1.2 und PLB an den PKA- und CaMKII-Zielen untersucht. Hierbei wurde jeweils der Phosphorylierungsstatus eines Proteins unter Kontroll- und ISO-Bedingungen in einem Genotyp analysiert. Die Genotypen untereinander wurden bezüglich der resultierenden Steigerung der Phosphorylierung verglichen. Die Ergebnisse der Proteine RyR2 und Cav1.2 sind in Abbildung 3-13 präsentiert mit originalen Western Blots (links) und den zusammengefassten Ergebnissen (rechts). In Hinsicht auf den RyR2 vermochte ISO die Phosphorylierung an Ser2808 (A) im WT annähernd zu verdreifachen (WT: 2.98 ± 0.36). Auch in *Cacna1c*^{+/-} war eine Steigerung der Phosphorylierung an dieser PKA-Phosphorylierungsstelle zu beobachten (*Cacna1c*^{+/-}: 1.86 ± 0.22), die allerdings im Vergleich zum WT signifikant schwächer ausgeprägt war. Bezüglich des CaMKII-Ziels Ser2814 (B) war weder im WT noch in *Cacna1c*^{+/-} eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung zu erkennen (*Cacna1c*^{+/-}: 0.85 ± 0.15 vs WT: 1.41 ± 0.23). Auch bei Betrachtung des PKA-Ziels Ser1928 in Cav1.2 (C) führte ISO in keiner der beiden Gruppen zu einer Steigerung der Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollherzen (*Cacna1c*^{+/-}: 0.95 ± 0.18 vs WT: 0.83 ± 0.08).

A



B



C

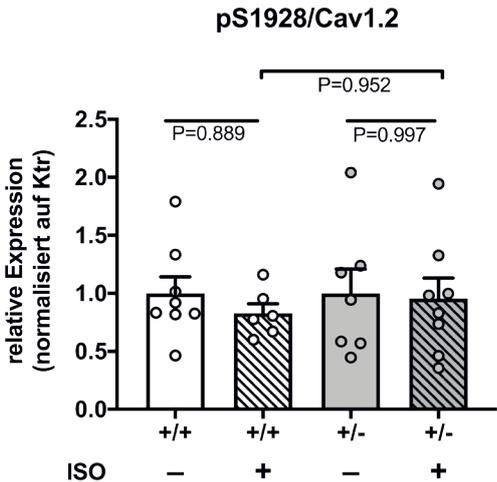
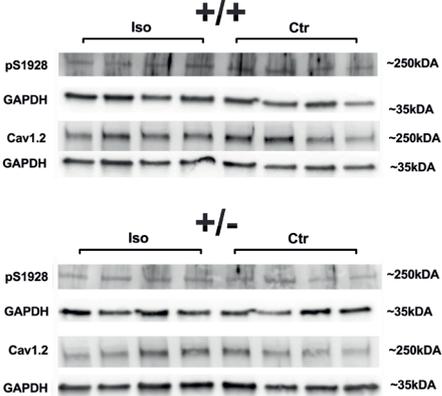


Abbildung 3-13 Phosphorylierungsstatus von RyR2 und Cav1.2 ISO-behandelter Herzen

Originale Western Blots (links) von je vier ISO-behandelten Proben und vier Kontrollproben, sowie die zusammengefassten Ergebnisse (rechts). (A) Die Steigerung der RyR2-Phosphorylierung an Ser2808 ist im WT signifikant stärker als in *Cacna1c*^{+/-}. Bezüglich der Ziele (B) RyR2-Ser2814 und (C) Cav1.2-Ser1928 ist keine ISO-induzierte Steigerung zu erkennen. Ktr: N=8/8 (WT/*Cacna1c*^{+/-}); ISO: N=6/8; Einwege-ANOVA.

Des Weiteren wurden die PLB-Phosphorylierungen des PKA-Ziels Ser16 und des CaMKII-Ziels Thr17 untersucht (Abbildung 3-14). In (A) werden originale Western Blots präsentiert und in (B) die zusammengefassten Ergebnisse.

ISO führte zu einer starken Erhöhung der PLB-Phosphorylierung sowohl an Ser16 als auch an Thr17, die in beiden Genotypen annähernd gleichstark ausgeprägt war. Hierbei kam es an Ser16 zu einer ≈ 8 -fachen Erhöhung der Phosphorylierung im WT und zu einer ≈ 6 -fachen Erhöhung in *Cacna1c*^{+/-} (*Cacna1c*^{+/-}: 6.37 ± 2.11 vs WT: 8.21 ± 1.85). Die Steigerung der PLB-Phosphorylierung an Thr17 war marginal schwächer ausgeprägt mit einer ungefähren Vervielfachung in beiden Genotypen (*Cacna1c*^{+/-}: 4.31 ± 0.92 vs WT: 4.44 ± 1.18). Auch an dieser PLB-Phosphorylierungsstelle war kein Unterschied zwischen WT und *Cacna1c*^{+/-} zu erkennen.

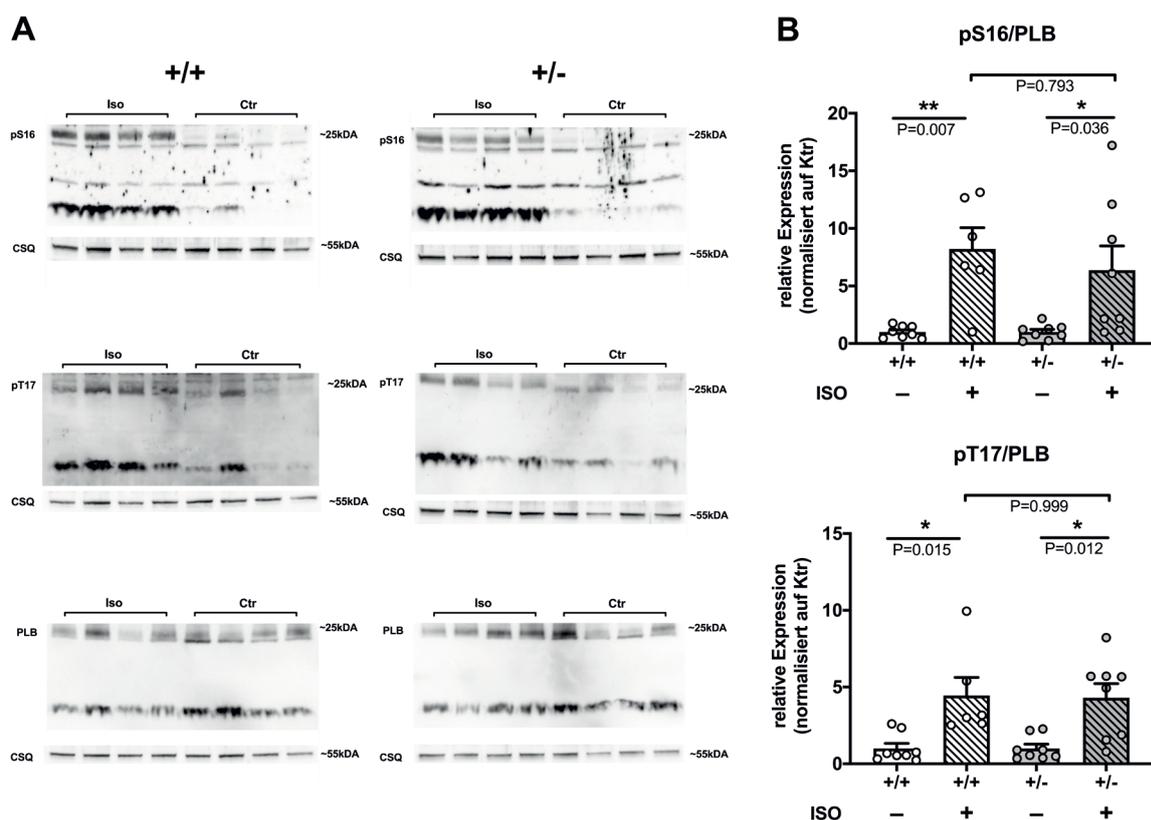


Abbildung 3-14: PLB-Phosphorylierungsstatus ISO-behandelter Herzen

Originale Western Blots (A) von je vier ISO-behandelten Proben und vier Kontrollproben, sowie die zusammengefassten Ergebnisse (B). Sowohl an Ser16 als auch an Thr17 war eine starke Steigerung der PLB-Phosphorylierung zu beobachten, die sich jedoch nicht zwischen den Genotypen unterschied. Ktr: N=8/8 (WT/*Cacna1c*^{+/-}); ISO: N=6/8; Einwege-ANOVA.

3.3.6 *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten zeigen einen geringeren sarkolemmalen Ca-Einstrom nach ISO-Behandlung

Um den sarkolemmalen Ca-Einstrom zu messen, wurden Myozyten mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin (1 μ M) behandelt. Hierfür wurden die Zellen bereits nach der Fluo-4 Beladung für 20 Minuten mit Thapsigargin inkubiert und weitere 6-12 Minuten vor dem eigentlichen Protokoll mit Thapsigargin superfundiert und elektrisch stimuliert. Ziel hierbei war es, CaT zu erhalten, die lediglich durch den extrazellulären Ca-Einstrom und ohne Mitwirken einer Ca-Freisetzung aus dem SR zustande kamen. Nach basaler Messung der CaT bei einer Stimulationsfrequenz von 0.5 Hz in Gegenwart von Thapsigargin, wurden die Zellen für 4 Minuten mit 100 nM ISO behandelt. Als Bestätigung dafür, dass das SR frei von Ca war, wurden im Anschluss an die ISO-Gabe (Abbildung 3-15) bei ausgeschalteter Stimulation zwei Koffeinbolusapplikation angeschlossen. Die CaT wurden in diesem Protokoll normalisiert auf die diastolische Fluoreszenz (F_{diast}) in Gegenwart von Thapsigargin, da keine Messung der Ruhefluoreszenz durchgeführt wurde.

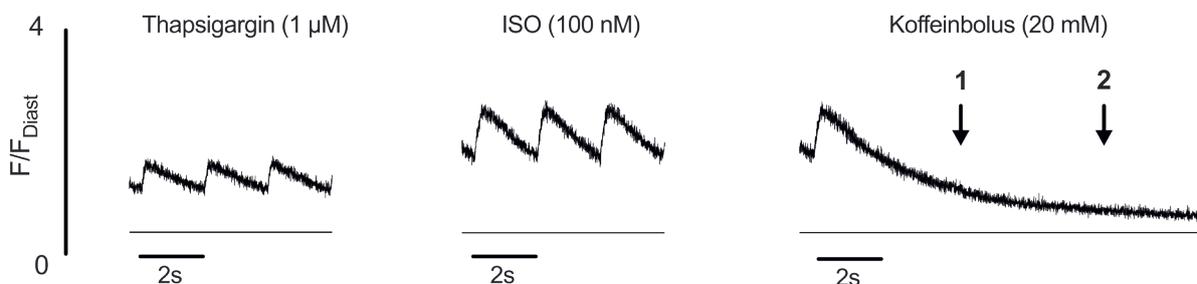


Abbildung 3-15 Beispieltransienten im Thapsigargin-Protokoll

Die Zelle wurde bei 0.5 Hz stimuliert und für 6-12 Minuten mit Thapsigargin (1 μ M) superfundiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit ISO (100 nM) für 4 Minuten. Hiernach wurden zwei Koffeinboli appliziert.

Nach Behandlung mit Thapsigargin konnte sowohl in WT- als auch *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten eine ausgeprägte Hemmung der SERCA beobachtet werden. Dies zeigte sich (im Vergleich zu basalen Bedingungen) in stark verminderten CaT-Amplituden (*Cacna1c*^{+/-}: 0.40 ± 0.03 dF/ F_{diast} vs WT: 0.34 ± 0.02 dF/ F_{diast}) und extrem hohen Werten der Abfallzeitkonstante Tau (*Cacna1c*^{+/-}: 2043 ± 224 ms vs WT: 2369 ± 271 ms). Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Auch das systolische Ca (*Cacna1c*^{+/-}: 1.40 ± 0.03 F/ F_{diast} vs WT: 1.34 ± 0.02 F/ F_{diast}) und die Anstiegszeit (*Cacna1c*^{+/-}: 154.7 ± 12.1 ms vs WT: 133.5 ± 14.7 ms) waren nach Behandlung mit Thapsigargin nicht unterschiedlich. Da die CaT auf die diastolische Fluoreszenz zu diesem Zeitpunkt normalisiert wurden, sind an dieser Stelle die Werte für das diastolische Ca definitionsgemäß 1. Nach Behandlung mit ISO erhöhte sich der Ca-Einstrom in beiden Genotypen stark. Hierbei kam es zu einem Anstieg sowohl des diastolischen und des systolischen Ca als auch der CaT-Amplitude. Analog zu den vorausgegangenen ISO-Protokollen fiel hierbei der Anstieg der CaT-Amplitude in *Cacna1c*^{+/-} signifikant schwächer aus als im WT (*Cacna1c*^{+/-}: 1.17 ± 0.05 F/ F_{diast} vs WT: 1.43 ± 0.05 F/ F_{diast}). Auch der ISO-vermittelte Effekt auf die Erhöhung des systolischen Ca war dabei in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer ausgeprägt, so dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab (*Cacna1c*^{+/-}: 2.86 ± 0.10 F/ F_{diast} vs WT: 3.24 ± 0.12 F/ F_{diast}). Das diastolische Ca wiederum lag in beiden Gruppen auf demselben Niveau (*Cacna1c*^{+/-}: 1.69 ± 0.07 F/ F_{diast} vs WT: 1.81 ± 0.06 F/ F_{diast}). Desweiteren konnte bezüglich der kinetischen Parameter ein deutlich langsamerer Anstieg der CaT in *Cacna1c*^{+/-} beobachtet werden (*Cacna1c*^{+/-}: 211.0 ± 8.8 ms vs WT: 168.1 ± 10.2 ms), wohingegen die Abfallzeitkonstante Tau keinen Unterschied erkennen ließ (*Cacna1c*^{+/-}: 3121 ± 387 ms vs WT: 2608 ± 277 ms). Auch nach ISO-Behandlung blieb die Hemmung der SERCA, die sich in den hohen Werten der Abfallzeitkonstanten widerspiegelt, evident.

