

Aus dem Bereich Molekulare Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Calcium-Homöostase in Kardiomyozyten unterschiedlichen  
Ursprungs in verschiedenen Mausmodellen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2010*

vorgelegt von Wiebke Tabellion  
geb. am 29. November 1977 in Saarbrücken

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
2.1 Bedeutung und Funktion des Herzens .....	6
2.2 Struktur und Morphologie des Herzens .....	6
2.3 Elektrische Aktivität des Herzens und Generation des Herzschlags .....	8
2.4 Erregung der einzelnen Kardiomyozyten.....	10
2.5 Ca <sup>2+</sup> -Signale in Kardiomyozyten.....	13
2.6 Regulation der Herzaktivität durch das vegetative Nervensystem.....	18
2.7 Herzarrhythmien .....	20
2.8 G-Protein-gekoppelte Signalwege .....	22
2.9 Endothelin-1 und Inositol-1,4,5-Trisphosphat .....	24
2.10 Fragestellung der Arbeit.....	26
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1 Mäuse.....	29
3.2 Isolation von Kardiomyozyten aus adulten Mäusen .....	30
3.3 Implantation von osmotischen Minipumpen zur chronischen Gabe von Hormonen .....	32
3.4 Gewinnung von Blutproben / ET-1-Bestimmung .....	34
3.5 Aufnahme von Anregungs- und Fluoreszenzspektren.....	35
3.6 Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration mittels Fluoreszenzfarbstoffe.....	36
3.7 Statistische Tests .....	46
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1 Einfluss von Koffein auf spektrale Eigenschaften verschiedener Ca <sup>2+</sup> - sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe .....	47
4.2 Untersuchungen der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration in GCaMP2- exprimierenden Mausventrikelmiozyten .....	53
4.3 Charakterisierung von Myozyten der Vorhöfe und des Ventrikels mit Indo-1 .. .....	65

4.4	Endothelin-1-abhängige Veränderung der Calcium-Homöostase in Mausekardiomyozyten .....	79
4.5	Isoproterenol-Experimente in Kardiomyozyten aus TRPC1 <sup>-/-</sup> /C4 <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout-Mäusen .....	83
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1	Spektren: Einfluss von Koffein auf Fluoreszenzfarbstoffe .....	88
5.2	Genetisch kodierter Calcium-Sensor GCaMP2 .....	91
5.3	Charakterisierung von Myozyten der Vorhöfe und des Ventrikels mit Indo-1 .. .....	98
5.4	Endothelin-1 .....	108
5.5	Einfluss des TRPC1 <sup>-/-</sup> C4 <sup>-/-</sup> -Knockout auf die Amplitudenhöhe von elektrisch induzierten Ca <sup>2+</sup> -Transienten .....	110
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ MHC	Alpha myosin heavy chain (schwere Kette des alpha-Myosins)
Abb.	Abbildung
AM	Azetoxyethyl-Ester
AP	Aktionspotenzial
a.u.	Arbitrary Units (willkürliche Einheiten)
AV-Knoten	Atrioventrikular-Knoten
[Ca <sup>2+</sup> ]	Calcium-Konzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge-coupled Device
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CICR	Calcium-induced Calcium Release (Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung)
CHF	Congestive Heart Failure (kongestives Herzversagen)
DAG	Diazylglyzerin
ECC	Excitation-contraction Coupling (elektromechanische Kopplung)
ECM	Extracellular Matrix (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Fluoreszenz
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein coupled receptors (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
Hz	Hertz
I	Intensität
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor
Iso	Isoproterenol
kg	Kilogramm
LVH	Linker Vorhof
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
nm	Nanometer
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
ROI	Region of Interest (Region von Interesse)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RVH	Rechter Vorhof
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptoren
s	Sekunde

SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SERCA	Sarkoendoplasmatische Retikulum $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
tetO	tet Operator Sequenzen
tTA	$\alpha$ MHC-tetracyclin-Transaktivatorallel
T-Tubuli	Transversale Tubuli
TRPC	Transient Receptor Potential Channels (TRP-Kanäle)
U	Units (Einheiten)
V	Volt
wt	Wildtyp

# 1 Zusammenfassung

## Calcium-Homöostase in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten verschiedener Mausmodelle

Herzerkrankungen, wie z.B. Vorhofflimmern, zählen heute zu den meistverbreiteten Krankheiten in der Bevölkerung der westlichen Welt. Sie stellen eine starke Beeinträchtigung für Patienten und eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem dar. Um effektive und effiziente Methoden zur Vorbeugung oder der Behandlung zu entwickeln, ist es notwendig, die zellulären und molekularen Ursachen für die Entstehung und Aufrechterhaltung zu kennen. Herzpathologien von Vorhof und Ventrikel weisen Unterschiede im Auftreten und in den Auswirkungen auf; auch die zellulären und molekularen Veränderungen können sehr unterschiedlich sein. Für ein besseres Verständnis dieser Herzerkrankungen werden immer häufiger Mausmodelle humaner Erkrankungen herangezogen.

Primäres Ziel meiner Arbeit war es, mögliche Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Kardiomyozyten aus den beiden Vorhöfen und dem Ventrikel verschiedener Mausmodelle zu untersuchen, die als zelluläre und molekulare Ursachen für Herzpathologien wie Vorhofflimmern in Frage kommen. Ich habe zur Analyse verschiedener Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase optisch-bildgebende Verfahren verwendet, um an einzelnen isolierten Mausekardiomyozyten Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verfolgen zu können.

Zur Auswahl des geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs für  $\text{Ca}^{2+}$  unter den von mir verwendeten Versuchsbedingungen habe ich im ersten Teil meiner Arbeit die Eignung der niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, Fura Red und Indo-1 sowie des genetisch kodierten Fluoreszenzfarbstoff GCaMP2 für meine Experimente analysiert. In einer *in vitro*-Versuchsreihe zur Untersuchung möglicher Effekte von Koffein, das zur Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR eingesetzt wird, auf Fura-2, Fura Red und Indo-1 stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität und das Spektrum aller drei Fluoreszenzfarbstoffe von Koffein beeinflusst wird, dass jedoch diese Effekte bei Indo-1 vergleichsweise am geringsten waren. *In vitro*-Experimente an Kardiomyozyten mit GCaMP2 und Fura-2 zeigten, dass mit GCaMP2 in einem kleineren Teil der Zellpopulation  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale registriert werden konnten als mit Fura-2. Ferner zeigte GCaMP2 schlechtere kinetische Eigenschaften, so dass die

Verwendung von GCaMP2 zusätzliche Schritte zur Korrektur bei der Auswertung der Daten notwendig macht. Aus diesen Gründen erwies sich Indo-1 als der vergleichsweise geeignetste Farbstoff für meine Experimente.

Im zweiten Teil meiner Arbeit habe ich in intakten Zellen verschiedene Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Myozyten des linken und des rechten Vorhofs sowie des Ventrikels verschiedener Mausmodelle untersucht.

Zunächst habe ich eine Grundcharakterisierung dieser drei Zelltypen in Wildtypmäusen vorgenommen und i) diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ , ii) Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen, iii) Post Rest-Verhalten, iv)  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums und v) Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der SERCA-Pumpe untersucht. Einige dieser Parameter unterscheiden sich signifikant bei den untersuchten Zelltypen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Zellen des Ventrikels, des linken und des rechten Vorhofs in verschiedenen Parametern unterscheidet. Diese Unterschiede sollten bedacht werden bei der Verwendung von Myozyten, da sie zeigen, dass Ventrikelzellen nicht repräsentativ für alle Kardiomyozytentypen sind, und bieten Ansätze für weitere Analysen zu den zellulären und molekularen Ursachen der Entstehung und Aufrechterhaltung von Herzpathologien wie Vorhofflimmern.

In einer weiteren Versuchsreihe habe ich die Auswirkungen von chronischer Endothelin-1 (ET-1)-Gabe bei lebenden Mäusen und von akuter ET-1-Gabe während der Einzelzellexperimente auf die Amplitude elektrisch induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den drei verschiedenen Kardiomyozytentypen von wt-Mäusen untersucht. Bei Zellen aus Mäusen mit chronischer Infusion einer Kontroll-Lösung waren die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter dem Einfluss von akutem ET-1 stärker erhöht als bei Zellen von Mäusen mit chronischer ET-1-Infusion. Die Erhöhung der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten war bei Zellen der beiden Vorhöfe aus Kontrollmäusen und bei Zellen des linken Vorhofs bei Mäusen mit chronischer ET-1-Infusion signifikant. Dies zeigt, dass die drei Zelltypen unterschiedlich auf ET-1 reagieren und dass bei chronischer Gabe ein Mechanismus existiert, der zu einer verringerten Reaktion auf akutes ET-1 führen kann.

Um die Rolle von TRPC1- und TRPC4-Kanälen bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zu untersuchen, habe ich im letzten Teil meiner Arbeit anhand von intakten

Ventrikelzellen aus TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen analysiert, welche Auswirkungen das Fehlen von TRPC1- und TRPC4-Kanälen auf die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Transienten bei chronischer und akuter  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol hat, um Hinweise auf die physiologische Rolle von TRPC1- und TRPC4-Kanälen in der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die Abwesenheit von TRPC1- und TRPC4-Kanälen im Hinblick auf die Höhe der Amplituden von elektrisch induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten keine Auswirkung auf die Reaktion der Ventrikelzellen auf akutes Isoproterenol hat. Zellen aus TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup> und aus Wildtyp-Mäusen zeigten eine Erhöhung der Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Transienten bei akuter Gabe von Isoproterenol, unabhängig davon, ob die Mäuse eine chronische Infusion mit Isoproterenol- oder Kontroll-Lösung erhielten. Eine chronische Infusion mit Isoproterenol bewirkte bei Wildtyp- und TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Erhöhung der Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Transienten. TRPC1- und TRPC4-Kanäle scheinen in Bezug auf die Transientenamplitude bei der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase keine tragende Rolle zu spielen. Ferner scheint in Ventrikelzellen ein Mechanismus zu existieren, der zu einer Desensibilisierung für Isoproterenol führt.

### **Calcium homeostasis in atrial and ventricular cardiac myocytes of varying mouse models**

Cardiac diseases like atrial fibrillation are amongst the most common diseases within the western population. They affect the patients and cause high costs for the health system. In order to develop efficient and effective methods for their prevention or their treatment it is necessary to know about the cellular and molecular mechanisms for their development and maintenance. Cardiac pathologies of atria and ventricles show differences in their occurrence and effects, and also the cellular and molecular changes can be distinct. For a better understanding of these pathologies mouse models of human pathologies become increasingly important.

The main aim of my work was to elucidate possible differences concerning the calcium homeostasis in cardiac myocytes from the ventricles and atria of various mouse models that might account for cardiac pathologies. In order to investigate several parameters of the calcium homeostasis of individual cardiomyocytes I have

applied imaging methods that enabled me to analyse the changes in calcium concentration within the cardiomyocytes.

The first part of my work has dealt with the choice of the most appropriate fluorescent dye for calcium. Among the low-molecular dyes Fura-2, Fura Red and Indo-1 and the genetic encoded calcium sensor GCaMP2, the most appropriate dye proved to be Indo-1 as it has shown to be least influenced by caffeine that was used in some of my further experiments and as it had no disadvantages regarding its kinetic properties like GCaMP2 when examining fast changes in the cytosolic calcium concentration.

In the second part of my work I have investigated parameters of the calcium homeostasis within cardiac myocytes of ventricles as well as of left and right atria using various mouse models.

A basal characterisation of cardiomyocytes from left and right atria and from ventricles of wild type mice has revealed differences between the three different cell types when investigating calcium homeostasis. Whereas some parameters have remained constant, some others have shown a significant difference between ventricular cells or cells from the left and right atria, suggesting that ventricular myocytes cannot be used as representative cardiomyocytes and that some of the differences might account for the differences in cardiac pathologies.

Further studies aimed to show the influence of the administration of ET-1, given chronically to wild type mice or applied acutely during single cell experiments, on the amplitude of electrically induced calcium transients. The experiments have shown that ET-1 increased the amplitude of some of the cell types but this effect was augmented in cells of mice that have received an infusion with a control solution instead of ET-1. This depicts that the three cell types react in a different manner to ET-1 and suggests a mechanism that leads to a reduced reaction when ET-1 is chronically administered.