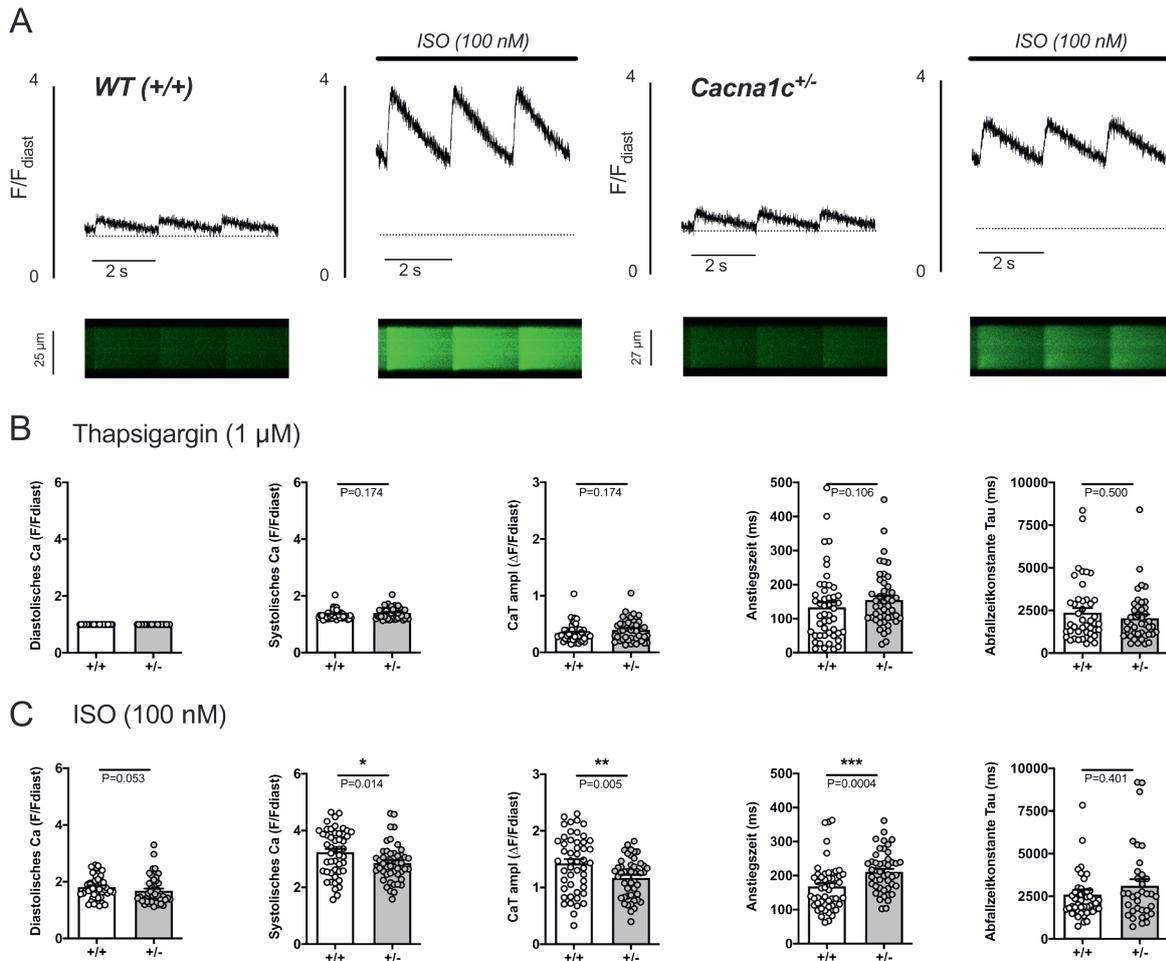


Abbildung 3-16 Messung des sarkolemmlen Ca-Einstroms vor und nach ISO-Gabe

(A) Originale Linescan-Aufnahmen und zugehörige Transienten nach Thapsigargin-Behandlung und mit anschließender ISO-Behandlung für WT (links) und *Cacna1c*^{+/-} (rechts). (B) Die CaT von *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Myozyten unterscheiden sich nicht nach Behandlung mit Thapsigargin. Eine ausgeprägte Hemmung der SERCA ist an der kleinen CaT-Amplitude und der langsamen Abfallzeitkonstante zu erkennen. (C) ISO führt zu einer signifikant stärkeren Erhöhung der CaT-Amplitude und des systolischen Ca in WT-Myozyten. Auch die Anstiegszeit der CaT ist im WT schneller als in *Cacna1c*^{+/-}. (B): n=49/47, N=5/5 (WT/*Cacna1c*^{+/-}); Tau: n=44/42 (WT/*Cacna1c*^{+/-}). (C): n=49/47, N=5/5 (WT/*Cacna1c*^{+/-}); Tau: n=47/35 (WT/*Cacna1c*^{+/-}). Mann-Whitney U-Test. Die Zellzahl für Tau ist reduziert, weil in einigen Fällen der Abfall keinem exponentiellen Trend gefolgt ist. Die Display Range der Linescan-Bilder nach Hintergrundkorrektur beträgt 0-1200.

4. Diskussion

4. Diskussion

Die $Ca_v1.2$ -Isoform der spannungsabhängigen Ca-Kanäle wird in vielen Geweben insbesondere dem Gehirn und dem Herzen exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle in sowohl Entwicklung als auch Funktion. Fehlregulationen oder Mutationen des $Ca_v1.2$ -Kanals korrelieren sowohl mit psychiatrischen als auch mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ein neues Tiermodell zur Untersuchung dafür zugrundeliegender Mechanismen ist das heterozygote *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell. In diesem Rattenmodell konnte von der AG Wöhr bereits gezeigt werden, dass ein heterozygoter Knockout des *Cacna1c*-Gens mit der Entwicklung eines Verhaltensphänotyps einhergeht. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss des heterozygoten *Cacna1c*^{+/-}-Knockouts im Rattenmodell auf das Herz, insbesondere die Ca-Regulation in isolierten Kardiomyozyten, untersucht.

4.1 Basale Bedingungen

Der vom *CACNA1C*-Gen codierte $Ca_v1.2$ -Kanal ist die wichtigste und häufigste Ca_v -Isoform im Herzen. Bei der elektromechanischen Kopplung der Kardiomyozyten bildet der $Ca_v1.2$ -Kanal dabei die Hauptquelle für den Ca-Einstrom nach Depolarisation. Da eben dieser Kanal von dem heterozygoten *Cacna1c*-Knockout betroffen ist, war das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit den Einfluss des Knockouts auf die Kardiomyozytenfunktion unter basalen Bedingungen zu untersuchen. Auf den ersten Blick schien die Ca-Homöostase ventrikulärer Myozyten von *Cacna1c*^{+/-}-Tieren dabei im Vergleich zu den Kontrollzellen ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister unverändert zu sein. Bei genauerer Betrachtung wurde allerdings deutlich, dass die Ca-regulierenden Proteine der *Cacna1c*^{+/-}-Tiere einem substantiellen Remodeling unterliegen. Die durch den heterozygoten Knockout induzierten, geringeren Expressionslevel des $Ca_v1.2$ -Kanals im Herzen schienen dabei am Anfang einer Kaskade von Kompensationsmechanismen und Umbauprozessen zu stehen, am Ende derer die Aufrechterhaltung normaler Calciumtransienten stand. Zumindest unter basalen Bedingungen.

4.1.1 *Cacna1c*^{+/-}-Ratten entwickeln keine Herzhypertrophie aber haben einen verminderten Blutdruck

Der heterozygote Knockout führte in den 9-15 Monate alten Tieren nicht zu der Entwicklung einer Herzhypertrophie oder einer -hypotrophie. Sowohl das auf das Körpergewicht der Tiere normalisierte Herzgewicht als auch die auf die Tibialänge normalisierten Gewichte der rechten und der linken Ventrikel unterschieden sich nicht von den WT-Herzen. In einer vorangegangenen Studie konnte in einem heterozygoten *Cacna1c*^{+/-}-Mausmodell beobachtet werden, dass diese Tiere nach 32 Wochen eine milde aber signifikante Hypertrophie des Herzens entwickeln (Goonasekera et al., 2012). Aber nicht nur ein heterozygoter Knockout des Gens scheint diesen Effekt zu haben, denn in einem transgenen Mausmodell, welches die vom Gen codierte $\alpha 1C$ -Untereinheit überexprimiert, konnte ebenfalls die Entwicklung einer Hypertrophie beobachtet werden (Song et al., 2002). Eine Fehlregulation des Kanals, unerheblich in welche Richtung, scheint also im Mausmodell eine Hypertrophie begünstigen zu können.

Das Fehlen einer Herzhypertrophie in dem *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell scheint also im Gegensatz zu den Befunden aus Mausmodellen zu stehen. Allerdings sollte man hierbei berücksichtigen, dass es sich bei Maus und Ratte um zwei unterschiedliche Spezies handelt und man nicht immer Befunde von einer auf die andere übertragen kann. Des Weiteren wird die Entwicklung einer Herzhypertrophie in vielen Fällen durch eine chronisch erhöhte Druckbelastung des Herzmuskels in Folge von hohem Blutdruck begünstigt (Verdecchia, 2002). Die haploinsuffizienten *Cacna1c*^{+/-}-Ratten zeigten allerdings im Vergleich zum WT um annähernd 10 mmHg reduzierte, systolische und diastolische Blutdruckwerte. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die erniedrigten Blutdruckwerte hinsichtlich einer Hypertrophie des Herzmuskels einen schützenden Effekt innehaben. Der Blutdruck setzt sich zusammen aus dem Produkt von peripherem Widerstand und dem Herzzeitvolumen. Dabei setzt sich das Herzzeitvolumen aus dem Herzschlagvolumen und der Herzfrequenz zusammen, der periphere Widerstand ist ein Maß für den Gefäßwiderstand der Blutgefäße im Kreislauf. Bei den Blutdruckmessungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Tieren hinsichtlich der Herzfrequenz. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass die veränderten Blutdruckwerte nicht die Folge unterschiedlicher Stresslevel der Genotypen während der Messung waren. Schließlich konnte für das *Cacna1c*^{+/-}-Modell bereits gezeigt werden, dass

dies einen Verhaltensphänotyp aufweist. Auf Basis der unveränderten Herzfrequenzwerte kann man folgern, dass der verringerte Blutdruck wahrscheinlich das Resultat eines veränderten peripheren Widerstandes in den Gefäßen der Tiere ist. Da es sich bei dem heterozygoten *Cacna1c*^{+/-}-Knockout nicht um einen herzspezifischen, sondern um einen globalen Knockout handelt, kann man davon ausgehen, dass auch in den glatten Muskeln der Blutgefäße weniger Ca_v1.2 exprimiert wird. Auch in den Glattmuskelzellen der Gefäße wird eine Kontraktion über LTCCs und Ca-Einstrom eingeleitet (Davis and Hill, 1999), dementsprechend stehen die LTCCs direkt mit dem Muskeltonus der Gefäße und damit dem peripheren Widerstand in Zusammenhang. Überdies konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass eine glattmuskelspezifische Inaktivierung der Ca_v1.2-Kanäle ebenfalls in verringerten Blutdruckwerten resultiert (Moosmang, 2003).

4.1.2 *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikel zeigen eine verminderte Ca_v1.2 Expression

Zunächst wurde die Expression des Ca_v1.2-Kanals im Herzen untersucht. In linksventrikulärem Gewebe zeigten die *Cacna1c*^{+/-}-Proben signifikant niedrigere Ca_v1.2-Proteinlevel. Da es sich bei *Cacna1c*^{+/-} um einen heterozygoten Knockout handelt, könnte man erwarten, dass auch die exprimierte Proteinmenge um 50% geringer ausfallen sollte. Dies war jedoch nicht der Fall. Wider Erwarten betrug die Reduktion der Ca_v1.2-Proteinlevel im linken Ventrikel lediglich 25-30%. Dahingegen konnte in Gehirngewebe der *Cacna1c*^{+/-}-Tiere eine 50%-ige Reduktion beobachtet werden (Kisko et al., 2018). Auch in haploinsuffizienten *Cacna1c*^{+/-}-Mausmodellen wurde keine Halbierung der exprimierten Proteinmenge im Herzen, sondern Reduktionen um 21% (Rosati et al., 2011) und 40% festgestellt (Goonasekera et al., 2012). Für die Aufrechterhaltung einer normalen Herzfunktion nimmt der Ca-Einstrom über den Ca_v1.2-Kanal eine Schlüsselrolle ein. Der Strom muss einerseits groß genug sein, um die elektromechanische Kopplung auslösen zu können (Rosati et al., 2008), darf aber andererseits auch nicht zu groß sein und eine Ca-Überladung verursachen (Vassalle and Lin, 2004). Daher scheint es im Herzen eine unvollständige Kompensation der Ca_v1.2-Expressionslevel zu geben. Wie bereits erwähnt ist die Ca_v1.2-Isoform die dominierende Isoform im Herzen, lediglich in den Vorhöfen und im Sinusknoten des Herzens wird zusätzlich die Ca_v1.3-Isoform exprimiert

(Striessnig et al., 2010). Doch eine Kompensation der verringerten $\text{Ca}_v1.2$ -Expression im linken Ventrikel durch eine gesteigerte Expression der $\text{Ca}_v1.3$ -Isoform fand in $\text{Cacna1c}^{+/-}$ nicht statt. Hier konnte in Western Blot-Experimenten ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression der $\text{Ca}_v1.3$ -Isoform im Vergleich zum WT beobachtet werden. Anzumerken ist hierbei, dass das Muster der $\text{Ca}_v1.3$ -Western Blots denen der $\text{Ca}_v1.2$ -Blots sehr ähnlich sah. Es ist möglich, dass der $\text{Ca}_v1.3$ -Antikörper nicht spezifisch genug war und ebenfalls an $\text{Ca}_v1.2$ -Proteine binden konnte. Die erste Möglichkeit, die sich hieraus ergab, war die, dass die $\text{Ca}_v1.3$ -Isoform in dem Gewebe überhaupt nicht exprimiert wird und wir in den Blots erneut nur die $\text{Ca}_v1.2$ -Reduktion in $\text{Cacna1c}^{+/-}$ festgestellt haben. Die zweite Möglichkeit war die, dass mit dem Antikörper sowohl $\text{Ca}_v1.3$ als auch $\text{Ca}_v1.2$ detektiert wurde und durch die festgestellte Reduktion der gemeinsamen Proteinlevel ebenfalls eine gesteigerte Expression von $\text{Ca}_v1.3$ ausgeschlossen werden konnte.

Die $\beta 2$ -Untereinheit des Kanals soll, wenn auch kontrovers diskutiert, maßgeblich an der Oberflächenexpression des Kanals beteiligt sein (Dolphin, 2003). Doch auch eine Kompensation durch veränderte Expression der $\beta 2$ -Untereinheit konnte in den durchgeführten Western Blot-Experimenten ausgeschlossen werden.

Letztlich wurde noch ein Kompensationsmechanismus im Sinne einer PKA-vermittelten Modulation des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals untersucht. Hier konnte in $\text{Cacna1c}^{+/-}$ -Gewebe ein signifikant erhöhter Phosphorylierungszustand an Serin 1928 der $\alpha 1C$ -Untereinheit unter basalen Bedingungen festgestellt werden. Auch wenn die Phosphorylierungsstelle Serin 1928 wahrscheinlich nicht an der funktionellen Modulation des Kanals beteiligt ist (Lemke et al., 2008), so spiegelt sie doch eine erhöhte PKA-Aktivität in der unmittelbaren Umgebung des Kanalkomplexes wider.

Der Ca-Einstrom über die $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle wurde in elektrisch stimulierten Ventrikelmyozyten nach Behandlung mit Thapsigargin gemessen. Als potenter Inhibitor der SERCA (Rogers et al., 1995) konnte Thapsigargin eine Wiederaufnahme des Ca in das SR verhindern. Mittels Koffeinapplikation konnte bestätigt werden, dass das SR während des Protokolls frei von Ca war. Der gemessene CaT entsprach also dem sarkolemmalen Ca-Einstrom ohne eine zusätzliche Ca-Freisetzung über die RyR2 aus dem SR. Der maßgebliche Anteil des Ca-Einstroms wurde dabei mutmaßlich von den LTCC getragen, wobei auch ein Beitrag des NCX im Rückwärtsmodus arbeitend (Ca-Influx – Na-Efflux) möglich wäre. Trotz der signifikant niedrigeren $\text{Ca}_v1.2$ -Proteinlevel im linken Ventrikel war der gemessene sarkolemmale Ca-

Einstrom unverändert. Dieser Befund passt zu den Beobachtungen aus dem heterozygoten Mausmodell, in dem ebenfalls ein unveränderter Ca-Einstrom, I_{Ca} , trotz signifikant reduzierter Proteinlevel festgestellt wurde (Rosati et al., 2011). Desweiteren wurde in einer Zusammenarbeit mit der AG Decher (Physiologie, Marburg) von Aytug Kiper in isolierten Kardiomyozyten von *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Tieren der Ca-Einstrom mittels Patch-clamp untersucht – auch in diesen Experimenten war der I_{Ca} unverändert (Fender et al., 2020).

4.1.3 *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten können unveränderte CaT generieren, unterliegen aber einem Remodeling

In isolierten ventrikulären Myozyten wurden unter basalen Bedingungen die CaT und der SR-Ca-Gehalt untersucht. Bei diesen Untersuchungen wiesen die CaT von *Cacna1c*^{+/-}-Tieren bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz keine Unterschiede im Vergleich zum WT auf. Allerdings konnten basale Änderungen in der Expression der Ca-regulierenden Proteine als auch des jeweiligen Phosphorylierungsstatus in *Cacna1c*^{+/-}-Tieren festgestellt werden. Augenscheinlich fanden in Folge verminderter $Ca_v1.2$ -Expression Umbauprozesse und Modulationen der Calcium-regulierenden Proteine im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard statt, die als eine Art Kompensationsmechanismus betrachtet werden können. Aufgrund dieses Remodelings waren die *Cacna1c*^{+/-}-Ventrikelmiozyten in der Lage, den heterozygoten *Cacna1c*-Knockout zu kompensieren und unter basalen Bedingungen normale CaT aufrechtzuerhalten.

Wie oben bereits erwähnt wiesen die *Cacna1c*^{+/-}-Tiere eine signifikant verminderte Expression des $Ca_v1.2$ auf (Abbildung 4-1). Dabei war der Anteil der $Ca_v1.2$ -Proteine, der unter basalen Bedingungen eine Phosphorylierung durch die PKA an Serin 1928 aufzeigte, in *Cacna1c*^{+/-}-Myokard signifikant erhöht. Diese erhöhten Phosphorylierungslevel sind wiederum ein Hinweis auf eine höhere basale PKA-Aktivität in der Region des makromolekularen $Ca_v1.2$ -Kanalkomplexes. Es ist bekannt, dass über einen PKA-abhängigen Mechanismus der Ca-Einstrom (I_{Ca}) moduliert und gesteigert werden kann (Reuter, 1983). Der im Thapsigargin-Protokoll gemessene Ca-Einstrom der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten, als auch der mittels Patch-clamp von Aytug Kiper gemessene I_{Ca} , waren jedoch unverändert, womöglich infolge der beobachteten erhöhten basalen PKA-Modulation des Kanals. Widersprüchlich hierbei ist, dass

sich eine erhöhte PKA-Modulation des Kanals normalerweise in einer Linksverschiebung der I-V-Kurve widerspiegeln würde, was nicht der Fall war (Fender et al., 2020).

Folgen wir dem Weg, den das Ca bei der elektromechanischen Kopplung nimmt, gelangen wir nach dem initialen Ca-Einstrom in die Zelle zu den RyR2 am SR. In Folge des Ca-Einstroms öffnen die RyR2 und bewirken so eine SR-Ca-Freisetzung. Die Expression der RyR2 war in beiden Genotypen gleich groß (Abbildung 4-1). Doch in gleicher Weise, wie der Ca_v1.2-Kanal eine erhöhte PKA-abhängige Phosphorylierung zeigte, war der Anteil der an Serin 2808 phosphorylierten RyR2 signifikant gesteigert in *Cacna1c*^{+/-}-Myokardgewebe. Ebenso spiegelt die erhöhte Phosphorylierung des Serin 2808 eine erhöhte basale Aktivität der Kinase im Bereich der RyR2 wider. Eine Modulation des RyR2 durch die PKA geht mit einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit P_o der Kanäle und einer gesteigerten SR-Ca-Freisetzung einher. Gleichwohl war die per Koffein-Bolusapplikation ermittelte fraktionelle Ca-Freisetzung über die RyR2 in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten unverändert. Im linksventrikulären Gewebe der *Cacna1c*^{+/-}-Tiere war demnach eine erhöhte basale PKA-abhängige Phosphorylierung im Bereich der Couplon-Region von Ca_v1.2 und RyR2 festzustellen. Physiologischerweise geht eine erhöhte PKA-Aktivität oft Hand in Hand mit einer erhöhten CaMKII-Aktivität, da diese durch erhöhte intrazelluläre Ca-Konzentrationen ihre Aktivierung erfährt, welche wiederum nach Stimulierung des cAMP-PKA-Signalwegs beobachtet werden (Beckendorf et al., 2018). Eine erhöhte basale CaMKII-Aktivität am RyR2 war allerdings in *Cacna1c*^{+/-}-Myokard nicht festzustellen. Der Phosphorylierungsstatus des durch die CaMKII phosphorylierten Serin 2814 war in beiden Genotypen etwa gleich groß. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass die erhöhte PKA-Aktivität in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten eben nicht in erhöhten Ca-Konzentrationen, verglichen mit dem WT, resultierte, welche eine erhöhte CaMKII-Aktivität bewirken würden. Über die beobachtete PKA-Modulation in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten wurden die CaT mutmaßlich auf das Niveau in WT-Myozyten angeglichen, überstiegen dieses jedoch nicht.

Im weiteren Verlauf der elektromechanischen Kopplung schließt sich an den Ca-Einstrom und die SR-Ca-Freisetzung die Ca-Ausschleusung und damit der Abfall der CaT an. Die wichtigsten Vermittler des Ca-Abfalls sind dabei die SERCA2a und der NCX. Im Rahmen der beobachteten Umbauprozesse im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard konnte eine erhöhte Expression dieser beiden Proteine ermittelt werden (Abbildung 4-1). Die Aktivität der SERCA2a wird über PLB und den Phosphorylierungsstatus von PLB gesteuert. Dabei war sowohl die PLB-Expression unverändert als auch der Phosphorylierungsgrad an Serin 16 und Threonin 17. Im Gegensatz

zu der dyadischen $\text{Ca}_v1.2$ – RyR2 Region war im Zytoplasma am PLB keine erhöhte basale PKA-Aktivität festzustellen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die PKA über Ankerproteine mit dem $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal und dem RyR2 assoziiert vorliegt und so eventuell lokal unterschiedliche Aktivitäten innerhalb der Zelle resultieren können (Hulme et al., 2003).

Erhöhte SERCA2a-Expressionslevel in *Cacna1c*^{+/-}-Myokard bei gleichzeitig unveränderter PLB-Expression würden das SERCA2a/PLB-Verhältnis hin zu einem höheren Anteil nicht-inhibierter SERCA2a verschieben. Dies könnte eine bessere Ca-Wiederaufnahme in das SR begünstigen und so den unveränderten SR-Ca-Gehalt, der im Koffeinprotokoll beobachtet wurde, erklären.

Schließlich konnte im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard eine gesteigerte Expression des NCX beobachtet werden. Die physiologisch wichtigste Funktion des NCX ist die Ausschleusung von 1 Ca über das Sarkolemm im Austausch gegen 3 Na (Ca Efflux – Na Influx). Die Richtung, in die der NCX arbeitet, ist reversibel und von den Na- und Ca-Gradienten sowie vom Membranpotential abhängig. Es wird postuliert, dass der NCX während des schnellen Aufstrichs des Aktionspotentials im Rückwärtsmodus laufend (Ca-Influx – Na-Efflux) einen Beitrag zum Ca-Einstrom leisten könnte (Bers, 2008; Larbig et al., 2010). Dies könnte ein weiterer Mechanismus in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten sein, um die verminderte $\text{Ca}_v1.2$ -Expression zu kompensieren und einen zusätzlichen Beitrag zum Ca-Einstrom zu leisten. Überdies wurde bei Untersuchungen an einem Mausmodell postuliert, dass eine erhöhte Expression des NCX den Ca-Einstrom über die LTCC zu erhöhen vermag. Durch eine schnellere Depletion des Ca im Bereich des dyadischen Spalts würde die Ca-abhängige Inaktivierung der LTCC reduziert und so der I_{Ca} erhöht werden (Reuter et al., 2004). Die gesteigerte Expression des NCX in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten könnte so über die genannten Mechanismen zum Ca-Einstrom in die Zelle beitragen.

Ventrikuläre *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten sind unter basalen Bedingungen in der Lage, im Vergleich zu WT-Myozyten unveränderte CaT zu generieren. Gleichzeitig unterliegen die Ca-regulierenden Proteine einem substantiellen Remodeling. Das Zusammenspiel aus erhöhter Expression der Ca-ausschleusenden Proteine SERCA2a und NCX zusammen mit den gesteigerten basalen PKA-abhängigen Phosphorylierungszuständen von $\text{Ca}_v1.2$ und RyR2 ist für die Aufrechterhaltung normaler CaT in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten verantwortlich zu machen.

Basale Bedingungen

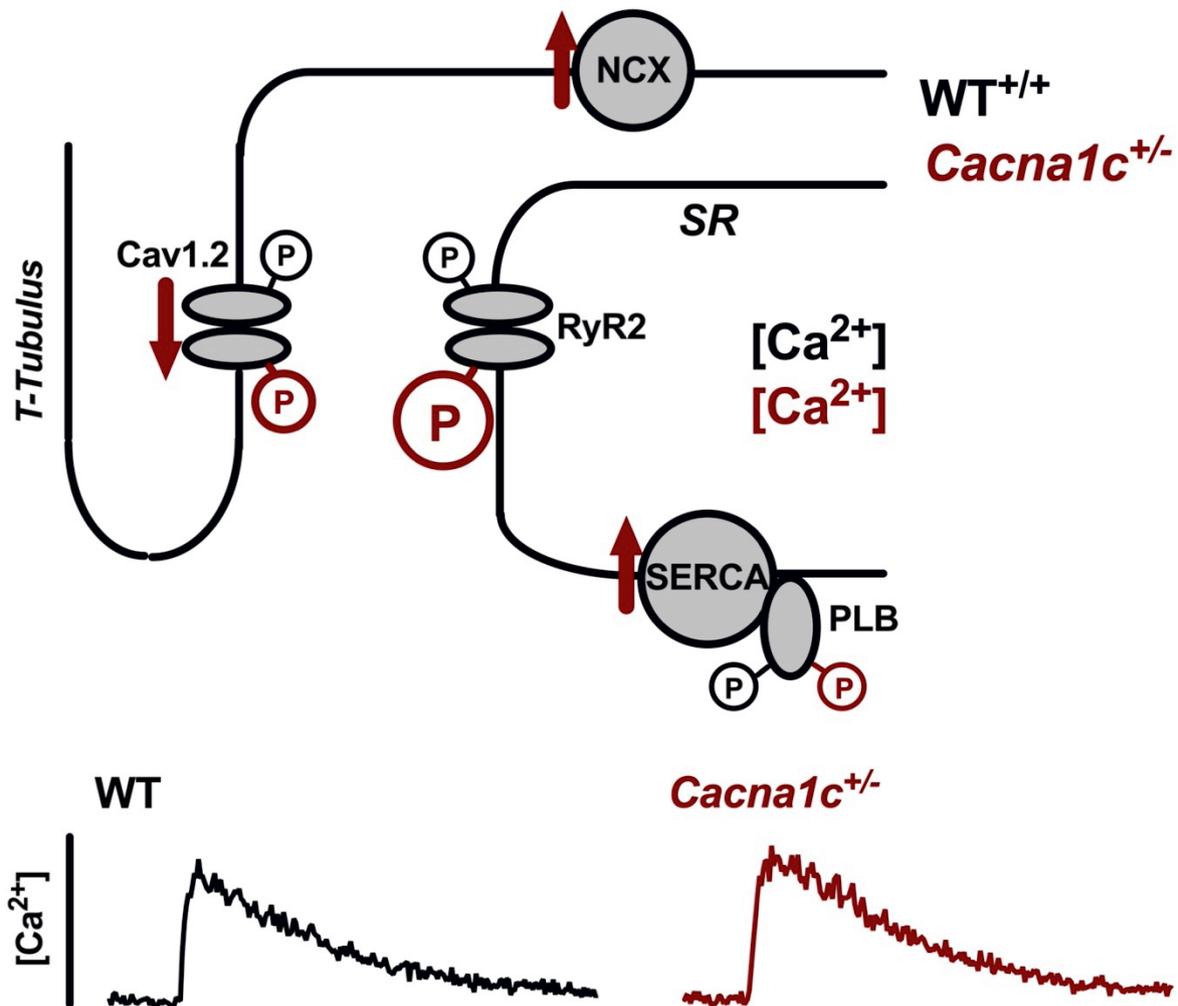


Abbildung 4-1: Expression und Phosphorylierung Calcium-regulierender Proteine in WT- und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten unter basalen Bedingungen