In order to shed light on the involvement of TRPC1 and TRPC4 channels on the calcium homeostasis of ventricular cardiomyocytes I have investigated the impact of the lack of these channels on the amplitude of calcium transients of ventricular cells of wild type and TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup> mice under chronic and acute application of the  $\beta$ -adrenergic agonist Isoproterenol. The results have shown that the absence of TRPC1 and TRPC4 channels had no influence on the amplitude of the calcium

transients but that the chronic application of Isoproterenol had reduced the increase of the calcium transients upon acute Isoproterenol stimulation in wild type and TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup> mice. These results suggest that TRPC1 and TRPC4 channels do not play a pivotal role in the generation of calcium transients.

## **2 Einleitung**

### ***2.1 Bedeutung und Funktion des Herzens***

Jeder Organismus benötigt zum Überleben eine ausreichende Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport des metabolischen Abfalls. Während dies bei ein- und wenigzelligen Lebewesen noch durch Diffusion oder Transport über die Körperoberfläche geschehen kann, sind bei vielzelligen Organismen komplexere Transport- und Verteilungssysteme notwendig. Bei Säugetieren wird die Aufgabe der Versorgung jeder Körperzelle durch das Herz-Kreislauf-System und das Blut übernommen.

Das Blut transportiert durch Zirkulation im Gefäßsystem des Körpers Nährstoffe und Sauerstoff zu den einzelnen Zellen und sorgt für den Abtransport von Stoffwechselprodukten, u. a. Kohlendioxid. Der Antrieb der Blutzirkulation ist das Herz, ein muskuläres Organ, das durch rhythmische Kontraktionen das Blut durch den gesamten Körper pumpt. Durch die Erfüllung dieser Aufgabe kommt dem Herzen und seiner vollen Funktionsfähigkeit eine besondere Bedeutung zu.

### ***2.2 Struktur und Morphologie des Herzens***

Die effektive Pumpfunktion des Herzens wird vor allem durch seinen besonderen Aufbau ermöglicht. Es handelt sich um ein muskulöses Hohlorgan, das verschiedene Kammern und Einwegventile, die Herzklappen, besitzt. Diese Elemente sind derart angeordnet, dass sie wie zwei hintereinander geschaltete Pumpen arbeiten. Der Herzaufbau ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Das Herz besteht aus einer linken und einer rechten Herzhälfte, die ihrerseits aus einem Vorhof (Atrium) und einer Hauptkammer (Ventrikel) bestehen, welche durch Segelklappen voneinander getrennt sind.

Die rechte Herzhälfte nimmt das sauerstoffarme Blut aus dem gesamten Körper auf und führt es der Lunge zu, wo es mit Sauerstoff angereichert wird und Kohlendioxid abgibt. Die linke Herzhälfte pumpt das aus der Lunge zurückgekehrte sauerstoffreiche Blut in den Körperkreislauf zurück.

Die Pumpwirkung des Herzens beruht auf dem rhythmischen Wechsel von Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) der Herzkammern. In der Diastole füllen sich die Hauptkammern mit Blut, in der Systole werfen sie es in die großen Arterien (*Arteria pulmonalis*, Aorta) aus. Jedem Ventrikel ist ein Atrium vorgeschaltet, der das Blut aus den großen Venen (*Venae cavae*, *Venae pulmonales*) aufnimmt. Die Systole der Vorhöfe geht der Ventrikelsystole voraus und unterstützt die Füllung der Hauptkammern. Der Großteil der Hauptkammerfüllung in Ruhe erfolgt jedoch durch einen Sog-Effekt bei Erschlaffung und somit Volumenzunahme der Hauptkammern. Die Segelklappen zwischen den Atrien und den Ventrikeln sowie die Taschenklappen in der *Arteria pulmonalis* und der Aorta verhindern beim Pumpvorgang durch Ventilwirkung einen Rückfluss des Blutes in einen vorgeschalteten Abschnitt des Kreislaufs.

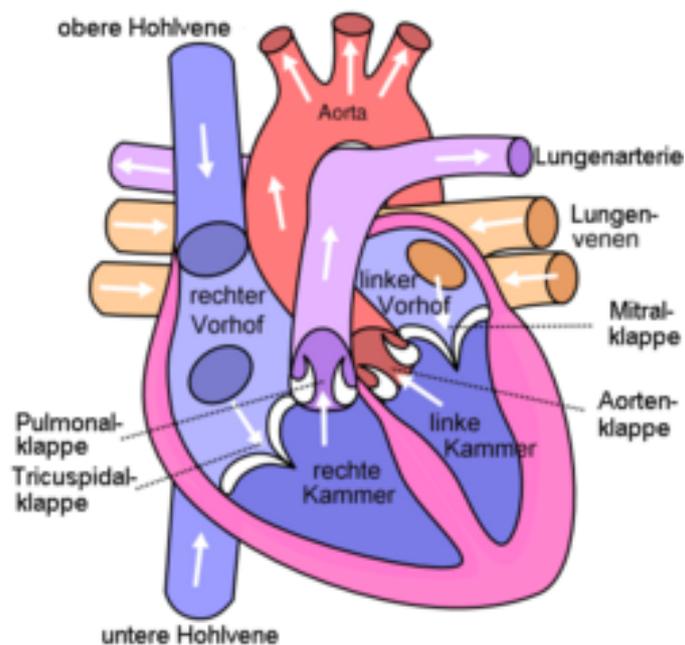


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des menschlichen Herzens und des Blutflusses durch die einzelnen Herzkammern. Quelle: [mecumwiki.fachschafft-medizin.de](http://mecumwiki.fachschafft-medizin.de).

Die Herz wand besteht aus drei Schichten, dem innen liegenden Endokard, dem Meso- oder Myokard und dem außen liegenden Epikard. Das Endokard besteht aus einschichtigem Epithelgewebe, das die Innenräume des Herzens auskleidet und die Herzklappen bildet. Die glatte Epithelschicht verhindert auch die Bildung von Blutgerinnseln. Das Epikard überzieht die Herzoberfläche als ebenfalls

einschichtiges Epithelgewebe und bildet die innere Schicht des Herzbeutels. Das Meso- oder Myokard ist der eigentliche Herzmuskel, der für die Kontraktion und somit die Pumpleistung des Herzens verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um eine kräftig ausgebildete Muskelschicht aus einzelnen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), die elektrisch leitend durch Gap Junctions miteinander verbunden sind. Im Myokard findet man zwei Typen von Herzmuskelgeweben: das Erregungsleitungssystem, dessen Zellen Erregungsimpulse bilden und weiterleiten, und das Arbeitsmyokard, dessen Zellen die Erregungsimpulse mit einer Kontraktion beantworten.

Zusätzlich zu den genannten Gewebetypen findet man im Herzen auch Blutgefäße. Hierzu gehören die großen zuleitenden und ableitenden Gefäße. Als Venen führen die *Venae pulmonales* und die *Venae cavae* das Blut aus dem Körper- bzw. Lungenkreislauf den entsprechenden Vorhöfen zu, während zwei Arterien, die Aorta und die *Arteria pulmonalis* das Blut aus den Ventrikeln wieder in den Lungen- und den Körperkreislauf entlassen. Da die großen Arterien und Venen für den Transport des Blutes vom und zum restlichen Körper verantwortlich sind, besitzt das Myokard zur Eigenversorgung gesonderte Gefäße, die Koronargefäße. Weitere zelluläre Bestandteile des Herzens bilden Nervenzellen des vegetativen Nervensystems, das die Herzaktivität bei Bedarf beeinflusst, und Fibroblasten. Fibroblasten sind die Hauptproduzenten für Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM), die ein Netzwerk bildet, das den Myozyten strukturelle, mechanische und chemische Unterstützung bietet. Sie besteht aus verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen. Zu den enthaltenen Strukturproteinen zählen Kollagene und Elastine, zu den Adhäsionsmolekülen u. a. Fibronectin und Laminin. Unter den EZM-Proteinen finden sich auch Liganden für Integrine, die sich auf der Zelloberfläche befinden und in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielen.

### **2.3 Elektrische Aktivität des Herzens und Generation des Herzschlags**

Damit das Herz seine Funktion als Pumpe, die das Blut durch unseren Körper befördert, effizient erfüllen kann, müssen seine Kammern in einer kontrollierten Abfolge kontrahieren. Kardiomyozyten sind elektrisch spezialisierte Muskelzellen mit

spontaner Aktivität, die in einem bestimmten Rhythmus kontrahieren können. Für eine gleichmäßige kontrollierte Kontraktion des Herzens ist daher eine konzertierte Aktivität notwendig. Die Koordination der Kontraktion wird durch ein Erregungsleitungssystem (siehe Abbildung 2) aus spezialisierten Herzzellen mit einer bestimmten Hierarchie und einer festgelegten Abfolge gewährleistet. Diese spezialisierten Herzzellen nennt man Schrittmacher. Primäre Schrittmacher haben eine höhere spontane Frequenz, um nicht von sekundären oder tertiären Schrittmacherzellen dominiert zu werden. Es liegt also eine abnehmende Frequenz entlang des Erregungsleitungssystems vor.

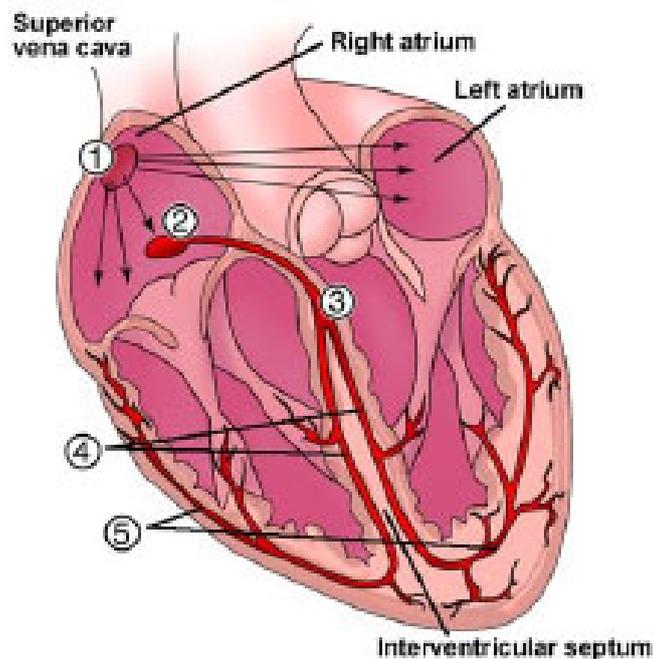


Abbildung 2: Schematische Abbildung des Erregungsleitungssystems des menschlichen Herzens: 1 Sinusknoten, 2 Atrioventrikular-Knoten, 3 His-Bündel, 4 rechter und linker Tawara-Schenkel, 5 Purkinje-Fasern. Quelle: [www.raingarden.wordpress.com](http://www.raingarden.wordpress.com).

Der primäre Schrittmacher der Herzfrequenz als Ort höchster Hierarchie ist der Sinusknoten, von dem aus die Erregung mithilfe des Erregungsleitungssystems über Schrittmacherzentren mit abnehmender Eigenfrequenz weitergeleitet wird. Ausgehend vom Sinusknoten, der nahe der Einmündung der *Vena cava superior* im oberen Teil der Wand des rechten Vorhofs liegt, erregt der elektrische Impuls zunächst die beiden Vorhöfe. Vorhöfe und Ventrikel sind durch elektrisch nicht

erregbare Zellen voneinander isoliert, so dass für die Überleitung der Erregung nur das Erregungsleitungssystem zur Verfügung steht. Die Weiterleitung der Erregung über den Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) in die Ventrikel erfolgt verzögert. Diese Verzögerung ermöglicht ein vollständiges Füllen der Ventrikel. Der AV-Knoten übt auch eine Filterfunktion aus, so dass im Falle von zu hohen Erregungsfrequenzen aus den Vorhöfen, wie z.B. bei atrialen Arrhythmien, nicht jede Erregung auf die Ventrikel übertragen wird. Das daran angeschlossene His-Bündel, die Tawara-Schenkel und seine Endverzweigungen, die Purkinje-Fasern, verteilen die Erregung schnell im Ventrikel, so dass eine homogene, koordinierte Kontraktion beider Ventrikel möglich ist. Falls die Erregungsbildung im Sinusknoten ausfällt oder die Erregung nicht auf die Vorhöfe weitergeleitet wird, übernimmt der AV-Knoten als sekundäres Erregungsbildungszentrum die Schrittmacherfunktion. Fallen beide höchsten Hierarchiestufen der Erregungsbildung aus, kann immer noch ein tertiäres Schrittmacherzentrum die Erregungsbildung übernehmen.

## ***2.4 Erregung der einzelnen Kardiomyozyten***

Erreicht ein elektrischer Impuls eine Kardiomyozyte, stimuliert er ein der Kontraktion zugrundeliegendes Aktionspotenzial (AP), das auf dem Zusammenspiel verschiedener Ionenströme (siehe Abbildung 3) basiert.

Das Ruhemembranpotenzial, das eine Hyperpolarisation mit einem negativen Membranpotenzial von ca. -80 bis -85 mV innen gegenüber außen darstellt, wird durch einen elektrischen Impuls über einen Schwellenwert von -65 mV depolarisiert, was zu der Generierung eines APs nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip führt. Ein typisches AP kann in fünf Phasen eingeteilt werden:

- 0 Aufstrich/schnelle Depolarisation
- 1 Frühe schnelle Repolarisation
- 2 Plateauphase
- 3 Finale schnelle Repolarisation
- 4 Ruhemembranpotenzial oder diastolische Depolarisation

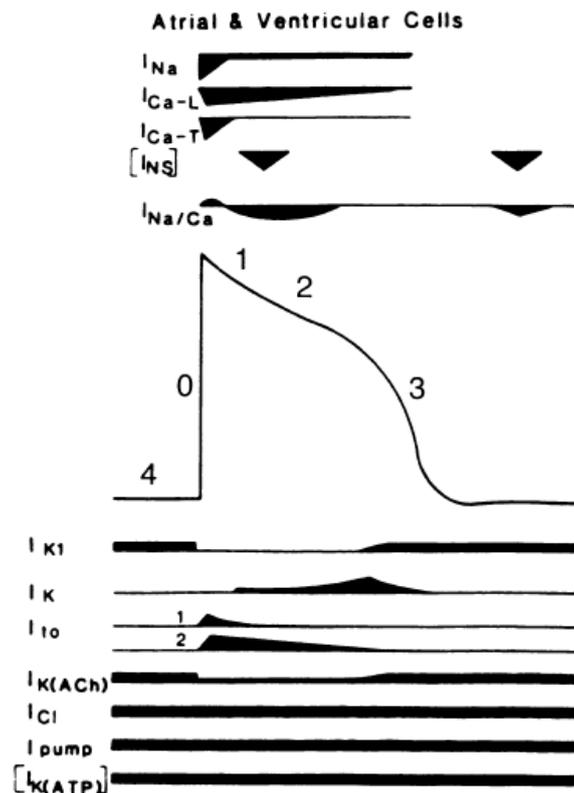


Abbildung 3: Übersicht über die Phasen sowie über die beteiligten Kanäle und Ströme eines Aktionspotenzials in Kardiomyozyten des Vorhof- und Ventrikelmuskels. Der Zeitverlauf entspricht dem eines stilisierten Aktionspotenzials. Phasen des Aktionspotenzials: 0 Aufstrich/schnelle Depolarisation, 1 frühe schnelle Repolarisation, 2 Plateauphase, 3 finale schnelle Repolarisation, 4 Ruhemembranpotenzial bzw. diastolische Depolarisation bei Schrittmacherzellen. Quelle: Shih, 1994

#### 0 Aufstrich/schnelle Depolarisation

Die schnelle Depolarisation tritt ein, wenn das Membranpotenzial einen kritischen Schwellenwert (ca. -60 mV) erreicht, bei dem der Einwärtsstrom von  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) durch spannungsabhängige Natriumkanäle in die Zelle groß genug ist, eine Depolarisation nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip auszulösen. Das Membranpotenzial erreicht dabei maximale Werte zwischen +35 bis +50 mV. Die Aktivierung der Natriumkanäle durch die Membrandepolarisation ist transient.

#### 1 Frühe schnelle Repolarisation

Eine schnelle, teilweise Repolarisation setzt ein, wenn der  $Na^+$ -Strom inaktiviert wird und beruht v.a. auf  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Strömen ( $I_{to1}$  und  $I_{to2}$ ). Es existiert möglicherweise auch ein transienter spannungsabhängiger Auswärtsstrom.

## 2 Plateauphase

Das Plateau resultiert aus einem einwärts gerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $I_{\text{CaL}}$ ). Das Plateau wird unterstützt durch eine spezielle Eigenschaft der Kardiomyozytenmembran, der Einwärtsrichtung (inward-going rectification), d.h. dass die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit auf ein niedriges Level sinkt, wenn die Membran depolarisiert ist. Dadurch besteht eine geringe Tendenz für auswärtsgerichteten  $\text{K}^+$ -Strom, das Ruhemembranpotenzial wiederherzustellen, so dass ein kleiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom ausreicht, um das Plateau aufrechtzuerhalten.

In Ratten- und Mäusekardiomyozyten ist das Plateau kaum ausgeprägt, da die Phase der frühen Repolarisation sehr dominant ist.

## 3 Finale schnelle Repolarisation

Die finale Repolarisation beginnt, wenn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom inaktiviert wird und ein verzögerter auswärts gerichteter  $\text{K}^+$ -Strom ( $I_{\text{Kr}}$ ) und der  $I_{\text{K1}}$ , der für die Erhaltung des Ruhemembranpotenzials verantwortlich ist, aktiviert werden. Das wird verstärkt durch einen  $\text{K}^+$ -Strom, der durch hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen während des Plateaus aktiviert wird, und manchmal durch weitere  $\text{K}^+$ -Ströme, u.a. durch Kanäle, die durch Acetylcholin oder auch Arachidonsäure unter pathologischen Bedingungen wie Herzinfarkt aktiviert werden.

## 4 Ruhemembranpotenzial oder diastolische Depolarisation

Hier herrscht bei Myozyten des Arbeitsmyokards das Ruhemembranpotenzial vor, während bei Zellen des Erregungsleitungssystems eine diastolische Depolarisation auftritt. Diese Depolarisation wird von einer Kombination aus zunehmenden einwärts gerichteten Strömen und reduzierten auswärts gerichteten Strömen während der Diastole verursacht. Sie ist am schnellsten in Zellen des Sinusknotens, der dadurch als primärer Schrittmacher für das ganze Herz fungieren kann.

Erreicht das Membranpotenzial der Schrittmacherzellen einen Schwellenwert, wird ein AP ausgelöst.

(Shih, 1994)

## **2.5 $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Kardiomyozyten**

$\text{Ca}^{2+}$  ist in der Biologie ein wichtiger und weit verbreiteter sekundärer Botenstoff. Es ist in die Regulation zahlloser Funktionen eingebunden, wie z.B. Zelltod, Sekretion, Fertilisierung oder Gentranskription. In Kardiomyozyten übernimmt es auch tragende Rollen im Aktionspotenzial, in der elektromechanischen Kopplung und der Kontraktion.

### **2.5.1 Globale und lokale $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Kardiomyozyten**

Neben Erhöhungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]$ , die global die ganze Zelle betreffen, gibt es auch eine Reihe sehr lokaler Muster in der Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Durch lokal und zeitlich begrenzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalmuster ist es der Zelle möglich, durch den sekundären Botenstoff  $\text{Ca}^{2+}$  eine Fülle von verschiedenen Signalwegen zu bedienen. Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse können in der Summe zu einer globalen Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]$  führen, wie es z.B. bei dem Prozess des Calcium-induced Calcium Release (CICR) im Rahmen der elektromechanischen Kopplung nach einem AP der Fall ist. Abbildung 4 zeigt eine schematische Übersicht über die räumliche Organisation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseignissen aus intrazellulären Speichern. Die unterschiedlichen Typen resultieren aus unterschiedlichen Öffnungswahrscheinlichkeiten von Ryanodinrezeptoren bzw. Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren abhängig vom Level der  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Botenstoffe bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$  selbst.

Ryanodinrezeptoren (RyR) sind in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) in Clustern angeordnet und bilden die elementaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungseinheiten. Bei geringen Stimulationsniveaus oder spontan können einzelne RyR öffnen und  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen; diese Einzelkanal-Ereignisse bezeichnet man als Quarks. Diese fundamentalen Ereignisse können als Bausteine für komplexere  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale betrachtet werden.

Meist sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse jedoch größer und resultieren aus der koordinierten Öffnung eines Clusters von RyR. Sie werden als Sparks bezeichnet. Sparks sind räumlich begrenzt und aktivieren selten benachbarte Cluster, da die  $[\text{Ca}^{2+}]$  bis zum

nächsten Cluster hin abnimmt und dort nicht mehr ausreicht, um das Cluster zu aktivieren.

Sparks können dann eine intrazelluläre  $[Ca^{2+}]$ -Welle auslösen, die sich durch die gesamte Zelle fortsetzt, wenn die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung ausreicht, um die RyR eines benachbarten Clusters zu aktivieren (CICR). Wenn sich das benachbarte Cluster dann öffnet und seinerseits  $Ca^{2+}$  freisetzt, diffundiert dieses zu weiteren benachbarten, empfänglichen Clustern und bewirkt deren Aktivierung (Berridge et al., 2000).

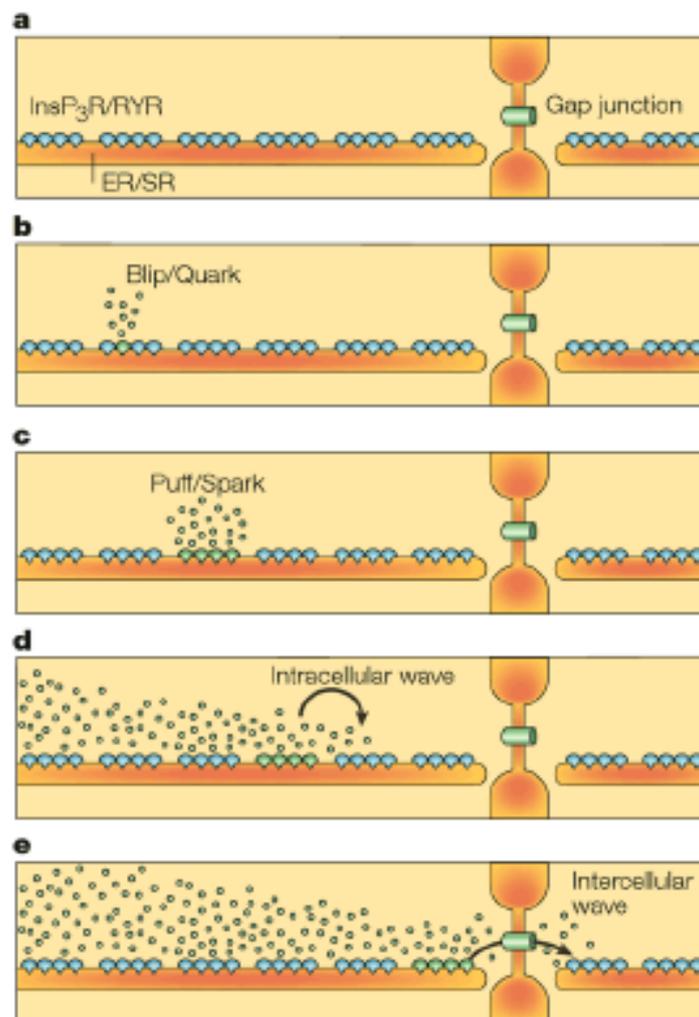


Abbildung 4: Schematische Darstellung der räumlichen Organisation von  $Ca^{2+}$ -Freisetzungseignissen. a in Clustern in die Membran des SR/ER eingebettete Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) und Ryanodinrezeptoren (RyR), b Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus einzelnen sich öffnenden IP<sub>3</sub>R (Blips) oder RyR (Quarks), c  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus einem Cluster von IP<sub>3</sub>R (Puffs) oder RyR (Sparks), d Entstehung einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Welle aus Sparks oder Puffs und e interzelluläre  $Ca^{2+}$ -Welle durch Weiterleitung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Wellen über Gap Junctions in Nachbarzellen. Quelle: Berridge et al., 2000.