Phosphorylierungszustand der Calcium-regulierenden Proteine in WT- (schwarz) und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten (rot). Die Größe der \odot spiegelt das Ausmaß der Phosphorylierung wider. Die Expression von Cav1.2 ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten reduziert, die Expression von NCX und SERCA erhöht (Pfeile). Die basale Phosphorylierung von Cav1.2 (Ser1928) und RyR2 (Ser2808) ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten erhöht, die von PLB ist unverändert. Der SR-Ca-Gehalt ist ebenfalls unverändert ($[Ca^{2+}]_{SR}$). Die resultierenden CaT sind in WT- und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten vergleichbar (unten).

4.2 Gestresste Bedingungen

Das heterozygote *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell weist einen Phänotyp auf Verhaltenesebene auf, der mit Autismus-ähnlichen Verhaltensweisen und Defiziten in der sozialen Kommunikation einhergeht (Kisko et al., 2018; Redecker et al., 2019). Bedingungen psychischen Stresses gehen auch unter physiologischen Bedingungen mit einer erhöhten Sympathikusaktivität einher, die wiederum einen direkten Einfluss auf das Herz hat. Eine Sympathikusaktivierung führt im Herzen zu einer Steigerung der Herzfrequenz (positiv chronotrop), der Überleitungsgeschwindigkeit (positiv dromotrop), der Schlagkraft (positiv inotrop) und der Relaxationsgeschwindigkeit (positiv lusitrop). Vermittelt werden diese Effekte am Herzen über die Bindung von Agonisten an die β -adrenergen Rezeptoren, über die der β AR-AC-cAMP-PKA-Signalweg in Gang gesetzt wird. Im Arbeitsmyokard bewirkt dieser Signalweg über PKA-abhängige Modulation der Ca-regulierenden Proteine einen positiv inotropen und einen positiv lusitropen Effekt.

Aufgrund von Umbauprozessen der Ca-regulierenden Proteine waren *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten unter basalen Bedingungen in der Lage, eine normale Ca-Homöostase aufrechtzuerhalten. Eine gesteigerte Sympathikusaktivität wurde in den Myozyten durch Behandlung mit dem β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin nachgeahmt. Der mit Stress einhergehende, physiologisch auftretende positiv chronotrope Effekt am Herzen wurde mittels Steigerungen der Stimulationsfrequenz simuliert. Unter diesen gestressten Bedingungen gelangten die Kompensationsmechanismen der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten an ihre Grenzen und offenbarten so einen Ca-abhängigen-Phänotyp unter dem Einfluss von Isoprenalin. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ventrikuläre *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten nicht so effizient wie WT-Myozyten auf eine Adrenozeptor-Stimulation reagieren können und insgesamt eine abgeschwächte Stressantwort präsentieren.

4.2.1 Abgeschwächte ISO-Antwort in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten

Nach Behandlung mit ISO (100 nM) konnte in den WT-Myozyten als auch den *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten der zu erwartende Effekt beobachtet werden. Dies äußerte sich in einem Anstieg der CaT-Amplitude und in einer Beschleunigung der Abfallzeitkinetiken der Transienten. Dabei zeigten die *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten eine signifikant schwächere Antwort als die WT-Zellen

einhergehend mit einem verringerten Anstieg des systolischen Ca und der CaT-Amplitude nach ISO-Gabe. Der Abfall der CaT hingegen war in beiden Genotypen gleichstark beschleunigt. Diese Beobachtungen lassen sich anhand der zuvor festgestellten Umbauprozesse der Ca-regulierenden Proteine unter basalen Bedingungen erklären. Isoprenalin vermittelt seinen Effekt auf die CaT-Amplitude mittels PKA-abhängiger Phosphorylierung von $\text{Ca}_v1.2$ und dem RyR2. Eine Phosphorylierung dieser Proteine resultiert in einem erhöhten Ca-Einstrom und einer erhöhten SR Ca-Freisetzung und damit in einer gesteigerten CaT-Amplitude. Doch bereits unter basalen Bedingungen zeigten diese Proteine im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard einen höheren Phosphorylierungsgrad an den PKA-Stellen als im WT. Eine ISO-vermittelte zusätzliche Phosphorylierung dieser Proteine konnte demnach im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard nicht so stark ausgeprägt sein wie im WT-Myokard. Die basal erhöhte PKA-abhängige Phosphorylierung bedingt eine verminderte Phosphorylierungs-Reserve in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten. Dementsprechend fiel auch die ISO-vermittelte Steigerung der CaT-Amplitude in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer aus als im WT.

Betrachten wir den durch β -Adrenozeptor hervorgerufenen beschleunigten Abfall des CaT, so wird dieser maßgeblich über eine PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB und einer damit einhergehenden höheren Aktivität der SERCA2a vermittelt. Unter basalen Bedingungen wiesen die Genotypen keine Unterschiede bezüglich der PLB-Phosphorylierung auf und verfügten daher auch über eine gleich große Phosphorylierungs-Reserve. Daraus kann man folgern, dass sich keine Unterschiede in der ISO-vermittelten Beschleunigung der Abfallzeitkinetiken der CaT zwischen WT- und *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ergeben sollten, was auch der Fall war.

Mittels Koffein-Bolusapplikation wurde der SR-Ca-Gehalt und die fraktionelle Ca-Freisetzung nach Behandlung mit ISO untersucht. Nach β -Rezeptor-Stimulation erhöht sich als Grundlage für die positive Inotropie die Amplitude der CaT. Ein wichtiger Faktor dafür ist ein erhöhter Anteil des pro Schlag aus dem SR freigesetzten Ca, der fraktionellen Ca-Freisetzung. Auch in diesen Untersuchungen konnte in beiden Genotypen eine Erhöhung der fraktionellen Ca-Freisetzung nach ISO beobachtet werden, welche abermals in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer ausgeprägt war als in WT-Zellen. Verantwortlich zu machen für die verminderte fraktionelle Ca-Freisetzung unter ISO ist ebenfalls die kleinere Phosphorylierungsreserve am RyR2 in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten.

Zudem konnten die Befunde einer abgeschwächten ISO-Antwort mittels der Etablierung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve bestätigt werden. Auch in diesen Versuchen war eine verminderte Antwort der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten offensichtlich, die sich in einer rechts-Verschiebung der Kurve äußerte. Hierbei benötigten *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten höhere ISO-Konzentrationen, um dieselbe Wirkung (CaT Amplitude) wie WT-Myozyten zu generieren. Dies resultierte in einem signifikant höheren EC₅₀ von 13.0 nM in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten im Vergleich zu WT-Myozyten, für die sich ein EC₅₀ von 4.1 nM ergab. Dementsprechend zeigte ISO in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten eine verminderte Potenz in Bezug auf die Erhöhung der CaT-Amplitude. Eine Sympathikusaktivierung am Herzen beeinflusst nicht ausschließlich die Schlagkraft und die Relaxation am Arbeitsmyokard, sondern moduliert ebenfalls den Sinusknoten und führt so zu einer Steigerung der Herzfrequenz. Nach ISO-Behandlung wurde daher ein Frequenzprotokoll angeschlossen, um die Sympathikus-vermittelten Effekte (positiv chrono-, ino-, lusitrop) gemeinsam zu untersuchen. Erneut zeigten die *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten eine verminderte CaT-Amplitude, die bei allen untersuchten Frequenzen (1 Hz, 2 Hz, 4 Hz) evident blieb. Desweiteren bestätigte sich ebenfalls der unveränderte ISO-Effekt auf die CaT-Abfallzeitkinetiken, die sich auch bei gesteigerten Frequenzen zwischen *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Myozyten nicht unterschieden.

4.2.2 Die ISO-vermittelte Erhöhung des Ca-Einstroms ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten vermindert

Wie zuvor beschrieben, wurde auch der sarkolemmale Ca-Einstrom in isolierten Myozyten nach Ausschaltung des SR (mittels Thapsigargin-Behandlung) ermittelt, der sich unter basalen Bedingungen zwischen *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Myozyten nicht unterschied. Auch hier erhöhte ISO in beiden Genotypen unabhängig von der SR-Ca-Freisetzung die generierten CaT. Der isoliert betrachtete ISO-Effekt auf den sarkolemmalen Ca-Einstrom war ebenfalls signifikant schwächer ausgeprägt in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten. Hierbei waren sowohl die CaT-Amplituden im Vergleich zum WT vermindert als auch die Anstiegszeit der CaT signifikant langsamer. Eine β -adrenerge Stimulation vermag den Strom I_{Ca} als auch die Offenwahrscheinlichkeit P_o der Ca-Kanäle zu erhöhen (Reuter and Scholz, 1977). Einerseits wird dieser Effekt über eine

Modulation der einzelnen $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle vermittelt (Yue et al., 1990). Auf die Gesamtheit aller Ca-Kanäle einer Zelle betrachtet erhöht ISO den Anteil der verfügbaren Ca-Kanäle, die sich in einem offenen Zustand befinden, und verstärkt so den globalen Ca-Einstrom in die Zelle (Tsien et al., 1986). Betrachten wir letzteren Befund und die Gesamtheit der Ca-Kanäle einer Zelle in Bezug auf eine β -Rezeptor-Stimulation. Gehen wir davon aus, dass die $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle durch Phosphorylierung entweder zum Ca-Einstrom in die Zelle beitragen oder durch Dephosphorylierung wieder zu nicht beitragenden Kanälen umgewandelt werden können und diese beiden Zustände einem Gleichgewicht unterliegen. Eine β -adrenerge Stimulation würde so das Gleichgewicht in Richtung verfügbarer Kanäle verschieben und den Ca-Einstrom der Zelle erhöhen (Reuter and Scholz, 1977; Tsien et al., 1986). Übertragen wir diesen Mechanismus nun auf die *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten, die eine absolut reduzierte Anzahl an $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen exprimieren. Wahrscheinlich wird in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten unter basalen Bedingungen bereits ein höherer Anteil der Kanäle rekrutiert, so dass sich absolut gesehen die Anzahl der verfügbaren Kanäle vom WT nicht unterscheidet und so ein unveränderter Ca-Einstrom erzeugt werden kann. Dadurch steht den *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten jedoch ein geringerer Anteil ebenso wie eine absolut gesehen geringere Anzahl noch rekrutierbarer Ca-Kanäle zur Verfügung, die bei einer β -Rezeptor-Stimulation zusätzlich aktiviert werden können (Abbildung 4-2). Daraus folgt auch, dass bei einer maximalen Aktivierung aller Kanäle der Ca-Einstrom in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten vermindert sein muss, da insgesamt weniger Kanäle vorhanden sind, was bei der Messung des sarkolemmalen Ca-Einstroms auch zu beobachten war. Natürlich stellt diese Erklärung eine Vereinfachung dar, man muss davon ausgehen, dass jeder einzelne Kanal einem dynamischen Gleichgewicht zwischen offen und geschlossen unterliegt, welches moduliert werden kann. Es scheint jedoch plausibel anzunehmen, dass in Folge des verringerten $\text{Ca}_v1.2$ -Expressionsniveaus dieses Gleichgewicht in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten als ein Kompensationsmechanismus basal verschoben vorliegt, um einen ausreichenden Ca-Einstrom zu gewährleisten. Demzufolge ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten basal ein größerer Anteil der Kanäle im Vergleich zum WT für den Ca-Einstrom verfügbar (in Übereinstimmung mit dem basal erhöhten Phosphorylierungszustand an $\text{Ca}_v1.2$). Durch die verminderte Kanalreserve kann die ISO-vermittelte Steigerung des Ca-Einstroms allerdings nicht mit dem WT mithalten, da die absolute Anzahl an $\text{Ca}_v1.2$ Kanälen in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten vermindert ist und basal bereits ein höherer Anteil rekrutiert vorliegt.