## 2.5.2 Elektromechanische Kopplung

Damit ein AP in einer Kardiomyozyte und damit im gesamten Herzen eine Kontraktion auslösen kann, bedarf es einer Umwandlung der elektrischen Erregung in eine mechanische Aktion. Diese Übersetzung erfolgt mithilfe eines Prozesses, der elektromechanische Kopplung (excitation-contraction coupling, ECC) genannt wird und sich des ubiquitären sekundären Botenstoffs  $\text{Ca}^{2+}$  bedient. Der Prozess der elektromechanischen Kopplung ist in Abbildung 5 dargestellt.

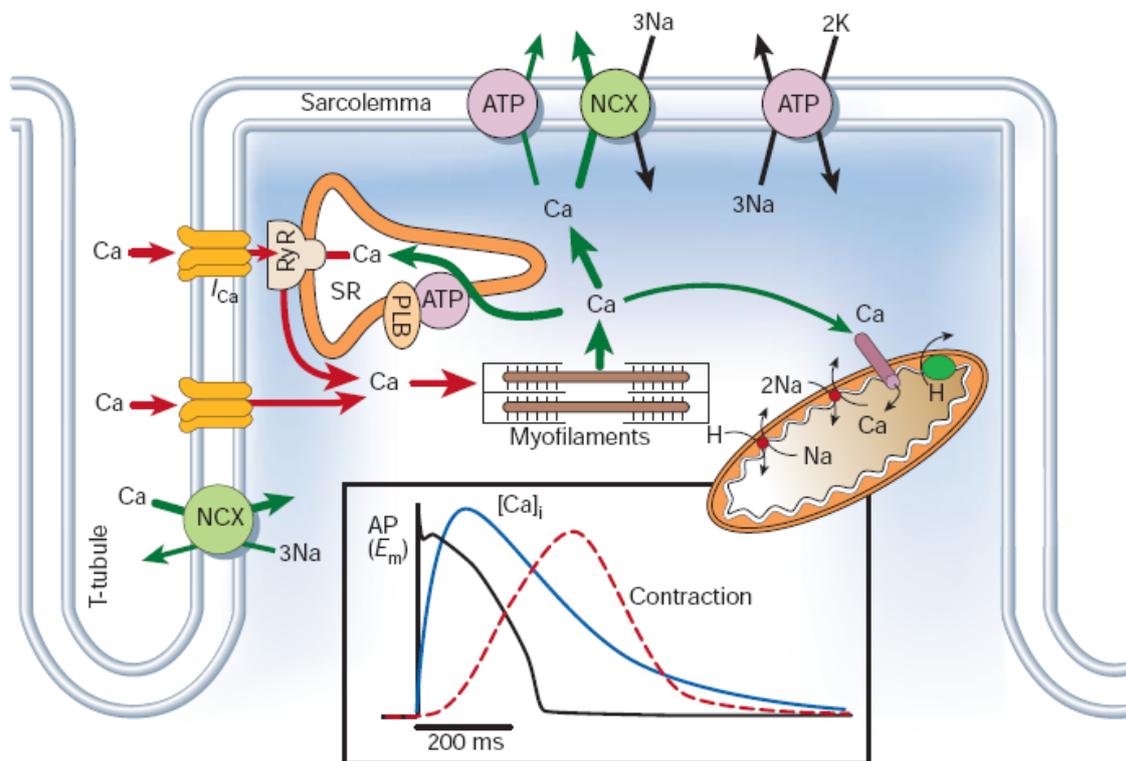


Abbildung 5: Schematische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports während der elektromechanischen Kopplung in Ventrikel-Kardiomyozyten. NCX Natrium-Calcium-Austauscher, ATP ATPase, PLB Phospholamban, SR Sarkoplasmatisches Retikulum. Die eingebettete Grafik zeigt den Zeitverlauf eines Aktionspotenzials, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Kontraktion in einer Ventrikel-Kardiomyozyte (Hase) bei  $37^\circ\text{C}$ . Quelle: Bers, 2002.

Während eines APs strömt  $\text{Ca}^{2+}$  durch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) in der Plasmamembran in die Zelle hinein. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt die Öffnung der RyR in der Membran des SR und  $\text{Ca}^{2+}$  strömt aus dem SR ins Zytosol, wo es die intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  weiter erhöht und das initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal amplifiziert. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran und die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR

erhöhen die freie intrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  und erlauben die Bindung an Troponin C, das die Kontraktionsmaschinerie in Gang setzt. Durch die Inaktivierung der RyR ist die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung begrenzt, so dass eine anschließende Relaxation möglich ist.

Für eine Relaxation der Zelle ist es notwendig, dass die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  wieder auf den Ausgangswert reduziert wird und  $Ca^{2+}$  von Troponin C dissoziiert. Hierzu wird das  $Ca^{2+}$  in die intrazellulären Speicher aufgenommen bzw. wieder über die Plasmamembran nach außen transportiert. Dies geschieht über vier Transportwege: über die SR  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA-Pumpe) in der SR-Membran, den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die  $Ca^{2+}$ -ATPase in der Plasmamembran sowie den mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporter (Bers, 2002).

Die Anteile des  $Ca^{2+}$ , die über Einstrom oder Freisetzung zur Erhöhung der intrazellulären  $[Ca^{2+}]$  beitragen, variieren von Spezies zu Spezies. Bei Maus und Ratte zirkulieren ca. 90-95 % des Aktivator- $Ca^{2+}$  durch das SR und nur ca. 5-8 % werden durch  $I_{Ca}$  und den NCX transportiert. Bei anderen Säugetieren, wie Mensch oder Meerschwein, liegt der Anteil des SR am Aktivator- $Ca^{2+}$  eher bei 70 % und der des Einstroms über die Plasmamembran bei 25-28 % (Bers, 2007).

Die Morphologie von Ventrikelzellen unterstützt in besonderer Weise das ECC. In Ventrikelzellen ist das Sarkolemma schlauchartig eingestülpt und bildet so transversale Tubuli (T-Tubuli), die tief in das Innere der Zelle vordringen. Die Membran der T-Tubuli ist wie das Sarkolemma selbst mit Ionenkanälen durchsetzt und leitet das AP bis tief in die Zelle weiter. Die T-Tubuli befinden sich in direkter Nachbarschaft zur Membran des SR, in der sich die RyR befinden. Dort, wo sich die beiden Membranen nahe kommen, an sogenannten dyadischen Junctions, sind 10-25 L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran und 100-200 RyRs in der SR-Membran in Clustern angeordnet. Diese Cluster sind die lokalen  $Ca^{2+}$ -Signal-Komplexe und werden Couplons genannt (Bers, 2008). Durch die Annäherung der beiden Membranen kann in die Zelle einströmendes  $Ca^{2+}$  durch Diffusion durch den dyadischen Spalt auf kurzem Wege zu den RyR gelangen und sie aktivieren.

### 2.5.3 TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential Channels)

Bei Veränderungen der intrazellulären  $[Ca^{2+}]$  sind die beiden Herkunftsorte des  $Ca^{2+}$  das SR und der Extrazellularraum. Obwohl der größte Teil des über die Zellmembran eintretenden  $Ca^{2+}$  während eines AP und des ECC durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle in die Zelle gelangt, gibt es eine Vielzahl weiterer  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Membran von Kardiomyozyten (vgl. Abbildung 3). Als potenzieller Kandidat in der Regulation des  $Ca^{2+}$ -Haushalts wurde u.a. die Gruppe der TRP-Kanäle identifiziert.

TRP-Kanäle von Säugetieren sind Kationen-permeable Sechs-Transmembran-Kanäle. Sie vermitteln den Transmembranflux von Kationen entlang ihres elektrochemischen Gradienten und erhöhen so die intrazellulären  $Ca^{2+}$ - und  $Na^{+}$ -Konzentrationen und depolarisieren die Zelle.

Die Familie der TRP-Kanäle umfasst 28 bekannte Mitglieder, die anhand ihrer Aminosäuresequenzen in sieben Unterfamilien eingeteilt werden: TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP und TRPV. Mit Ausnahme der TRPN-Kanäle findet man in Säugetieren Mitglieder aller Unterfamilien (Ramsey et al., 2006).

Im Herzen wurden Mitglieder der TRPC-, der TRPV-, TRPM- und TRPP-Familien identifiziert, wobei eine Rolle der TRPC-Kanäle in kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie nachgewiesen werden konnte (Seth et al., 2009; Wantabe et al., 2009; Nishida et al., 2008; Ohba et al., 2007). Konkret konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in Kardiomyozyten als durch  $Ca^{2+}$ -Speicher kontrollierter  $Ca^{2+}$ -Kanal (store operated calcium channel, SOC) fungiert und mit kardialer Hypertrophie assoziiert ist (Seth et al., 2009; Ohba et al., 2007). Für die TRPC4 und TRPC5 konnte ferner gezeigt werden, dass durch die Herabregulation der SERCA-Pumpe eine Hochregulierung bei Herzversagen induziert wurde (Seth et al., 2004). Funktionale TRPC-Kanäle bestehen aus Homo- oder Heterotetrameren aus entweder TRPC1/4/5- oder TRPC3/6/7-Unterfamilienmitgliedern (Wu et al., 2010). Ergebnisse von Wu et al. zeigen auf, dass TRPC1/4/5 in die Regulation von kardialer Hypertrophie-Signaling involviert ist.

Diese Ergebnisse könnten zusammengenommen auf eine Beteiligung von TRPC-Kanälen bei der Entwicklung von Herzkrankheiten und eine wichtige Rolle bei der Regulation des  $Ca^{2+}$ -Haushalts hindeuten, oder die Folge davon sein.

## 2.6 Regulation der Herzaktivität durch das vegetative Nervensystem

Eine Steuerung der Herzaktivität ist über die beiden Teile des vegetativen Nervensystems, den Sympathikus und den Parasympathikus, durch deren Botenstoffe und Rezeptoren möglich (siehe auch Abbildung 6).

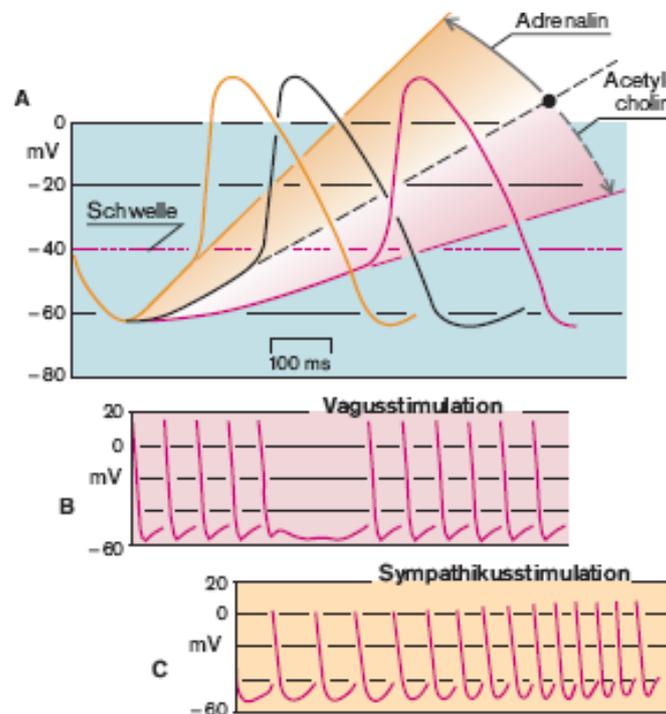


Abbildung 6: Einfluss von sympathischen und parasympathischen Überträgerstoffen auf die Herzfrequenz. A Adrenalin führt zu einer Zunahme, Acetylcholin zu einer Abnahme der diastolischen Depolarisation im Sinusknoten. Dadurch wird die Schwelle im Fall von Acetylcholin später (negativ chronotrop) und im Fall von Adrenalin früher (positiv chronotrop) erreicht. B Stimulation des *Nervus vagus* senkt die Schrittmacherfrequenz, C Sympathikusstimulation erhöht die Schrittmacherfrequenz. Quelle: Klinker et al., 2005.

Das sympathische System bewirkt v.a. eine Steigerung der Herzfrequenz (positiv chronotroper Effekt) und eine Steigerung der Kontraktionskraft (positiv inotroper Effekt). Diese Effekte rühren von einer Aktivierung der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren her.  $\beta_1$ -Effekte von Katecholaminen auf das Herz wirken vermutlich alle über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die ihrerseits Phosphorylierungsstellen an den  $\alpha_1$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle phosphoryliert. Dadurch steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, der Einwärtsstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht

sich, löst vermehrt CICR aus und erhöht die Kontraktionskraft des Herzens. Die Aktivierung von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, vermittelt über  $G_s$ -Proteine, erhöht auch die  $Ca^{2+}$ -Sensibilität des kontraktiven Apparates, vermutlich durch die Phosphorylierung von Troponin C, und steigert die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme durch das SR, indem sie zur Phosphorylierung von Phospholamban führt und in einer Disinhibition der SERCA-Pumpe resultiert, und dadurch die Menge an  $Ca^{2+}$  erhöht, die zur Freisetzung durch Aktionspotenziale zur Verfügung steht. Der Anstieg der Herzfrequenz wird durch einen schnelleren Anstieg des Schrittmacherpotenzials durch eine Verschiebung in der Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeiten bewirkt, die dem Schrittmacherpotenzial zugrunde liegen, so dass die Schrittmacherzellen den Schwellenwert für ein AP früher erreichen (siehe Abbildung 6).

Effekte des sympathischen Systems können durch Gabe von  $\beta_1$ -Agonisten ausgelöst und beobachtet werden. Isoproterenol, ein Sympathomimetikum, das ein synthetisches Noradrenalin-Derivat darstellt, aktiviert ausschließlich  $\beta$ -Rezeptoren und kann genutzt werden, um bei Experimenten eine Aktivierung durch das sympathische System zu simulieren.

Die Auswirkungen des parasympathischen Systems sind im Wesentlichen gegenteilig zu denen des sympathischen Systems. Die Effekte sind v.a. eine Verringerung der Herzfrequenz (negativ chronotroper Effekt) und eine Verringerung der Erregungsleitung im AV-Knoten (negativ dromotroper Effekt). Sie resultieren aus einer Aktivierung der muskarinischen ( $M_2$ ) Azetylcholinrezeptoren, die in einer Vielzahl in Erregungsleitungs- und Vorhofgewebe vorkommen, nur spärlich aber in Ventrikelgewebe. Diese Rezeptoren sind über  $G_i$ -Proteine negativ an die Adenylatzyklase gekoppelt und reduzieren so im Gegensatz zu  $\beta_1$ -Adrenozeptoren die Bildung von cAMP, was eine Inhibierung des langsamen  $Ca^{2+}$ -Stroms zur Folge hat.  $M_2$ -Rezeptoren öffnen auch Kaliumkanäle ( $K_{ACh}$ ), so dass durch die erhöhte  $K^+$ -Permeabilität ein hyperpolarisierender Strom ausgelöst wird, der dem einwärtsgerichteten Schrittmacherstrom entgegenwirkt und so die Herzfrequenz reduziert, wie es ebenfalls in Abbildung 6 dargestellt ist (Rang et al., 2003).

## **2.7 Herzarrhythmien**

Herzarrhythmien können durch fehlerhafte Schrittmacherfrequenzen des Erregungsbildungssystems ausgelöst werden, aber auch durch ektope Erregungen, die sich über das gesamte Herz ausbreiten.

Je nach Entstehungsort der Arrhythmien werden v.a. Vorhof-Arrhythmien und ventrikuläre Arrhythmien unterschieden. Liegt der Ursprung der Arrhythmien in den Vorhöfen, spricht man von Vorhof-Arrhythmien; sind die Ventrikel Ort der Entstehung, handelt es sich um ventrikuläre Arrhythmien.

Schwere ventrikuläre Arrhythmien können bereits Minuten nach deren Einsetzen tödlich verlaufen, wenn kardialer Arrest und plötzlicher Herztod eintritt. Aber auch weniger schwere ventrikuläre Arrhythmien können, wenn sie länger andauern, Folgeschäden verursachen. Sie können zu Veränderungen des Genexpressionsmusters führen, was wiederum einen Prozess initiiert, der als Remodelling bezeichnet wird, und Hypertrophie sowie Herzinsuffizienz verursacht.

Vorhoffarrhythmien sind meist nicht direkt lebensbedrohlich, so dass Patienten mit diesen Arrhythmien viele Jahre leben können, bevor diese symptomatisch werden und diagnostiziert werden.

Man kann entsprechend der Veränderung des Rhythmus folgende Arten der Vorhoffarrhythmien unterscheiden:

**Extrasystolen:** Es handelt sich um Herzschläge, die außerhalb des normalen Rhythmus auftreten.

**Vorhofftachykardie:** Tachykardie bedeutet, dass die Vorhöfe mit einer Frequenz von 100-200 Schlägen pro Minute schlagen.

**Vorhofflattern:** Diese Arrhythmie liegt vor, wenn die Frequenz der Vorhöfe auf ca. 250-350 Schläge pro Minute erhöht ist.

**Vorhofflimmern:** Bei Frequenzen von 350-800 Schlägen pro Minute spricht man von Vorhofflimmern.

Die Prävalenz von Vorhofflimmern steigt mit dem Alter an und liegt zwischen 0,7 % bei Menschen zwischen 55-60 Jahren und 17,8 % in der Altersgruppe von 85 Jahren und älter (Heeringa et al., 2006). Außerdem tritt transientes bzw. limitierbares

Vorhofflimmern bei Patienten nach einer Herzoperation innerhalb eines Zeitraums von fünf Tagen mit einer Häufigkeit zwischen 10-65% auf (Ho et al., 2010). Obwohl nicht direkt lebensbedrohlich, reduziert Vorhofflimmern aufgrund der langwierigen, häufig nicht sehr erfolgreichen Behandlung die Lebensqualität der Patienten. Kurze Perioden von Vorhofflimmern können Herzklopfen, Unwohlsein im Brustbereich und Benommenheit auslösen. Anhaltendes Vorhofflimmern kann schweres kongestives Herzversagen (CHF) verursachen und bei unregulierten und ausgeprägten schnellen ventrikulären Arrhythmien manchmal zu lebensbedrohenden Dekompensationen von ansonsten kompensierten Herzerkrankungen führen. Der Verlust von atrialer Kontraktion bei Vorhofflimmern führt auch zu Störungen im Blutfluss in den Atrien, was zur Entstehung von Thromben führen kann, so dass auch das Risiko für einen Schlaganfall um ein Vielfaches erhöht ist (Nattel, 2002; Wolf et al., 1991). Vorhofflimmern ist daher eine große Belastung für den einzelnen Betroffenen, aber auch für unser Gesundheitssystem, da es mit einer hohen Morbidität und langen Hospitalisierungen sowie chronischen Medikamentengaben verknüpft ist.

Die Behandlungsmethoden für Vorhofflimmern, sind noch nicht zufriedenstellend und/oder beugen meist nur Folgeeffekten wie Schlaganfällen vor. Aufgrund der bislang unbefriedigenden Behandlungssituation ist es wichtig, die zellulären Grundlagen der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern abzubilden und zu verstehen. Dies könnte eine Basis und neue Perspektiven für innovative, wirkungsvollere Behandlungsmethoden aufzeigen. Traditionell wurde Vorhofflimmern durch antiarrhythmische Medikamente behandelt, die den Rhythmus kontrollieren, indem sie kardiale elektrische Eigenschaften verändern. Die verfügbaren Medikamente waren nicht spezifisch für atriale elektrische Aktivität und können durch ihre Wirkung auf die Ventrikel zu lebensbedrohlichen Rhythmusstörungen führen. Dadurch hat sich die Behandlung in den letzten 20 Jahren zu nicht-pharmakologischen Therapien verschoben, wie Vernarbung von Arrhythmieverursachenden Geweben durch Laserablation bzw. thermische Verödung mit Drähten oder Implantation von Geräten, die Arrhythmien wahrnehmen und durch kontrollierte elektrische Entladungen beenden. Beide Behandlungsrichtungen sind jedoch nicht sehr sicher und effektiv (Nattel, 2002).

Wird erstmals Vorhofflimmern ausgelöst, wird es häufig durch verschiedene Einflussfaktoren aufrechterhalten, wie z.B. eine verkürzte Refraktärzeit, eine verringerte Leitungsgeschwindigkeit und eine Zunahme der Vorhofmasse (Neuberger et al., 2005; Allesie et al., 2002). Zwei Prozesse spielen hier eine Rolle: das elektrische und strukturelle Remodeling der Vorhöfe. Beim elektrischen Remodeling kommt es zu einer Verkürzung der Aktionspotenzialdauer und damit zu einer Verkürzung der Refraktärzeit, insbesondere durch eine verminderte Stromdichte des L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) (Dobrev et al., 2005; Dobrev et al., 2003) und durch eine erhöhte Amplitude einwärts gerichteter  $\text{K}^+$ -Ströme ( $I_{\text{K1}}$ ) (Nattel, 2002). Vermutlich wird das elektrische Remodeling u.a. durch  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Regulation der Kanaleigenschaften und der Genexpression von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen hervorgerufen (Dobrev et al., 2003; Nattel, 2002). Beim strukturellen Remodeling kommt es zu myokardialer Hypertrophie und Fibrose, einer Vermehrung des Bindegewebsanteils, die für die verringerte Erregungsleitungsgeschwindigkeit und die Zunahme der Vorhofmasse verantwortlich sind (Schotten et al., 2003; Nattel, 2002).

## **2.8 G-Protein-gekoppelte Signalwege**

Eine wachsende Zahl von Studien zeigt eine Beteiligung von bestimmten Hormonen wie Endothelin-1 oder Angiotensin II bei Herzpathologien wie z.B. Hypertrophie und Arrhythmien auf. Diese Hormone wirken über Signalwege, die die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beinhalten.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind eine der größten und vielseitigsten Familien der Membranrezeptoren. Es handelt sich um integrale Membranproteine, die sich durch eine heptahelikale Struktur auszeichnen und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, indem sie auf eine Aktivierung hin durch Konformationsänderung die Aktivierung von G-Proteinen auslösen (Rasmussen et al., 2007).

Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind, kommunizieren Signale von einer großen Zahl an Hormonen, Neurotransmittern, Chemokinen sowie auto- und parakrinen Faktoren.

G-Proteine sind heterotrimere Guanin-bindende Proteine, die aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit bestehen. Guanin-Nukleotide binden an die  $\alpha$ -Untereinheit,

die eine enzymatische Aktivität besitzt und die Hydrolyse von Guanosin triphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) durchführen kann. Die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheiten bilden zusammen den  $\beta\gamma$ -Komplex. Die Untereinheiten sind über eine Fettsäurekette in der Plasmamembran verankert und können in der Ebene der Plasmamembran frei diffundieren. Im Ausgangszustand liegt das G-Protein als Trimer vor und hat an der  $\alpha$ -Untereinheit ein GDP gebunden. Bei Aktivierung eines GPCR erfährt dieser eine Konformationsänderung und kann durch eine Erhöhung der Affinität für das G-Protein-Trimer einen solchen Komplex binden. Bei Bindung des G-Proteins wird das GDP durch GTP ausgetauscht, was eine Dissoziation des Trimers auslöst und die  $\alpha$ -Untereinheit mit dem gebundenen GTP sowie die  $\beta\gamma$ -Untereinheit freisetzt. Diese beiden Untereinheiten stellen die aktiven Formen des G-Proteins dar und können frei in der Membran diffundieren und verschiedene Enzyme oder Ionenkanäle aktivieren oder deaktivieren. Die enzymatische Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit fungiert als Zeitschalter, dessen Aktivität durch Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit an ein Effektormolekül verstärkt wird und der eine Hydrolyse des GTP zu GDP durchführt. Dadurch kommt es zu einer Reassoziierung der  $\alpha$ -Untereinheit mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex und die Aktivität des G-Proteins ist beendet. Das G-Protein ist damit in seinen ursprünglichen Zustand zurückgekehrt und steht für eine erneute Aktivierung zur Verfügung (Rang et al., 2003).