Basale Bedingungen

Sympathischer Stress (ISO)

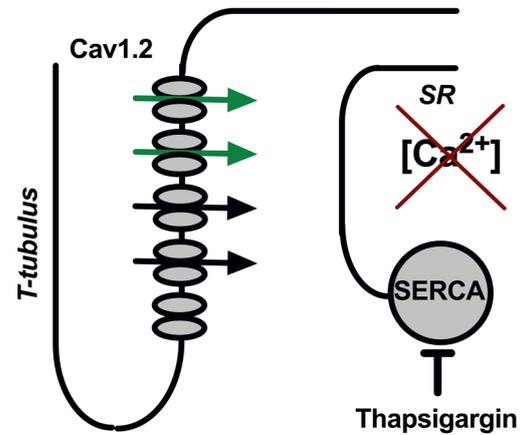
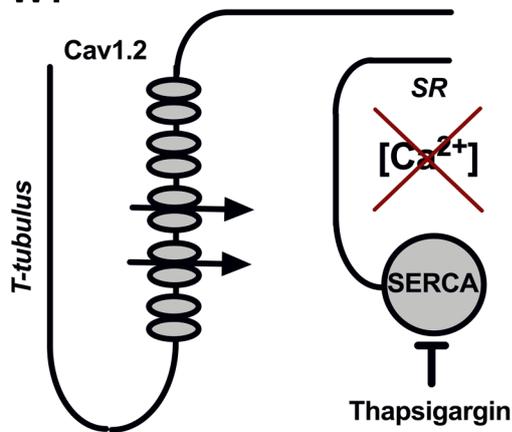
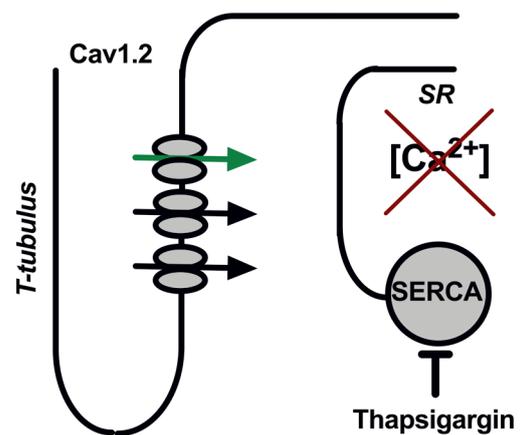
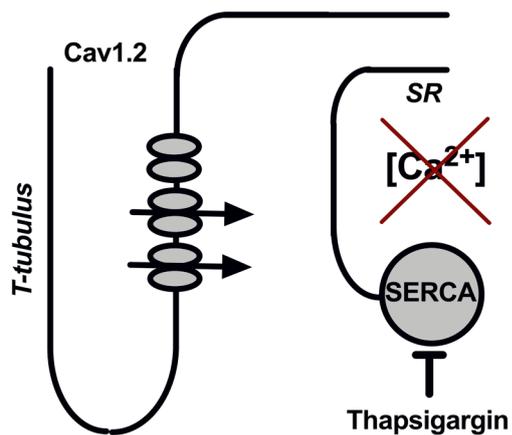
WT^{+/+}*Cacna1c*^{+/-}

Abbildung 4-2: Messung des Ca-Einstroms nach Ausschalten des SR

Die $Ca_v1.2$ -Expression ist vermindert in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten (unten). Unter basalen Bedingungen (links) trägt ein höherer Anteil der $Ca_v1.2$ -Kanäle in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten zum unveränderten Ca-Einstrom bei. Aufgrund der niedrigeren $Ca_v1.2$ -Kanalreserve fällt die Erhöhung des Ca-Einstroms in Folge einer ISO-Behandlung (rechts) in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten geringer aus.

4.2.3 Eine reduzierte Phosphorylierungs-Reserve ist verantwortlich für den abgeschwächten ISO-Effekt auf die CaT

Zusammenfassend zeigten *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten nach ISO-Behandlung sowohl eine verringerte Ca-induzierte SR-Ca-Freisetzung, was sich in verminderten CaT-Amplituden äußerte, als auch einen verminderten sarkolemmalen Ca-Einstrom, der nach Ausschalten des SR ermittelt wurde. Um die Hypothese zu testen, dass eine geringere Phosphorylierungs-Reserve in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten für den abgeschwächten ISO-Effekt verantwortlich zu machen ist, wurden ganze Herzen am Langendorff-System mit ISO (100 nM) oder Kontroll-Lösung behandelt. Mittels Immunoblot-Untersuchungen wurde anschließend linksventrikuläres Gewebe von ISO-behandelten Herzen mit Kontrollherzen verglichen. Hierbei wurde in beiden Genotypen der Phosphorylierungsstatus Ca-regulierender Proteine unter Kontroll- und ISO-Bedingungen untersucht und die Genotypen hinsichtlich der ISO-vermittelten Steigerung der Phosphorylierung verglichen.

Die Phosphorylierungsstelle Serin 16 im PLB ist ein verlässlicher Indikator für eine erhöhte PKA-Aktivität. Demnach konnte anhand der ermittelten 6-8-fachen Erhöhung der Phosphorylierung an Serin 16 in beiden Genotypen von einer erfolgreichen Behandlung der Herzen mit ISO ausgegangen werden (Abbildung 4-3). Zudem zeigt diese gleichstark ausgeprägte ISO-vermittelte Phosphorylierungssteigerung, dass die β -Rezeptor-vermittelte PKA-Aktivierung per se in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten nicht eingeschränkt ist.

In Bezug auf das PKA-Ziel Serin 2808 des RyR2 konnte in diesen Versuchen in beiden Gruppen ein erhöhter Phosphorylierungsgrad nach Behandlung mit ISO festgestellt werden. Diese Steigerung der Phosphorylierung war jedoch im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard signifikant schwächer ausgeprägt als im WT. Diese Ergebnisse fügen sich gut mit zuvor aufgestellter Hypothese zusammen, dass die Unfähigkeit der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten, einen vergleichbaren Anstieg in der CaT-Amplitude zu generieren, einer verminderten Fähigkeit zur additiven Phosphorylierung am RyR2 geschuldet ist.

Bezüglich der RyR2-Zielstelle der CaMKII konnte weder in WT- noch in *Cacna1c*^{+/-}-Myokard ein erhöhter Phosphorylierungsgrad an Serin 2814 nach ISO-Behandlung festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte zuvor gezeigt werden, dass ISO eine erhöhte

Phosphorylierung an Serin 2808 zu vermitteln vermag, dies jedoch nicht bezüglich des CaMKII-Ziels Serin 2814 der Fall ist (Huke and Bers, 2008).

Auch für Serin 1928 des Ca_v1.2-Proteins ist beschrieben, dass ISO zu einer gesteigerten Phosphorylierung dieser Stelle führt (Hulme et al., 2006). Überraschenderweise konnte in unseren Versuchen keine gesteigerte Phosphorylierung an Serin 1928 nach ISO-Behandlung beobachtet werden. Daraus könnte man folgern, dass der maßgebliche Faktor der abgeschwächten ISO-Antwort in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten primär in der reduzierten Phosphorylierungs-Reserve des RyR2 zu begründen ist. Wie allerdings zuvor beschrieben, ist in Bezug auf den Ca_v1.2-Kanal nicht alleinig die Phosphorylierung für den reduzierten Ca-Einstrom nach ISO verantwortlich zu machen, vielmehr spiegelt die verringerte Ca_v1.2-Expression selbst eine verringerte Kanalreserve wider, die in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten nach β -adenerger Stimulation rekrutiert werden kann.

Dennoch wäre eine gesteigerte Phosphorylierung an Ca_v1.2 nach ISO-Behandlung zu erwarten gewesen (Hulme et al., 2006). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper war jedoch kein erhöhter Ca_v1.2-Phosphorylierungszustand an Serin 1928 nach ISO-Behandlung festzustellen. Man sollte dieses Ergebnis mit Vorsicht betrachten – es ist nicht auszuschließen, dass mit einem anderen Antikörper oder an einer anderen Phosphorylierungsstelle im Ca_v1.2-Protein eine ISO-vermittelte Erhöhung der Phosphorylierung beobachtbar wäre.

Die Resultate der PLB Phosphorylierungssteigerung wiederum fügen sich gut mit zuvor aufgestellter Hypothese zusammen. Funktionell war in beiden Genotypen ein beschleunigter Abfall der CaT nach ISO-Behandlung zu erkennen, der gleich stark ausgeprägt war. Ebenso war in den Immunoblot-Untersuchungen die ISO-vermittelte Steigerung der PLB-Phosphorylierung sowohl an Serin 16 als auch an Threonin 17 im *Cacna1c*^{+/-}- und WT-Myokard ebenbürtig. Da die schnelleren Abfallzeitkinetiken mechanistisch über den PLB-Phosphorylierungszustand zu begründen sind, erschließt sich daraus die beobachtete gleichstarke Beschleunigung des Abfalls der CaT beider Genotypen. Desweiteren lag der PLB-Phosphorylierungsstatus unter basalen Bedingungen unverändert vor, weshalb ferner keine unterschiedlichen Phosphorylierungs-Steigerungen (bei gleicher Phosphorylierungs-Reserve) zu erwarten gewesen wären. Die beobachteten Unterschiede zwischen der Phosphorylierung von PLB und RyR2 lassen darauf schließen, dass es kompartmentelle Unterschiede bezüglich der PKA-abhängigen Phosphorylierung innerhalb der Zelle gibt.

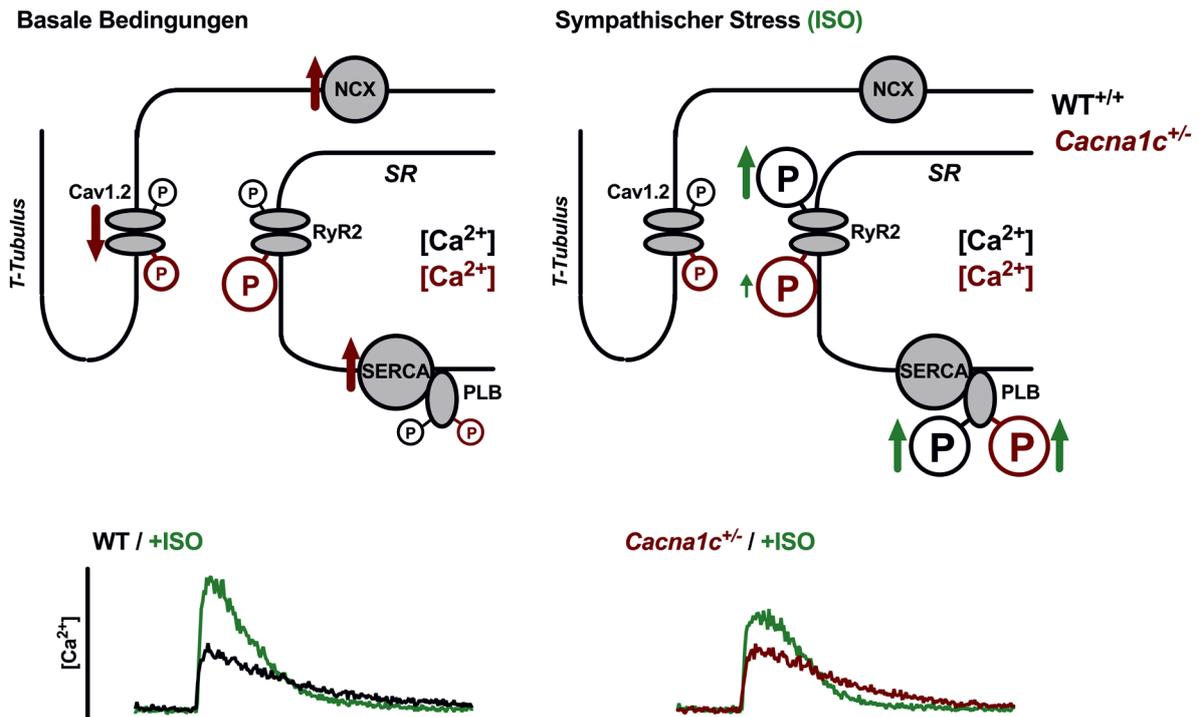


Abbildung 4-3: Steigerung der Phosphorylierung Ca-regulierender Proteine von basalen zu gestressten Bedingungen (ISO)

Phosphorylierungszustand der Calcium-regulierenden Proteine in WT- (schwarz) und *Cacna1c*^{+/-}-Myokard (rot). Rote Pfeile geben veränderte Expressionslevel an. Grüne Pfeile geben den Anstieg der Phosphorylierung (ISO) an. Die Größe der @ spiegelt den Phosphorylierungszustand wider. Remodeling der Calcium-regulierenden Proteine unter basalen Bedingungen (links). Unter gestressten Bedingungen (rechts) ist der Phosphorylierungsanstieg am RyR2 (Ser2808) aufgrund eines basal erhöhten Phosphorylierungszustands weniger stark ausgeprägt in *Cacna1c*^{+/-}-Myokard (grüner Pfeil). Die Phosphorylierungssteigerung an PLB ist gleichstark ausgeprägt. An Cav1.2 konnte kein Anstieg der Phosphorylierung unter gestressten Bedingungen beobachtet werden. Der SR-Ca-Gehalt ist ebenfalls unverändert ($[Ca^{2+}]$). Die ISO-vermittelte Erhöhung der CaT-Amplitude ist in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten schwächer ausgeprägt als in WT-Myozyten. Dabei ist die Beschleunigung des Abfalls der CaT vergleichbar.

4.3 Conclusio

Die vorliegende Studie ist die erste Charakterisierung des *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodells auf Ebene des Herzens. Es konnte gezeigt werden, dass *Cacna1c*^{+/-}-Ratten neben Änderungen auf Verhaltensebene auch einen Phänotyp auf kardialer Ebene entwickeln. Global präsentierten die Tiere dabei signifikant verminderte Blutdruckwerte ohne Entwicklung einer Herzhyper- oder -hypotrophie. Auf zellulärer Ebene konnten Umbauprozesse der Calcium-regulierenden Proteine einhergehend mit basal erhöhten Phosphorylierungszuständen festgestellt werden. Die CaT elektrisch stimulierter Myozyten, der SR-Ca-Gehalt und die fraktionelle Ca-Freisetzung waren unter basalen Bedingungen unverändert. Allerdings konnte aufgezeigt werden, dass die mutmaßlichen Kompensationsmechanismen erschöpft sind, sobald die *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten dem Stressor Isoprenalin ausgesetzt werden. Die Myozyten waren dabei nicht in der Lage, in gleicher Weise auf eine β -Rezeptor-Stimulation zu reagieren und im selben Maße wie die WT-Zellen einen Anstieg der CaT auszulösen. Dabei offenbarte sich eine eingeschränkte Fähigkeit zur Erhöhung des Ca-Einstroms, der fraktionellen SR-Ca-Freisetzung und der Amplitude des CaT. Maßgeblich verantwortlich für die abgeschwächte β -adrenerge Antwort war dabei eine reduzierte Phosphorylierungs-Reserve in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten insbesondere am Serin 2808 des RyR2, als auch eine reduzierte Ca-Kanalreserve aufgrund verringerter Expression des Ca_v1.2-Kanals.