Basierend auf der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit werden G-Proteine in vier Unterfamilien eingeteilt:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  (oder  $G_{q/11}$ ) und  $G_{12/13}$ . Während für die meisten G-Proteine der Unterfamilien  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  die Funktion bekannt ist, ist über die Interaktionspartner und die physiologische Rolle der Mitglieder der  $G_{12/13}$  Unterfamilie relativ wenig bekannt (Neves et al., 2002; Harhammer et al., 1996).

G-Proteine der  $G_i$ -Protein-Familie (i für inhibitorisch) wirken inhibitorisch auf die Adenylatzyklase, so dass eine Bildung von cAMP gehemmt wird, oder aktivierend auf die Phosphodiesterase 6, was zu einem Abbau von cGMP führt. Ein Agonist von  $G_i$ -Proteinen ist z.B. Acetylcholin. Die Auswirkung auf die kardiale Funktion zeigt sich z.B. in einem negativ inotropen und chronotropen Effekt.

Mitglieder der  $G_s$ -Protein-Familie (s für stimulatorisch) aktivieren die Adenylatzyklase und führen so zu einer Bildung von cAMP. Das Hormon Adrenalin ist ein Beispiel für einen Aktivator von  $G_s$ -Proteinen. Die Aktivierung von  $G_s$ -Proteinen kann z.B. zu

positiver Inotropie und Chronotropie führen, aber auch zu Arrhythmien oder Hypertrophie.

Die  $G_q$ -Protein-Familie ist für eine Aktivierung der Phospholipase C verantwortlich, die aus dem Membran-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) die beiden sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) bildet. Vermutete Effekte einer Aktivierung von  $G_q$ -Proteinen sind Arrhythmien und Hypertrophie. Beispielhaft als Aktivator ist hier das Endothelin-1 zu nennen.

$G_{12/13}$ -Proteine wirken vermutlich aktivierend auf z.B. Phospholipase D oder PKC bzw. Rho-Proteine und Rho-Kinasen.

## **2.9 Endothelin-1 und Inositol-1,4,5-Trisphosphat**

Endotheline sind parakrin oder autokrin wirkende Peptidhormone, die von einer Vielzahl von Zelltypen, v. a. von Endothelzellen, gebildet werden und sich als Vasokonstriktoren auszeichnen. Endothelin-1 (ET-1), das hauptsächlich von vaskulärem Endothelium gebildet wird und einer der stärksten bekannten Vasokonstriktoren ist, spielt bei der Regulation des Blutdrucks eine wichtige Rolle. Für ET-1, das auch von Endothelzellen im Herzen und von den Kardiomyozyten selbst gebildet wird, konnten verschiedene Auswirkungen auf das Herz bzw. einzelne Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Dazu zählen neben Vasokonstriktion der Herzkranzgefäße, inotrope und chronotrope Effekte, Induktion von Hypertrophie sowie arrhythmogene Effekte. Die molekularen Mechanismen für die letztgenannten Auswirkungen sind noch nicht hinreichend geklärt. Bei Patienten mit Herzerkrankungen konnten erhöhte ET-1-Konzentrationen in der Perikardialflüssigkeit und im Blutplasma nachgewiesen werden (siehe z.B. Pousset et al., 1997; McMurray et al., 1992). Inwieweit diese erhöhten endogenen Konzentrationen von ET-1 der Auslöser für diese Erkrankungen sein können, ist noch ausreichend untersucht. Bei Gabe von exogenem ET-1 ist dies anscheinend der Fall, da die Gabe von ET-1 in den perikardialen Raum bei Hunden zur Bildung von ventrikulären Arrhythmien führte.

Für ET-1 sind bislang zwei Rezeptor-Isoformen bekannt:  $ET_A$  und  $ET_B$ . Der im Herzen vorherrschende Rezeptor ist der  $ET_A$ -Rezeptor, wobei das Verhältnis zwischen beiden Rezeptoren innerhalb des Herzens variiert. Beide Rezeptortypen

sind an G-Proteine gekoppelt, die zur Gruppe der  $G_q$ - bzw.  $G_i$ -Proteine gehören. Die Aktivierung dieser G-Proteine führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C, wodurch aus  $PIP_2$  die beiden Produkte  $IP_3$  und DAG gebildet werden. DAG aktiviert verschiedene Mitglieder der Protein Kinase C-Familie, die ihrerseits mit einer Vielzahl von Effektoren interagieren, wie z.B. mit dem  $Na^+/H^+$ -Austausch oder der NADPH-Oxidase. Während das DAG an der Plasmamembran verbleibt, diffundiert das wasserlösliche  $IP_3$  frei im Zytosol und kann an intrazelluläre  $IP_3R$  binden.

(Bootman et al., 2007; Cingolani et al., 2006; Aiello et al., 2005; Szokodi et al., 1997). Eine Bindung von  $IP_3$  an Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren ( $IP_3R$ ) der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher führt dann zu einer Freisetzung von  $Ca^{2+}$  ins Zytosol. Eine schematische Übersicht über die Vorgänge der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch die Aktivierung des  $G_q$ -gekoppelten Signalwegs durch ET-1 im Vergleich zur elektromechanischen Kopplung ist in Abbildung 7 dargestellt.

Studien an Inositol-1,4,5-Trisphosphat( $IP_3$ )-Signaling im Herzen ergaben, dass es in Kardiomyozyten funktionale  $IP_3R$  gibt, die  $Ca^{2+}$  aus dem SR freisetzen. Diese Rezeptoren sind jedoch im Vergleich zu RyR weit weniger repräsentiert und zwar um Faktoren zwischen 1:20 und 1:100, so dass ihr Beitrag zu einem  $Ca^{2+}$ -Signal bei einem großen Hintergrund des Calcium-induzierten Calcium-Release sehr schwierig zu detektieren ist. Da  $IP_3R$  jedoch durch eine Kombination von  $IP_3$  und  $Ca^{2+}$  aktiviert werden und ihre Sensitivität für  $Ca^{2+}$  durch  $IP_3$  erhöht wird, ist es neben einer unterstützenden Wirkung beim ECC möglich, dass sie bei geeigneten intrazellulären  $IP_3$ -Leveln, z.B. nach Stimulation der Kardiomyozyte durch  $G_q$ -Protein-gekoppelte Agonisten, auch bei normalen diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen oder während der Erholungsphase nach einer  $Ca^{2+}$ -Transiente aktiviert werden. Dieses Öffnen von  $IP_3R$  während der ansonsten – in Bezug auf die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  – ruhigen diastolischen Periode kann unter diesen Bedingungen die Ursache für arrhythmische  $Ca^{2+}$ -Transienten und der assoziierten elektrischen Aktivität sein (Kockskämper et al., 2008). Aus einigen Studien heraus gibt es Hinweise, dass die akute Zugabe von ET-1 zu Kardiomyozyten bei verschiedenen Spezies zu einer Erhöhung der Amplitude von elektrisch induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten führt, so dass der  $IP_3$ -induzierte  $Ca^{2+}$  Release auch vor dem großen CICR nicht untergeht, sondern diesen unterstützt. (Bootman et al., 2007; Li et al., 2005).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die IP<sub>3</sub>R in Vorhofszellen im subsarkolemmalen Raum angesiedelt sind und dort mit peripheren, junktionalen RyR kolokalisiert sind (Mackenzie et al., 2001; Lipp et al., 2000). Diese spezifische Lokalisation der IP<sub>3</sub>R in Vorhofszellen führte zu Vermutungen, dass IP<sub>3</sub>R zur Regulation des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> beitragen und ein gewisser Cross Talk zwischen IP<sub>3</sub>R und RyR existieren, was durch Studien unterstützt werden konnte (Liang et al., 2009). Es ist daher denkbar, dass Ca<sup>2+</sup>, das aus IP<sub>3</sub>R freigesetzt wird, zur Aktivierung von RyR führt oder beiträgt.

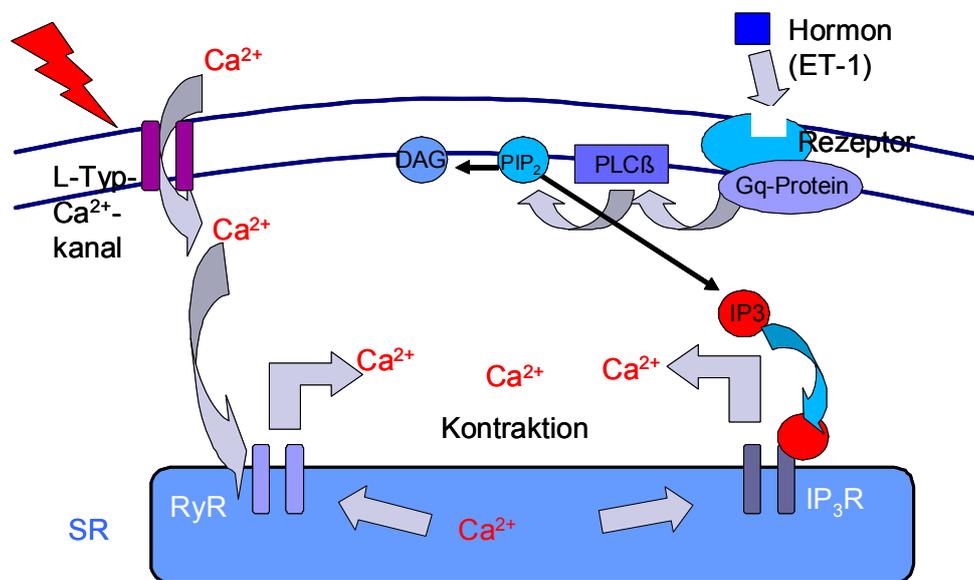


Abbildung 7: Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung (links) und des G<sub>q</sub>-gekoppelten Ca<sup>2+</sup>-Signalling (rechts) in Kardiomyozyten.

## 2.10 Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der starken Beeinträchtigung von Patienten, aber auch der finanziellen Belastungen des Gesundheitssystems durch Vorhoffarrhythmien wie Vorhofflimmern, ist es wichtig, die zellulären und molekularen Ursachen ihrer Entstehung und Aufrechterhaltung zu kennen. Auch für andere Herzpathologien spielen molekulare und zelluläre Veränderungen eine Rolle, die zwischen Vorhof- und Ventrikelzellen sehr unterschiedlich sein können. Durch die Untersuchung dieser Unterschiede eröffnen sich Ansatzpunkte und Möglichkeiten, effektive und effiziente Methoden zur Vorbeugung und/oder zur Behandlung zu entwickeln. Aussagen zu möglichen zellulären und molekularen Ursachen der Vorhoffarrhythmien im Vergleich zu den

Ursachen von ventrikulären Arrhythmien können durch Untersuchung der Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Kardiomyozyten aus Vorhöfen und Ventrikeln gewonnen werden sowie durch funktionelle Untersuchungen der jeweils beteiligten Transportproteine und Signalwege. Aufgrund der vermuteten Beteiligung herzaktiver Hormone mit unterschiedlichen Auswirkungen auf Vorhof- und Ventrikelzellen ist es wichtig, diese in die Betrachtungen mit einzubeziehen.

Die Zielsetzung meiner Arbeit bestand darin, mögliche Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zwischen Vorhof- und Ventrikelzellen von Mäusen verschiedener Genotypen (wt,  $\text{TRPC1}^{-/-}\text{C4}^{-/-}$ ) herauszuarbeiten, die die Grundlage und somit eine Erklärung für das unterschiedliche Auftreten von Vorhof- und Ventrikelarrhythmien sein könnten. Ebenfalls wollte ich die Auswirkungen von Endothelin-1 auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase untersuchen, um auch hier mögliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Herkunftsort der Zellen herauszustellen.

Um dies zu realisieren, habe ich meine Arbeit aus zwei Teilen aufgebaut:

Der erste Teil meiner Arbeit ist ein methodischer Teil, der dazu diente, geeignete Versuchsbedingungen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente an Mauskardiomyozyten zu entwickeln. Zunächst habe ich eine Versuchsreihe durchgeführt, deren Ziel darin bestand, in fluoreszenzspektrometrischen *in vitro*-Experimenten zu analysieren, welcher der drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, Fura-2, Fura Red und Indo-1, geeignet ist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente unter der Verwendung von Koffein zur Untersuchung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes und der an der Herstellung der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen beteiligten Transportmechanismen (SERCA-Pumpe und NCX) durchzuführen. Darüber hinaus enthält meine Arbeit Untersuchungen an Mauskardiomyozyten, die aufklären sollten, inwieweit der genetisch codierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor GCaMP2 zur Durchführung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimenten an Mauskardiomyozyten verwendet werden kann, um die Vorteile eines nicht-invasiven, endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors zu nutzen. Dabei habe ich die Repräsentation der Zellpopulation sowie kinetische Eigenschaften des genetisch kodierten Sensors im Vergleich zum niedermolekularen Sensor Fura-2 betrachtet.