Eine Sympathikus-vermittelte Steigerung der Herzfunktion ist physiologischerweise essentiell um die Auswurfleistung des Herzens an erhöhte körperliche Belastung anzupassen. Des Weiteren ist bekannt, dass insuffiziente Herzen ebenfalls eine verminderte Antwort auf β -Rezeptor Agonisten aufzeigen (Ginsburg et al., 1983). Gerade für das *Cacna1c*^{+/-}-Modell sind diese Erkenntnisse relevant, da diese Tiere einen Verhaltensphänotyp aufweisen, der mit erhöhten Stressleveln einhergehen könnte.

Das *CACNA1C*-Gen ist ein prominenter Risikofaktor für die Entwicklung von psychiatrischen Erkrankungen als auch Herzerkrankungen. Eine verminderte Expression des Gens, hervorgerufen durch einen heterozygoten Knockout, resultiert nach dieser Studie, neben einem Phänotyp auf Verhaltensebene, ebenfalls in der Entwicklung eines kardialen Phänotyps einhergehend mit einer verminderten Antwort des Herzens auf sympathischen Stress. Diese Arbeit liefert somit weitere Evidenz für eine mögliche Verbindung der beiden Systeme - die Psyche und das Herz.

5. Zusammenfassung

Das *CACNA1C*-Gen codiert für die porenbildende $\alpha 1C$ -Untereinheit der L-Typ-Calcium-Kanal (LTCC)-Isoform $Ca_v1.2$, welche im Gehirn, in Glattmuskelzellen und im Herzen exprimiert wird. Im Gehirn und in dessen Entwicklung ist die $Ca_v1.2$ -Isoform beteiligt an der Regulation der synaptischen Plastizität, der Neuronenaktivität und damit auch an Lernprozessen und Verhalten. Im Herzen ist $Ca_v1.2$ verantwortlich für den sarkolemmalen Calcium (Ca)-Einstrom während des Aktionspotentials und die Ca-induzierte Ca-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), die in der Kontraktion des Kardiomyozyten resultiert. In genomweiten Assoziationsstudien konnten Polymorphismen im *CACNA1C*-Gen mit dem Auftreten von psychiatrischen Erkrankungen (Depressionen, Bipolare Störungen, Schizophrenie, Angststörungen & Autismus) in Verbindung gebracht werden, aber Varianten des Gens können sich auch in Herzerkrankungen (Brugada Syndrom, Timothy Syndrom oder dem long-QT Syndrom) äußern. Psyche und Herzfunktion sind einerseits über das *CACNA1C*-Gen miteinander verbunden, andererseits erhöhen psychiatrische Erkrankungen auch das Risiko für die Entwicklung kardialer Erkrankungen und vice versa. Der heterozygote *Cacna1c*^{+/-}-Knockout im Ratten/Mausmodell führt zur Entwicklung eines Verhaltensphänotyps, einhergehend mit Defiziten in der sozialen Kommunikation, erhöhter Ängstlichkeit und Autismus-ähnlichen Verhaltensweisen – und bestätigt so den wichtigen Einfluss des Gens auf Verhaltensebene. Die vorliegende Arbeit präsentiert die erste Charakterisierung des *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodells auf kardialer Ebene. Dafür wurde die Ca-Homöostase ventrikulärer Myozyten sowie die Expression und Phosphorylierung der Ca-regulierenden-Proteine im Herzen dieser Tiere untersucht und mit ihren Wildtyp (WT)-Wurfgeschwistern verglichen. In einer basalen Charakterisierung zeigten die *Cacna1c*^{+/-}-Tiere unveränderte Herzfrequenzen aber verminderte Blutdruckwerte ohne Hinweise auf die Entwicklung einer Herzhyper- oder -hypotrophie. In isolierten Kardiomyozyten wurden am Konfokalmikroskop, mithilfe des Ca-Farbstoffs Fluo-4, elektrisch stimulierte Ca-Transienten (CaT) untersucht. Dabei waren in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten unter basalen Bedingungen die CaT, der SR-Ca-Gehalt, die fraktionelle SR-Ca-Freisetzung, als auch der sarkolemmale Ca-Einstrom vergleichbar mit den WT-Myozyten, trotz einer 30%igen Reduktion der $Ca_v1.2$ -Expression im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard. Jedoch konnten Umbauprozesse der Ca-regulierenden Proteine, einhergehend mit erhöhter Expression der SR-Ca-ATPase (SERCA) und des Na-Ca-Austauschers (NCX) sowie einer basal

erhöhten Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Phosphorylierung an Cav1.2 (Ser1928) und dem Ryanodinrezeptor-Typ-2 (RyR2) (Ser2808) festgestellt werden, die als eine Art Kompensationsmechanismus angesehen werden können. Da das *Cacna1c*^{+/-}-Rattenmodell einen Verhaltensphänotyp aufweist und psychischer Stress auch mit erhöhter Sympathikusaktivität einhergeht, wurde im zweiten Teil der Arbeit eine Sympathikusstimulierung simuliert, bei der Ventrikelmyozyten mit dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin (ISO) behandelt wurden. Unter ISO (100 nM) war die Amplitude der CaT erhöht und der Abfall der CaT beschleunigt. Sowohl WT- als auch *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten zeigten eine entsprechende Antwort auf die Behandlung mit ISO, wobei die Erhöhung der CaT-Amplitude in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten signifikant schwächer ausgeprägt war. Nach ISO-Gabe erhöhte sich die fraktionelle Ca-Freisetzung in WT-Myozyten von 60% auf 90%, wohingegen die Erhöhung von 60% auf 75% in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ebenfalls schwächer ausfiel. Entsprechend wurde mittels einer ISO-Konzentrations-Wirkungskurve in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ein signifikant höherer EC₅₀ von 13 nM im Vergleich zum WT (EC₅₀: 4 nM) ermittelt. Darüber hinaus war nach Ausschalten des SR der sarkolemmale Ca-Einstrom unter ISO in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten vermindert. In Langendorff-perfundierten Herzen wurde die ISO-vermittelte Steigerung der Phosphorylierung der wichtigsten Ca-regulierenden Proteinen untersucht. Die Steigerung der Phosphorylierung des RyR2 an Ser2808 war dabei in *Cacna1c*^{+/-}-Herzen signifikant schwächer ausgeprägt als im WT. Da im *Cacna1c*^{+/-}-Myokard diese Stelle bereits basal stärker phosphoryliert war, konnte die ISO-vermittelte Steigerung auch nicht mehr so ausgeprägt stattfinden wie im WT. Diese reduzierte Phosphorylierungs-Reserve in *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten ist mutmaßlich verantwortlich für die beeinträchtigte Fähigkeit im selben Maße wie der WT eine SR-Ca-Freisetzung zu stimulieren und die CaT zu erhöhen. In *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten finden Kompensationsmechanismen statt, die unter basalen Bedingungen eine Aufrechterhaltung normaler CaT ermöglichen. Unter gestressten Bedingungen gelangen diese Mechanismen jedoch an ihre Grenzen und offenbaren eine beeinträchtigte Antwort der *Cacna1c*^{+/-}-Myozyten auf sympathischen Stress. Diese Studie liefert somit erste Evidenz, dass ein heterozygoter Knockout des *Cacna1c*^{+/-}-Gens neben der Entwicklung eines Verhaltens-Phänotyp, ebenfalls in einem Phänotyp auf kardialer Ebene resultiert.

6. Summary

The *CACNA1C* gene encodes the pore-forming $\alpha 1C$ -subunit of the L-type calcium channel (LTCC) isoform $Ca_v1.2$, which is expressed in the brain, smooth muscle and the heart. In the brain and in its development, the $Ca_v1.2$ isoform is involved in the regulation of synaptic plasticity, neuronal activity and thus also in learning processes and behaviour. In the heart, $Ca_v1.2$ is responsible for the sarcolemmal calcium (Ca) influx during the action potential and the Ca-induced Ca-release from the sarcoplasmic reticulum (SR) which leads to contraction of the cardiomyocyte. In genome-wide association studies, polymorphisms in the *CACNA1C* gene have been linked to the occurrence of psychiatric disorders (depression, bipolar disorder, schizophrenia, anxiety disorders & autism), but variants of the gene can also manifest in heart disease (Brugada syndrome, Timothy syndrome or long-QT syndrome). On the one hand, psyche and heart function are linked via the *CACNA1C* gene; on the other hand, psychiatric diseases also increase the risk of developing cardiac diseases and vice versa. The heterozygous *Cacna1c*^{+/-} knockout in the rat/mouse model leads to the development of a behavioural phenotype associated with deficits in social communication, increased anxiety and autism-like behaviours - confirming the important role of the gene at the behavioural level. This study presents the first characterisation of the *Cacna1c*^{+/-} rat model at the cardiac level. For this purpose, Ca-homeostasis of ventricular myocytes as well as expression and phosphorylation of Ca-handling proteins in the heart of these animals were investigated and compared to their wild-type (WT) littermates. In a basal characterisation, the *Cacna1c*^{+/-} animals showed unchanged heart rates but decreased blood pressure values without evidence of the development of cardiac hyper- or hypertrophy. Electrically stimulated Ca-transients (CaT) were examined in isolated cardiomyocytes at the confocal microscope using the Ca dye Fluo-4. CaT, SR Ca content, fractional SR Ca release and sarcolemmal Ca influx in *Cacna1c*^{+/-} myocytes under basal conditions were comparable to WT myocytes, despite a 30% reduction in $Ca_v1.2$ expression in *Cacna1c*^{+/-} myocardium. However, remodelling of Ca-handling proteins accompanied by increased expression of SR-Ca-ATPase (SERCA) and Na-Ca exchanger (NCX) as well as basally increased protein kinase A (PKA) dependent phosphorylation at $Ca_v1.2$ (Ser1928) and ryanodine receptor type-2 (RyR2) (Ser2808) could be detected, which can be regarded as a kind of compensatory mechanism. Since the *Cacna1c*^{+/-} rat model has a behavioural phenotype and psychological stress is also associated with increased sympathetic

activity, the second part of the work simulated sympathetic stimulation in which ventricular myocytes were treated with the β -adrenergic agonist isoprenaline (ISO). Under ISO (100 nM), the amplitude of CaT was increased and the decline in CaT accelerated. Both WT and *Cacna1c*^{+/-} myocytes showed a corresponding response to ISO treatment, although the increase in CaT amplitude was significantly weaker in *Cacna1c*^{+/-} myocytes. After ISO administration, fractional SR Ca release increased from 60% to 90% in WT myocytes, whereas the increase from 60% to 75% was also weaker in *Cacna1c*^{+/-} myocytes. Accordingly, using an ISO concentration-response curve, a significantly higher EC₅₀ of 13 nM was determined in *Cacna1c*^{+/-}-myocytes compared to WT (EC₅₀: 4 nM). Furthermore, after blocking the SR, the sarcolemmal Ca-influx was decreased under ISO in *Cacna1c*^{+/-} myocytes. In Langendorff-perfused hearts, the ISO-mediated increase in phosphorylation of key Ca-handling proteins was investigated. The increase in phosphorylation of RyR2 at Ser2808 was significantly weaker in *Cacna1c*^{+/-} hearts than in WT. Since in the *Cacna1c*^{+/-} myocardium this site was already more strongly phosphorylated basally, the ISO-mediated increase could not be as pronounced as in the WT. This reduced phosphorylation reserve in *Cacna1c*^{+/-} myocytes is presumably responsible for the impaired ability to stimulate SR-Ca release and increase CaT to the same extent as the WT. Compensatory mechanisms take place in *Cacna1c*^{+/-} myocytes that allow maintenance of normal CaT under basal conditions. However, under stressed conditions, these mechanisms reach their limits, revealing an impaired response of *Cacna1c*^{+/-} myocytes to sympathetic stress. This study thus provides the first evidence that a heterozygous knockout of the *Cacna1c*^{+/-} gene, in addition to the development of a behavioural phenotype, also results in a phenotype at the cardiac level.

Literaturverzeichnis

- Adams, W., Trafford, A.W., Eisner, D.A., 1998. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) decreases sarcoplasmic reticulum Ca content by stimulating Ca release in isolated rat ventricular myocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 436, 776–781.
- Ali, A., Butt, N., Sheikh, A.S., 2015. Early repolarization syndrome: A cause of sudden cardiac death. *World J Cardiol* 7, 466–475.
- Anderson, R.H., Yanni, J., Boyett, M.R., Chandler, N.J., Dobrzynski, H., 2009. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat* 22, 99–113.
- Beckendorf, J., van den Hoogenhof, M.M.G., Backs, J., 2018. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Res Cardiol* 113, 29.
- Bell, R.M., Mocanu, M.M., Yellon, D.M., 2011. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50, 940–950.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21.
- Bers, D., 1999. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research* 42, 339–360.
- Bers, D., 2004. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37, 417–429.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling 415, 8.
- Bers, D.M., 2008. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23–49.
- Bhat, S., Dao, D.T., Terrillion, C.E., Arad, M., Smith, R.J., Soldatov, N.M., Gould, T.D., 2012. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Progress in Neurobiology* 99, 1–14.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., De Waard, M., 2000. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177–190.
- Bigos, K.L., Mattay, V.S., Callicott, J.H., Straub, R.E., Vakkalanka, R., Kolachana, B., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2010. Genetic Variation in CACNA1C Affects Brain Circuitries Related to Mental Illness. *Arch Gen Psychiatry* 67, 939.
- Bodi, I., 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *Journal of Clinical Investigation* 115, 3306–3317.
- Brodde, O.E., 1991. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43, 203–242.
- Brugada, R., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Brugada, P., Brugada, J., Hong, K., 1993. Brugada Syndrome. In: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews*[®]. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T., Hosey, M.M., 1999. Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem* 274, 33851–33854.
- Burmeister, M., McInnis, M.G., Zöllner, S., 2008. Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet* 9, 527–540.

- Carvajal, C., Goyal, A., Tadi, P., 2020. Cardioplegia. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Catterall, W.A., 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* 64, 871–874.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003947–a003947.
- Chen, X., Nakayama, H., Zhang, X., Ai, X., Harris, D.M., Tang, M., Zhang, H., Szeto, C., Stockbower, K., Berretta, R.M., Eckhart, A.D., Koch, W.J., Molkentin, J.D., Houser, S.R., 2011. Calcium influx through Cav1.2 is a proximal signal for pathological cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50, 460–470.
- Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. *Cell* 80, 259–268.
- Dao, D.T., Mahon, P.B., Cai, X., Kovacsics, C.E., Blackwell, R.A., Arad, M., Shi, J., Zandi, P.P., O'Donnell, P., Knowles, J.A., Weissman, M.M., Coryell, W., Scheftner, W.A., Lawson, W.B., Levinson, D.F., Thompson, S.M., Potash, J.B., Gould, T.D., 2010. Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biol Psychiatry* 68, 801–810.
- Davis, M.J., Hill, M.A., 1999. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79, 387–423.
- de Tombe, P.P., 2003. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech* 36, 721–730.
- Dean, P.N., 1998. Confocal Microscopy: Principles and Practices. *Current Protocols in Cytometry* 5, 2.8.1-2.8.12.
- Dedic, N., Pöhlmann, M.L., Richter, J.S., Mehta, D., Czamara, D., Metzger, M.W., Dine, J., Bedenk, B.T., Hartmann, J., Wagner, K.V., Jurik, A., Almlı, L.M., Lori, A., Moosmang, S., Hofmann, F., Wotjak, C.T., Rammes, G., Eder, M., Chen, A., Ressler, K.J., Wurst, W., Schmidt, M.V., Binder, E.B., Deussing, J.M., 2018. Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Mol Psychiatry* 23, 533–543.
- Dhein, S., van Koppen, C.J., Brodde, O.-E., 2001. Muscarinic receptors in the Mammalian Heart. *Pharmacological Research* 44, 161–182.
- Doehner, W., Ural, D., Haeusler, K.G., Čelutkienė, J., Bestetti, R., Cavusoglu, Y., Peña-Duque, M.A., Glavas, D., Iacoviello, M., Laufs, U., Alvear, R.M., Mbakwem, A., Piepoli, M.F., Rosen, S.D., Tsivgoulis, G., Vitale, C., Yilmaz, M.B., Anker, S.D., Filippatos, G., Seferovic, P., Coats, A.J.S., Ruschitzka, F., 2018. Heart and brain interaction in patients with heart failure: overview and proposal for a taxonomy. A position paper from the Study Group on Heart and Brain Interaction of the Heart Failure Association: Heart and brain interaction in heart failure. *Eur J Heart Fail* 20, 199–215.
- Dolphin, A.C., 2003. β Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22.
- Eckart, N., Song, Q., Yang, R., Wang, R., Zhu, H., McCallion, A.S., Avramopoulos, D., 2016. Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. *PLoS One* 11.
- Eisner, D.A., 2018. Ups and downs of calcium in the heart: Calcium and the heart. *J Physiol* 596, 19–30.
- Elliott, W.C., 1966. Isoproterenol in Treatment of Heart Disease: Hemodynamic Effects in Circulatory Failure. *JAMA* 197, 315.

- Fender, H., Kiper, A., Plackic, J., Kisko, T., Braun, M., Wöhr, M., Decher, N., Kockskämper, J., 2020. Altered PKA-dependent phosphorylation of calcium handling proteins and impaired β -adrenergic response in ventricular myocytes from *Cacna1c*^{+/-} rats. *Clin Res Cardiol* 109, Suppl 1, April 2020 - Beitrag P552.
- Ferreira, M.A.R., O'Donovan, M.C., Meng, Y.A., Jones, I.R., Ruderfer, D.M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R.H., Green, E.K., Smoller, J.W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M.L., Nimgaonkar, V.L., Moskvina, V., Thase, M.E., Caesar, S., Sachs, G.S., Franklin, J., Gordon-Smith, K., Ardlie, K.G., Gabriel, S.B., Fraser, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Breen, G., Gill, M., Morris, D.W., Elkin, A., Muir, W.J., McGhee, K.A., Williamson, R., MacIntyre, D.J., MacLean, A.W., St Clair, D., Robinson, M., Van Beck, M., Pereira, A.C.P., Kandaswamy, R., McQuillin, A., Collier, D.A., Bass, N.J., Young, A.H., Lawrence, J., Nicol Ferrier, I., Anjorin, A., Farmer, A., Curtis, D., Scolnick, E.M., McGuffin, P., Daly, M.J., Corvin, A.P., Holmans, P.A., Blackwood, D.H., Gurling, H.M., Owen, M.J., Purcell, S.M., Sklar, P., Craddock, N., 2008. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40, 1056–1058.
- Fill, M., Copello, J.A., 2002. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiological Reviews* 82, 893–922.
- Flavell, S.W., Greenberg, M.E., 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 563–590.
- Fredholm, B.B., 2011. Notes on the history of caffeine use. *Handb Exp Pharmacol* 1–9.
- Fu, Y., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2014. Basal and β -adrenergic regulation of the cardiac calcium channel $Ca_v 1.2$ requires phosphorylation of serine 1700. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 16598–16603.
- Fujii, J., Ueno, A., Kitano, K., Tanaka, S., Kadoma, M., Tada, M., 1987. Complete complementary DNA-derived amino acid sequence of canine cardiac phospholamban. *J Clin Invest* 79, 301–304.
- Fuller, M.D., Emrick, M.A., Sadilek, M., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2010. Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* 3, ra70.
- Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.-N.U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I., 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97–106.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., Buelow, R., 2009. Knockout Rats Produced Using Designed Zinc Finger Nucleases. *Science* 325, 433.
- Ginsburg, K.S., Bers, D.M., 2004. Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca^{2+} load and Ca^{2+} current trigger: Adrenergic modulation of excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology* 556, 463–480.
- Ginsburg, R., Bristow, M.R., Billingham, M.E., Stinson, E.B., Schroeder, J.S., Harrison, D.C., 1983. Study of the normal and failing isolated human heart: Decreased response of failing heart to isoproterenol. *American Heart Journal* 106, 535–540.
- Goonasekera, S.A., Hammer, K., Auger-Messier, M., Bodi, I., Chen, X., Zhang, H., Reiken, S., Elrod, J.W., Correll, R.N., York, A.J., Sargent, M.A., Hofmann, F., Moosmang, S., Marks, A.R., Houser, S.R., Bers, D.M., Molkenin, J.D., 2012. Decreased cardiac L-type Ca^{2+}

- channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 280–290.
- Green, E.K., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Forty, L., Russell, E., Hamshere, M.L., Moskvina, V., Nikolov, I., Farmer, A., McGuffin, P., Holmans, P.A., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Craddock, N., 2010. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15, 1016–1022.
- Hayes, J.F., Lundin, A., Wicks, S., Lewis, G., Wong, I.C.K., Osborn, D.P.J., Dalman, C., 2019. Association of Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors, L-Type Calcium Channel Antagonists, and Biguanides With Rates of Psychiatric Hospitalization and Self-Harm in Individuals With Serious Mental Illness. *JAMA Psychiatry* 76, 382–390.
- Headrick, J.P., Peart, J.N., Budiono, B.P., Shum, D.H.K., Neumann, D.L., Stapelberg, N.J.C., 2017. The heartbreak of depression: 'Psycho-cardiac' coupling in myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 106, 14–28.
- Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J., 1982. Adrenergic receptors in the heart. *Annu Rev Physiol* 44, 475–484.
- Hu, Z., Liang, M., Soong, T., 2017. Alternative Splicing of L-type CaV1.2 Calcium Channels: Implications in Cardiovascular Diseases. *Genes* 8, 344.
- Huke, S., Bers, D.M., 2008. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 80–85.
- Hulme, J.T., Lin, T.W.-C., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2003. β -Adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 13093–13098.
- Hulme, J.T., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2006. Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during β 1-adrenergic regulation. *PNAS* 103, 16574–16579.
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M., Carafoli, E., 1989. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342, 90–92.
- Jiang, Y., Yuen, R.K.C., Jin, X., Wang, M., Chen, N., Wu, X., Ju, J., Mei, J., Shi, Y., He, M., Wang, G., Liang, J., Wang, Z., Cao, D., Carter, M.T., Chrysler, C., Drmic, I.E., Howe, J.L., Lau, L., Marshall, C.R., Merico, D., Nalpathamkalam, T., Thiruvahindrapuram, B., Thompson, A., Uddin, M., Walker, S., Luo, J., Anagnostou, E., Zwaigenbaum, L., Ring, R.H., Wang, Jian, Lajonchere, C., Wang, Jun, Shih, A., Szatmari, P., Yang, H., Dawson, G., Li, Y., Scherer, S.W., 2013. Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* 93, 249–263.
- Kaestner, L., 2013. Calcium signalling: Approaches and Findings in the Heart and Blood. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kaestner, L., Lipp, P. (Eds.), 2018. Microscopy of the Heart. Springer International Publishing, Cham.
- Katchman, A., Yang, L., Zakharov, S.I., Kushner, J., Abrams, J., Chen, B.-X., Liu, G., Pitt, G.S., Colecraft, H.M., Marx, S.O., 2017. Proteolytic cleavage and PKA phosphorylation of α_{1C} subunit are not required for adrenergic regulation of Ca_v1.2 in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 9194–9199.
- Kessing, L., Rytgaard, H., Ekstrøm, C., Torp-Pedersen, C., Berk, M., Gerds, T., 2020. Antihypertensive Drugs and Risk of Depression: A Nationwide Population-Based Study. *Hypertension* 76.

- Kiess, T.-O., 2019. Die Regulation des nucleären Kalziumtransienten in ventrikulären Kardiomyozyten (Dissertation, Philipps-Universität Marburg).
- Kisko, T.M., Braun, M.D., Michels, S., Witt, S.H., Rietschel, M., Culmsee, C., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M., 2018. *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats. *Dis. Model. Mech.* 11, dmm034116.
- Kockskämper, J., 2016. Excitation–Contraction Coupling of Cardiomyocytes. In: Schlüter, K.-D. (Ed.), *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease*. Springer International Publishing, Cham, pp. 67–96.
- Kong, H., Jones, P.P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H.J., Chen, S.R.W., 2008. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal* 414, 441–452.
- Larbig, R., Torres, N., Bridge, J.H.B., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., 2010. Activation of reverse Na⁺-Ca²⁺ exchange by the Na⁺ current augments the cardiac Ca²⁺ transient: evidence from NCX knockout mice: *I*_{Na}-induced NCX and excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology* 588, 3267–3276.
- Lee, A.S., Ra, S., Rajadhyaksha, Aditi M., Britt, J.K., De Jesus-Cortes, H., Gonzales, K.L., Lee, A., Moosmang, S., Hofmann, F., Pieper, A.A., Rajadhyaksha, Anjali M., 2012. Forebrain elimination of *cacna1c* mediates anxiety-like behavior in mice. *Mol Psychiatry* 17, 1054–1055.
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C.J., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., Hofmann, F., Moosmang, S., 2008. Unchanged β -Adrenergic Stimulation of Cardiac L-type Calcium Channels in Ca_v 1.2 Phosphorylation Site S1928A Mutant Mice. *J. Biol. Chem.* 283, 34738–34744.
- Liu, G., Papa, A., Katchman, A.N., Zakharov, S.I., Roybal, D., Hennessey, J.A., Kushner, J., Yang, L., Chen, B.-X., Kushnir, A., Dangas, K., Gygi, S.P., Pitt, G.S., Colecraft, H.M., Ben-Johny, M., Kalocsay, M., Marx, S.O., 2020. Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature* 577, 695–700.
- Liu, M.B., Ko, C.Y., Song, Z., Garfinkel, A., Weiss, J.N., Qu, Z., 2016. A Dynamical Threshold for Cardiac Delayed Afterdepolarization-Mediated Triggered Activity. *Biophys J* 111, 2523–2533.
- Marquette, C.A., Blum, L.J., 2006. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 385, 546–554.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., Marks, A.R., 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365–376.
- Melrose, D.G., Dreyer, B., Bentall, H.H., Baker, J.B.E., 1955. ELECTIVE CARDIAC ARREST. *The Lancet* 266, 21–23.
- Moon, A.L., Haan, N., Wilkinson, L.S., Thomas, K.L., Hall, J., 2018. CACNA1C: Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis. *Schizophrenia Bulletin* 44, 958–965.
- Moosmang, S., 2003. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO Journal* 22, 6027–6034.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W., 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440–443.
- Nyegaard, M., Demontis, D., Foldager, L., Hedemand, A., Flint, T.J., Sørensen, K.M., Andersen, P.S., Nordentoft, M., Werge, T., Pedersen, C.B., Hougaard, D.M., Mortensen, P.B., Mors, O., Børglum, A.D., 2010. CACNA1C (rs1006737) is associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15, 119–121.