Der zweite Teil meiner Arbeit besteht aus Versuchsreihen an Mauskardiomyozyten aus Vorhof und Ventrikel, um die grundsätzliche Charakterisierung von Muskelzellen

aus den beiden Vorhöfen und dem Ventrikel durchzuführen. Dies erfolgte hinsichtlich möglicher Unterschiede als Grundlage für Erklärungen des unterschiedlichen Auftretens von Herzpathologien, wie z.B. Arrhythmien. Hierzu habe ich an Vorhof- und Ventrikelzellen von wt-Mäusen verschiedene Eigenschaften der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht: Diastolisches  $\text{Ca}^{2+}$ , Post Rest Verhalten, Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, Frequenzabhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung und Aktivität der SERCA-Pumpe sowie des NCX.

Außerdem habe ich analysiert, wie die Kombination von TRPC1 und TRPC4, die als Kandidaten für eine Rolle in der Regulierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes gelten, bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von Ventrikelzellen beteiligt sein könnten, indem ich die Auswirkungen von chronisch und akut appliziertem Isoproterenol auf wt- und TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup> analysiert habe. Meine Arbeit sollte dadurch weitere Anhaltspunkte für die Beteiligung dieser Kanäle an der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes liefern.

Um ein genaueres Verständnis im Hinblick auf die zellulären und molekularen Veränderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Zusammenhang mit dem herzaktiven Hormon ET-1 zu erhalten und somit Anhaltspunkte für die Entstehung oder Aufrechterhaltung von Herzpathologien, wie Arrhythmien, aufzuzeigen, habe ich die Auswirkungen von chronischer und akuter Gabe von exogenem ET-1 auf die Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an Ventrikelzellen untersucht. Hierzu habe ich auch die Implantation von osmotischen Minipumpen in der Arbeitsgruppe etabliert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mäuse

#### 3.1.1 Wildtypmäuse

Bei Experimenten ohne Beteiligung von genetisch modifizierten Mäusen wurden wt-Mäuse des Stammes C57BL6 (männlich, 5-10 Wochen, ca. 19-25 g Körpergewicht, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Bei Experimenten mit genetisch veränderten Tieren sind die wt-Tiere dort erwähnt.

#### 3.1.2 TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse

Es handelte sich um Tiere mit einem totalen Knock-out für die Gene der TRPC1- und TRPC4-Kanäle. Die TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie die entsprechenden wt-Tiere als Kontrollgruppe wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marc Freichel, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Ferner wurden uns auch TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>- und wt-Tiere zur Verfügung gestellt, die eine osmotische Minipumpe eingesetzt hatten. Es handelte sich hier um Pumpen, die Isoproterenol mit einer Freisetzungsrate von 30mg/kg<sub>Körpergewicht</sub>/Tag enthielten, und als Kontrollen um Pumpen mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung. Die Pumpen wurden 7 Tage vor Verwendung der Tiere zur Zellisolation eingesetzt, um eine 7-tägige chronische Gabe vorzunehmen.

#### 3.1.3 GCaMP2-Mäuse

Die GCaMP2-Mäuse, die ich in dieser Arbeit genutzt habe, stammen von Elterntieren ab, die uns freundlicherweise von Michael I. Kotlikoff, Cornell University, USA, zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich um Tiere, die herzspezifisch den genetisch codierten Ca<sup>2+</sup>-Sensor GCaMP2 exprimieren.

GCaMP2 ist ein zirkulär permutiertes EGFP-basiertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor-Molekül, das mit Calmodulin (CaM) am C-Terminus und einem Fragment der Myosin-leichte-Ketten-Kinase am N-Terminus fusioniert ist. Durch Verwendung des  $\alpha$ MHC-Promotors wird das Fusionsprotein herzspezifisch exprimiert. Um eine konditionale Expression zu ermöglichen, enthält das GCaMP2-Konstrukt tet operator Sequenzen (tetO) zwischen dem Promotor und der GCaMP2-Sequenz, so dass bei gleichzeitiger Hemizygotie für ein  $\alpha$ MHC-tetracyclin-Transaktivatorallel (tTA) die Expression des GCaMP2-Proteins unterdrückt werden kann (Tallini et al., 2006).

Für die Experimente wurden nur Tiere verwendet, die durch DNA-Tests nachweislich für das GCaMP2-Fusionsprotein homozygot und gleichzeitig für tTA hemizygot waren. Die Mäuse erhielten bis 4 Wochen vor Verwendung für die Experimente Doxzyklin im Trinkwasser (1 mg/ml Doxzyklin in 2 % Saccharose-Lösung), um die GCaMP2-Expression zu unterdrücken. 4 Wochen vor den Experimenten wurde das Doxycyclin abgesetzt und die Mäuse erhielten reines Trinkwasser, so dass eine möglichst hohe Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors zum Versuchsbeginn gewährleistet war. Als Kontrollen wurden C57BL6-Tiere von Charles River verwendet.

### **3.2 Isolation von Kardiomyozyten aus adulten Mäusen**

Zur Gewinnung von adulten Maus-Kardiomyozyten wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin (Ursotamin, Serumwerk, Deutschland, 85 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer AG, Deutschland, 15 mg/kg Körpergewicht) in 0,9%iger NaCl-Lösung (Isotone NaCl-Lösung, 0,9%, B. BRAUN Melsungen, Melsungen, Deutschland) narkotisiert. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurde den Tieren je nach Größe 100-150  $\mu\text{l}$  40 mM Natriumcitrat (gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung) intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet.

Die Zusammensetzungen der im Folgenden verwendeten Lösungen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Im Anschluss an die Tötung wurde der Brustraum eröffnet. Das Herz durch Injektion von jeweils ca. 0,5 ml eiskalter nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung in beide Ventrikel gespült und dann entnommen. Das Herz wurde über die *Aorta ascendens* zur retrograden Perfusion an einen modifizierten Langendorff-Apparat angeschlossen. Es erfolgte

zunächst eine Perfusion mit sauerstoffgesättigter  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mit 200  $\mu\text{M}$  EGTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Daran anschließend wurde die Perfusion auf eine 37°C warme nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung umgestellt, die 0,14 mg/ml Liberase Blendzyme 4 (Roche Diagnostics, Deutschland) enthielt, mit der das Gewebe für 12 min verdaut wurde. Nach der Abnahme des Organs von dem modifizierten Langendorff-Apparat wurde das Herz in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung in die beiden Herzohren, einen beide Ventrikel enthaltenden Ventrikelteil sowie ein zu verwerfendes Reststück zerlegt.

Die Ventrikel wurden zur Vergrößerung der Oberfläche auf- und je nach Größe 3- bis 4-mal eingeschnitten. Der Überstand wurde verworfen und das Ventrikelgewebe vorsichtig in die Kavitäten einer 12-Well-Mikrotiterplatte bewegt, die je 1 ml nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung mit 1,5  $\mu\text{g/ml}$  DNase (DNase I, Typ II, Bovine Pancreas, D4527-40KU, Sigma-Aldrich, Deutschland, 1,5  $\mu\text{g/ml}$  entspricht 4,005 U/m) und ein mit extrazellulärer Matrix (ECM Harbor Extracellular Matrix, Engelbreth-Holm-Swarm tumors, Harbor Bio-Products, tebu-bio, Frankreich, 1:20-Verdünnung aus Stocklösung 22,2 mg/ml) beschichtetes Deckglas enthielten. Nachdem sich die aus dem Gewebe gelösten Zellen auf dem Deckglas abgesetzt hatten, wurde der Überstand vorsichtig entfernt und durch 1,5 ml frische nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung mit DNase ersetzt. Im Anschluss daran wurde eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durchgeführt, indem in Abständen von 5 Minuten 11-mal 150  $\mu\text{l}$  Hoch- $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung zugegeben wurden, ohne die Zellen aufzuwirbeln. Nach einer Ruhephase von 30 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und durch 1 ml Medium M199 ersetzt.

Die Herzohren wurden nach dem Abtrennen vom Ventrikel in zwei kleinen Petrischalen mit jeweils 3 ml der Liberase-Lösung für mindestens weitere 20 Minuten zur Nachverdauung im Inkubator bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre platziert. Nach den 20 Minuten wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert, ob sich aus dem Gewebe lebensfähige Vorhofzellen lösen; sobald dies der Fall war, wurde die Verdauung gestoppt, indem die Gewebestücke in eine kleine Petrischale mit 0,5 ml nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mit DNase (s.o.) überführt wurden. Das Gewebe wurde vorsichtig bewegt, um die Zellen zu vereinzeln. Zur Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde in Abständen von 5 min 11-mal 50  $\mu\text{l}$  Hoch- $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung zugegeben. Die Zellsuspension wurden anschließend in 6 Vertiefungen einer 12-Well-Platte pipettiert, die beschichtete Deckgläser enthielten, und ruhten anschließend bei RT 60 min zur

Adhäsion auf den Deckgläsern. Danach wurde der Überstand abgenommen und durch 1 ml Medium M199 ersetzt.

Die Kardiomyozyten wurden bis zur Verwendung in Experimenten am selben Tag im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aufbewahrt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen, die zur Isolation der Kardiomyozyten und als Grundlage der Perfusionslösungen während der Video-Imaging-Experimente verwendet wurden, basierend auf destilliertem H<sub>2</sub>O.

	Ca <sup>2+</sup> -freie Lösung	Hoch-Ca <sup>2+</sup> -Lösung	Tyrode-Lösung
Substanz	Konzentration [mM]		
NaCl	134	134	135
CaCl <sub>2</sub>	-	0,2	1,5
Glukose	11	11	10
KCl	4	4	5,4
MgSO <sub>4</sub>	1,2	1,2	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	1,2	-
HEPES	10	10	10
MgCl <sub>2</sub>	-	-	1
pH	7,35	7,35	7,35

### **3.3 Implantation von osmotischen Minipumpen zur chronischen Gabe von Hormonen**

Bei der Implantation von osmotischen Minipumpen wurden Mäuse im Alter von 5 bis 8 Wochen (bzw. ca. 19 bis 23 g Körpergewicht) verwendet.

Am Vortag der Implantation wurden die osmotischen Minipumpen (ALZET Osmotic Pump 2002, DURECT Corporation, Cupertino, CA; bezogen über Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) gemäß Anleitung mit 0,9%iger NaCl-Lösung (Isotone NaCl-Lösung, 0,9%, B. BRAUN Melsungen, Melsungen, Deutschland) bei Kontrollmäusen oder mit ET-1-Lösung (ET-1 aus 400 µM Stocklösung, verdünnt zu benötigter Konzentration (s.u.) in 0,9% NaCl-Lösung) befüllt und für 24 h zum Priming bei 37°C aufbewahrt, um eine sofortige korrekte Freigabe der Füll-Lösung nach der Implantation zu gewährleisten.

Die Konzentration der ET-1-Lösung wurde anhand der Herstellerangaben über Pump-Rate und das Füllvolumen der verwendeten Pumpen-Charge so berechnet, dass die Tiere subkutan eine ET-1-Gabe von 250 ng/kg<sub>Körpergewicht</sub>/min erhielten.