- Paddock, S.W., 1999. Confocal Laser Scanning Microscopy 27, 10.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Klinke, R., Brenner, B., 2019. Physiologie.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D., 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143–151.
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P., Yue, D.T., 1999. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549–558.
- Plačković, J., Kockskämper, J., 2018. Isolation of Atrial and Ventricular Cardiomyocytes for In Vitro Studies. *Methods Mol Biol* 1816, 39–54.
- Powell, T., 1983. The calcium paradox and isolated myocytes. *European Heart Journal* 4, 105–111.
- Redecker, T.M., Kisko, T.M., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M., 2019. Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats. *Behav Brain Res* 367, 35–52.
- Reuter, H., 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301, 569–574.
- Reuter, H., Han, T., Motter, C., Philipson, K.D., Goldhaber, J.I., 2004. Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: defects in excitation-contraction coupling: E-C coupling in mice overexpressing NCX1. *The Journal of Physiology* 554, 779–789.
- Reuter, H., Scholz, H., 1977. The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. *The Journal of Physiology* 264, 49–62.
- Rogers, T.B., Inesi, G., Wade, R., Lederer, W.J., 1995. Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Biosci Rep* 15, 341–349.
- Rosati, B., Dong, M., Cheng, L., Liou, S.-R., Yan, Q., Park, J.Y., Shiang, E., Sanguinetti, M., Wang, H.-S., McKinnon, D., 2008. Evolution of ventricular myocyte electrophysiology. *Physiological Genomics* 35, 262–272.
- Rosati, B., Yan, Q., Lee, M.S., Liou, S.-R., Ingalls, B., Foell, J., Kamp, T.J., McKinnon, D., 2011. Robust L-type calcium current expression following heterozygous knockout of the *Cav1.2* gene in adult mouse heart: Robust expression of L-type calcium current. *The Journal of Physiology* 589, 3275–3288.
- Rougier, J.-S., Abriel, H., 2016. Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 1806–1812.
- Rutledge, T., Reis, V.A., Linke, S.E., Greenberg, B.H., Mills, P.J., 2006. Depression in heart failure a meta-analytic review of prevalence, intervention effects, and associations with clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 48, 1527–1537.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kühbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., Hofmann, F., 2000. Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type α_{1C} (*Ca_v1.2*) Calcium Channel Gene in the Mouse. *J. Biol. Chem.* 275, 39193–39199.
- Sellin, L.C., McArdle, J.J., 1994. Multiple Effects of 2,3-Butanedione Monoxime. *Pharmacology & Toxicology* 74, 305–313.
- Shannon, T.R., Ginsburg, K.S., Bers, D.M., 2000. Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophys J* 78, 334–343.
- Shaw, R.M., Colecraft, H.M., 2013. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* 98, 177–186.

- Sitsel, A., De Raeymaecker, J., Drachmann, N.D., Derua, R., Smaardijk, S., Andersen, J.L., Vandecaetsbeek, I., Chen, J., De Maeyer, M., Waelkens, E., Olesen, C., Vangheluwe, P., Nissen, P., 2019. Structures of the heart specific SERCA 2a Ca²⁺ - ATP ase. *EMBO J* 38.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- Snutch, T.P., Reiner, P.B., 1992. Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Current Opinion in Neurobiology* 2, 247–253.
- Sokoreli, I., de Vries, J.J.G., Pauws, S.C., Steyerberg, E.W., 2016. Depression and anxiety as predictors of mortality among heart failure patients: systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev* 21, 49–63.
- Solaro, R.J., Rarick, H.M., 1998. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res* 83, 471–480.
- Song, L.-S., Guia, A., Muth, J.N., Rubio, M., Wang, S.-Q., Xiao, R.-P., Josephson, I.R., Lakatta, E.G., Schwartz, A., Cheng, H., 2002. Ca²⁺ Signaling in Cardiac Myocytes Overexpressing the α_1 Subunit of L-Type Ca²⁺ Channel. *Circulation Research* 90, 174–181.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S.G., Sanguinetti, M.C., Keating, M.T., 2004. CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell* 119, 19–31.
- Striessnig, J., Bolz, H.J., Koschak, A., 2010. Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch* 460, 361–374.
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., Tuluc, P., 2014. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3, 15–38.
- Tsien, R.W., Bean, B.P., Hess, P., Lansman, J.B., Nilius, B., Nowycky, M.C., 1986. Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol* 18, 691–710.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *J Biol Chem* 263, 8–11.
- Van der Kooy, K., van Hout, H., Marwijk, H., Marten, H., Stehouwer, C., Beekman, A., 2007. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 22, 613–626.
- Vassalle, M., Lin, C.-I., 2004. Calcium overload and cardiac function. *J Biomed Sci* 11, 542–565.
- Verdecchia, P., 2002. Prevalent influence of systolic over pulse pressure on left ventricular mass in essential hypertension. *European Heart Journal* 23, 658–665.
- Wallukat, G., 2002. The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27, 683–690.
- Wegener, A.D., Simmerman, H.K., Lindemann, J.P., Jones, L.R., 1989. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264, 11468–11474.
- Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S.R., Marks, A.R., 2004. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70.
- Wemhöner, K., Friedrich, C., Stallmeyer, B., Coffey, A.J., Grace, A., Zumhagen, S., Seebohm, G., Ortiz-Bonnin, B., Rinné, S., Sachse, F.B., Schulze-Bahr, E., Decher, N., 2015. Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 80, 186–195.

- Whalley, D.W., Wendt, D.J., Grant, A.O., 1995. Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: Part I: Ion channels, membrane currents, and the action potential. *Pacing Clin Electrophysiol* 18, 1556–1574.
- Yang, L., Katchman, A., Kushner, J., Kushnir, A., Zakharov, S.I., Chen, B., Shuja, Z., Subramanyam, P., Liu, G., Papa, A., Roybal, D., Pitt, G.S., Colecraft, H.M., Marx, S.O., 2019. Cardiac CaV1.2 channels require β subunits for β -adrenergic-mediated modulation but not trafficking. *Journal of Clinical Investigation* 129, 647–658.
- Yang, S.-N., Berggren, P.-O., 2006. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27, 621–676.
- Yates, A.D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, James, Allen, Jamie, Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Azov, A.G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J.C., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., Giron, C.G., Gil, L., Grego, T., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Martinez, J.G., Maurel, T., McDowall, M., McMahon, A., Mohanan, S., Moore, B., Nuhn, M., Oheh, D.N., Parker, A., Parton, A., Patricio, M., Sakthivel, M.P., Abdul Salam, A.I., Schmitt, B.M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sycheva, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Vullo, A., Walts, B., Winterbottom, A., Zadissa, A., Chakiachvili, M., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S.E., Ilesley, G., Kostadima, M., Langridge, N., Loveland, J.E., Martin, F.J., Morales, J., Mudge, J.M., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Trevanion, S.J., Cunningham, F., Howe, K.L., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2019. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research* gkz966.
- Yue, D.T., Herzig, S., Marban, E., 1990. Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 753–757.
- Zimmer, H.-G., 1998. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci* 13, 203–210.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1-1: Der makromolekulare Cav1.2-Komplex..... | 6 |
| Abbildung 1-2: Elektromechanische Kopplung im Ventrikelmyozyten..... | 17 |
| Abbildung 2-1: Strukturformel Koffein..... | 27 |
| Abbildung 2-2: Strukturformel Isoprenalin | 28 |
| Abbildung 2-3: Strukturformel Thapsigargin..... | 30 |
| Abbildung 2-4: Langendorff-Apparatur..... | 41 |
| Abbildung 2-5: Konfokales Prinzip am Laser-Scanning-Mikroskop..... | 45 |
| Abbildung 2-6: Spektraleigenschaften von Fluo-4 | 47 |
| Abbildung 2-7: Struktur von Fluo-4/AM..... | 48 |
| Abbildung 2-8: Zeiss LSM 510 Setup | 50 |
| Abbildung 2-9: Linescan-Modus..... | 50 |
| Abbildung 2-10: Ventrikelmyozyt am Visitech-2D-Konfokalmikroskop..... | 51 |
| Abbildung 2-11: Beispiel-CaT mit analysierten Parametern | 53 |
| Abbildung 2-12: BCA-Reaktion | 57 |
| Abbildung 3-1: <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Tiere zeigen keine Anzeichen einer Herzhyper- oder -hypotrophie | 69 |
| Abbildung 3-2: <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Tiere zeigen niedrigere diastolische und systolische Blutdruckwerte, bei unveränderter Herzfrequenz..... | 70 |
| Abbildung 3-3: Ca _v 1.2-Western Blots von LV Gewebe..... | 71 |
| Abbildung 3-4: Ca _v 1.3- und Ca _v β2-Western Blots von LV Gewebe..... | 72 |
| Abbildung 3-5 Expression und Phosphorylierung der Calcium-regulierenden Proteine | 74 |
| Abbildung 3-6: Messung elektrisch-stimulierter CaT unter basalen Bedingungen (1 Hz)..... | 76 |
| Abbildung 3-7: Koffeinapplikation unter basalen Bedingungen..... | 78 |
| Abbildung 3-8 Isoprenalin-Behandlung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten..... | 81 |
| Abbildung 3-9: Koffeinapplikation in Gegenwart von ISO (100 nM) | 83 |
| Abbildung 3-10: Frequenzabhängigkeit der CaT in Gegenwart von ISO..... | 85 |
| Abbildung 3-11: Zeitabhängige Verringerung (Rundown) der CaT-Amplitude..... | 86 |
| Abbildung 3-12: Die ISO-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Myozyten rechtsverschoben | 88 |
| Abbildung 3-13 Phosphorylierungsstatus von RyR2 und Ca _v 1.2 ISO-behandelter Herzen..... | 90 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3-14: PLB-Phosphorylierungsstatus ISO-behandelter Herzen | 91 |
| Abbildung 3-15 Beispieltransienten im Thapsigargin-Protokoll | 92 |
| Abbildung 3-16 Messung des sarkolemmalen Ca-Einstroms vor und nach ISO-Gabe..... | 94 |
| Abbildung 4-1: Expression und Phosphorylierung Calcium-regulierender Proteine in WT- und <i>Cacna1c</i> ^{+/-} -Myozyten unter basalen Bedingungen | 103 |
| Abbildung 4-2: Messung des Ca-Einstroms nach Ausschalten des SR..... | 108 |
| Abbildung 4-3: Steigerung der Phosphorylierung Ca-regulierender Proteine von basalen zu gestressten Bedingungen (ISO) | 111 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2-1: Pfotenmarkierungssystem Bauchansicht (<i>ventral</i>) | 25 |
| Tabelle 2-2: Koffeinlösung..... | 28 |
| Tabelle 2-3: Isoprenalinlösungen | 29 |
| Tabelle 2-4: Thapsigarginlösungen..... | 30 |
| Tabelle 2-5: Standard Tyrode-Lösung (1 l) | 34 |
| Tabelle 2-6: Lösungen für die Zellisolation..... | 35 |
| Tabelle 2-7: Lösungen zur Herzbehandlung an der Langendorff-Apparatur | 43 |
| Tabelle 2-8: Messlösung (1 l)..... | 49 |
| Tabelle 2-9: Homogenisierungspuffer, 100 ml..... | 56 |
| Tabelle 2-10: 4x Lämmli-Puffer, 20 ml | 58 |
| Tabelle 2-11: Tris-Tricin-Gele | 59 |
| Tabelle 2-12: Elektrophoresepuffer | 60 |
| Tabelle 2-13: 10x Transferpuffer, 1 l..... | 61 |
| Tabelle 2-14: TBST-Puffer, 1 l..... | 63 |
| Tabelle 2-15: Stripping-Puffer, 200 ml | 63 |
| Tabelle 2-16: Liste der verwendeten Antikörper | 64 |

Publikationen

Kongressbeiträge

Fender, H., Kiper, A., Plackic, J., Kisko, T., Braun, M., Wöhr, M., Decher, N., Kockskämper, J., (2020). Altered PKA-dependent phosphorylation of calcium handling proteins and impaired β -adrenergic response in ventricular myocytes from *Cacna1c*^{+/-} rats. ***Clin Res Cardiol* 109, Suppl 1, April 2020 - Beitrag P552.** [Poster]

Fender H, Kiper A, Plačkić J, Kisko TM, Braun MD, Decher N, Wöhr M, Kockskämper J. (2019). Stress unmasks calcium handling alterations in ventricular myocytes from *Cacna1c*^{+/-} rats. ***Clin Res Cardiol* 108, Suppl 1: P567.** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); APR 24-27, 2019; Mannheim, Deutschland. [Poster]

Fender H, Kiper A, Plačkić J, Braun MD, Decher N, Wöhr M, Kockskämper J. (2018). Remodeling of calcium handling proteins and contractility in ventricular myocardium and myocytes from *Cacna1c*^{+/-} rats. ***Clin Res Cardiol* 107, Suppl 3: BS256.** Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); OCT 11-13, 2018; Berlin, Deutschland. [Poster]

Danksagung

Es gibt viele Menschen, denen Ich für die Unterstützung und Freundschaft während der letzten fünf Jahre sehr dankbar bin. Zunächst gilt mein besonderer Dank allerdings meinem Doktorvater Prof. Dr. Jens Kockskämper. Mit einer immer offenen Tür und offenem Ohr, als auch einer durchweg positiven Einstellung hat er mich durch meine Doktorandenzeit geleitet und ist maßgeblich daran beteiligt, dass ich nie den Mut und noch wichtiger: auch nie die Lust verloren habe.

Meinen Dank möchte ich auch an Prof. Dr. Carsten Culmsee, Prof. Dr. Moritz Bünemann, Prof. Dr. Cornelius Krasel und Prof. Dr. Katja Nieweg richten, die mit kritischen Anregungen und Ihrem Wissen zum Fortschritt meiner Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Markus Wöhr, Dr. Aytug Kiper und Prof. Dr. Niels Decher für Ihren Beitrag zu meinem Forschungsprojekt danken.

Ich habe mich in den letzten Jahren in unserem Institut sehr wohl gefühlt und der ausschlaggebende Faktor daran waren meine Mitmenschen. Ich möchte also allen Kollegen aus unserem Institut von ganzem Herzen für die schöne Zeit danken. Aus meiner AG möchte ich Jelena, Julia, Victoria, Tobias und auch unseren Mediziner-Doktoranden für die Unterstützung und vorallem die gute Atmosphäre danken.

Zuletzt danke ich allen meinen Freunden, meiner Familie, meiner Freundin Anni und meinen Eltern im Besonderen. Ohne Euch, den Humor und die Musik wäre garnichts möglich gewesen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Calciumregulation in Kardiomyozyten haploinsuffizienter *Cacna1c*^{+/-}-Ratten“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

.....
(Hauke Fender)