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (Ursotamin, Serumwerk, Deutschland, 85 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer AG, Deutschland, 15 mg/kg Körpergewicht) in 0,9%iger NaCl-Lösung narkotisiert. Als Indikator für eine ausreichende Narkosetiefe diente der „toe pinch reflex“, bei dem die Maus mit einer Pinzette in die Zehen der Hinterbeine gekniffen wird. Zieht das Tier das Bein nicht zurück oder schüttelt es, gilt eine ausreichende Narkosetiefe als erreicht. Bei Reaktion auf den Zehen-Kniff wurde noch einige Minuten gewartet und bei weiterer Reaktion bis zu 10-20% der Initialdosis des Narkotikums nachverabreicht, bis keine Reaktion mehr auf einen Zehen-Kniff zu beobachten war. Um ein Austrocknen der Augen aufgrund des fehlenden Lidschlusses während der Narkose zu verhindern, wurde ein Tropfen Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer, Deutschland) auf die Augen aufgebracht. Zur Vermeidung von postoperativen Schmerzen erhielten die Tiere eine Carprofen-Injektion (Rimadyl, Pfizer, Deutschland, 5 mg/kg Körpergewicht, verdünnt in 0,9%iger NaCl-Lösung). Anschließend wurde der Nackenbereich der Tiere enthaart und die Haut präoperativ desinfiziert (Braunoderm, B. Braun Melsungen AG). Im Nacken der Tiere wurde ein 1 cm breiter Einschnitt vorgenommen und die Haut auf einer Seite der Wirbelsäule durch das Spreizen einer stumpfen Schere vom darunterliegenden Gewebe getrennt. In die so geformte ca. 4 cm lange Tasche wurde die osmotische Minipumpe mit der Öffnung voraus eingeführt. Anschließend erfolgte ein Verschluss der Wunde mittels Nahtmaterial (Mersilene 5-0 RB-1 plus, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) durch 3-4 Stiche und Aufbringen eines Gewebeklebers (3M™ Vetbond™ Veterinary Tissue Adhesive 1469SB, 3M, Cergy Pontoise, France). Zur antiseptischen Versorgung wurde auf die Naht und die umliegende Haut Betaisodona-Salbe aufgebracht. Um ein Auskühlen der Tiere während des Aufwachprozesses zu verhindern, wurden die Käfige mit einer Rotlichtlampe angestrahlt. Die Pumpen verblieben 2 Wochen in den Mäusen zur chronischen Abgabe der Kontroll- oder Hormonlösung.

Das Versuchsvorhaben mit der Versuchs-Nr. 31/2007 wurde gem. § 8 Tierschutzgesetz von der Kreisverwaltung des Saar-Pfalz-Kreises, Homburg, genehmigt.

### **3.4 Gewinnung von Blutproben / ET-1-Bestimmung**

#### **3.4.1 Blutprobengewinnung**

Die Spritzen und Kanülen, die zur Entnahme des Mäuseblutes dienten, wurden mit Heparin-Lösung (Heparin-Natrium 25000 I.E., Braun Melsungen, Deutschland) gespült und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Proben-Röhrchen (Kalium-EDTA-Mikroprobengefäße, 1,3 ml, Sarstedt), in denen später das Blut zentrifugiert wurde, wurden ebenfalls bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (Ursotamin, Serumwerk, Deutschland, 85 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer AG, Deutschland, 15 mg/kg Körpergewicht) in 0,9%iger NaCl-Lösung narkotisiert.

Nach vollständigem Eintritt der Narkose wurde das Abdomen der Tiere mit einer Y-förmigen Schnittführung eröffnet und die Organe so verlagert, dass die *Vena cava inferior* frei zugänglich war. Die *Vena cava inferior* wurde möglichst waagrecht ca. 1 cm unterhalb der Nierenabzweigung punktiert. Die Blutabnahme erfolgte langsam mit Pausen, wenn das Gefäß kollabierte, bis wieder genügend Blutvolumen nachgeflossen war, um die Blutentnahme fortzusetzen (siehe auch Hoff, 2000). Das entnommene Blutvolumen betrug zwischen 350 und 700 µl Blut. Das Blut wurde nach der Entnahme in das vorgekühlte Kalium-EDTA-Probenröhrchen überführt und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert). Der Plasmaüberstand wurde abgenommen, in ein vorgekühltes Eppendorff-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Einsendung in das Analyselabor (Labor Limbach, Heidelberg) erfolgte die Lagerung der Plasmaproben bei -80°C.

#### **3.4.2 ET-1-Bestimmung**

Die Blutplasmaproben wurden in Styroporboxen auf Trockeneis als Übernacht-Express versandt, so dass die Proben ohne Unterbrechung der Kühlkette innerhalb von 24 Stunden im Analyselabor eintrafen.

Die Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration im Blutplasma der Mäuse wurde vom Labor Limbach, Bereich Endokrinologie/Onkologie, Heidelberg, durchgeführt. Es wurden nach Rücksprache mit dem Analyselabor aufgrund der als gering vermuteten ET-1-Plasmakonzentration und des geringen Probenvolumens bei der ET-1-Bestimmung der Human Endothelin-1 Immunoassay von QuantiGlo (QuantiGlo, R&D Systems, Deutschland) und der Immunoassay Endothelin (1-21) von BioMedica (BioMedica, Österreich) verwendet. Als Kontrollen dienten von den Herstellern der Tests angebotene Kontrolllösungen sowie von mir zur Verfügung gestellte Endothelin-1-Stocklösungen, die in humanem Plasma verdünnt wurden.

### **3.5 Aufnahme von Anregungs- und Fluoreszenzspektren**

Die Messungen der Anregungs- bzw. Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffsalze von Indo-1, Fura-2 und Fura Red (Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland) wurden an einem Fluoreszenzspektrometer (LS55 Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer, USA) mit der Software FL Winlab (Perkin Elmer, USA) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Lösungen, die zur Aufnahme der Anregungs- und Fluoreszenzspektren von Indo-1, Fura-2 und Fura Red verwendet wurden, basierend auf destilliertem H<sub>2</sub>O.

Lösung	Farbstoff	Ca <sup>2+</sup>	EGTA	Koffein
1	10 µM	2 mM		
2	10 µM	2 mM		20 mM
3	10 µM		10 mM	
4	10 µM		10 mM	20 mM

Geräteeinstellungen:

Fura-2 (Anregungsspektrum):

- Slit Ex/Em: 2,5 nm/ 3,0 nm
- Wellenlängenbereich: 250 nm – 450 nm
- Emissionswellenlänge: 510 nm
- Verstärkung (EM-Gain): 700
- Aufnahme: 10x bei 200 nm/min

Fura Red (Anregungsspektrum):

- Slit Ex/Em: 2,5 nm/ 20,0 nm
- Wellenlängenbereich: 340 nm – 640 nm
- Emissionswellenlänge: 660 nm
- Verstärkung (EM-Gain): 775
- Aufnahme: 10x bei 500 nm/min

Indo-1 (Fluoreszenzspektrum):

- Slit Ex/Em: 2,5 nm/ 2,5 nm
- Wellenlängenbereich: 355 nm – 600 nm
- Anregungswellenlänge: 340 nm
- Verstärkung (EM-Gain): 700
- Aufnahme: 6x bei 200 nm/min

### **3.6 Messung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration mittels Fluoreszenzfarbstoffe**

#### **3.6.1 Beladung & Setup**

##### **3.6.1.1 Allgemeines**

Die Maus-Kardiomyozyten wurden aus dem Inkubator entnommen und das Medium M199 durch 1 ml Tyrode-Lösung (siehe Tabelle 1 in Kapitel 1.2) ersetzt.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in Form ihrer Azetoxymethyl-Ester (AM) (Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland) wurden als 1 mM Stocklösung in Pluronic F-127 (Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland) angesetzt und im Gefrierschrank aufbewahrt.

Die Beladung erfolgte in jeweils 0,5 ml Farbstofflösung (Tyrode-Lösung + Farbstoff, s.u.) bei RT. Im Anschluss an die Beladungszeit wurde die Farbstofflösung abgenommen und die Zellen mit 2 x 1 ml Tyrode-Lösung gespült, um Farbstoff-Reste zu entfernen, die nicht von den Zellen aufgenommen wurden. Um in den Zellen eine möglichst vollständige Umsetzung des AM-Esters zu aktivem Farbstoff zu

gewährleisten, wurde eine 20-minütige Deesterifikationszeit vor dem Start der Messungen eingehalten.

### 3.6.1.2 Messungen mit Indo-1

Die Indo-1-Beladung erfolgte mit einer 5  $\mu\text{M}$  Indo-1-AM-Farbstofflösung für 30 min bei RT. Die Anregungswellenlänge lag bei 355 nm, die Detektion wurde gleichzeitig bei 405 nm und 490 nm vorgenommen, indem ein Image Splitter verwendet wurde, so dass das Emissionssignal bei 405 nm auf die eine Hälfte, das Emissionssignal bei 490 nm auf die andere Hälfte des CCD-Chips der Kamera abgebildet wurde.

Der Aufbau für die Video-Imaging-Aufnahmen zur Charakterisierung von Kardiomyozyten unterschiedlichen Ursprungs beinhaltete folgende Komponenten:

- Mikroskop NIKON Eclipse TS100
- Till Photonics Polychrome V
- Retiga-2000RV-Kamera, QImaging FAST 1394
- 8x8 Binning des CCD-Chips (200 x 150 Pixel)
- Belichtung 21 ms
- 20x Multi-Immersion-Objektiv, Plan Fluor 0,75 NA, NIKON, Japan
- Filterwürfel: Dichroitischer Filter: 380LP, Emissionsfilter: 390LP
- Dual View Image Splitter (Optical Insights, USA), Dichroitischer Filter: 445LP, Emissionsfilter: 405/25 und 490/25
- Kein Graufilter, keine Mattscheibe
- MyoPacer Field Stimulator, ION OPTIX Corporation

Für die Fluoreszenz-Imaging-Aufnahmen der ET-1-Experimente und der Isoproterenol-Messungen wurden folgende Komponenten verwendet:

- Mikroskop NIKON TE 2000-U
- Till Photonics Polychrome IV
- Andor-Kamera (Andor iXon DV887, Andor Inc., Ireland)
- 4x4 Binning des CCD-Chips (128 x 128 Pixel)
- Belichtung 21 ms
- 20x Multi-Immersion-Objektiv, Plan Fluor 0,75 NA, NIKON, Japan

- ND 0,2 Graufilter, Mattscheibe
- 2-channel Pulse Generator Babraham Technix, Cambridge, UK
- „Zappi“ zur Regulation der Voltstärke (Eigenentwicklung der Feinmechanischen Werkstatt, Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität des Saarlandes, Deutschland)

### 3.6.1.3 Messungen mit Fura-2 und GCaMP2

Die Fura-2-Beladung erfolgte mit einer 1  $\mu$ M Fura-2-AM-Farbstofflösung für 20 min. Die Anregungswellenlängen der Fura-2-Messungen lagen bei 345 nm und 380 nm, die Detektion erstreckte sich über die Wellenlängen von 510 nm bis 780 nm.

Die Anregungswellenlänge für GCaMP2 lag bei 488 nm, die Detektion wurde ebenfalls von 510 nm bis 780 nm durchgeführt.

Für die Fluoreszenz-Imaging-Aufnahmen der GCaMP2-Experimente wurden folgende Komponenten verwendet:

- Andor-Kamera (Andor iXon DV887, Andor Inc., Ireland)
- 4x4 Binning des CCD-Chips (128 x 128 Pixel)
- Belichtung:
  - o Experimente mit komplexer elektrischer Stimulation: Fura-2-Aufnahmen: 7 ms, GCaMP2-Aufnahmen: 10 ms
  - o Kinetik-Experimente: Fura-2-Aufnahmen: 7 ms, GCaMP2-Aufnahmen: 20 ms
- 20x Multi-Immersion-Objektiv, Plan Fluor 0,75 NA, NIKON, Japan
- Filterwürfel: Dichroitischer Filter: 510LP, Emissionsfilter: 645/270
- ND 0,2 Graufilter, Mattscheibe (außer bei Kinetik-Experimenten: hier keine Mattscheibe)
- 2-channel Pulse Generator Babraham Technix, Cambridge, UK
- „Zappi“ zur Regulation der Voltstärke (Eigenentwicklung der Feinmechanischen Werkstatt, Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität des Saarlandes, Deutschland)

### 3.6.2 Protokolle Perfusion und Pacing

In Abbildung 8 bis Abbildung 13 sind die in den einzelnen Video-Imaging-Experimenten verwendeten Protokolle für die Perfusion und die elektrische Stimulation dargestellt. Die Spannung der elektrischen Stimulation wurde individuell an die Reaktionen der beobachteten Zellen angepasst und betrug so viele Volt, dass gerade noch Kontraktionen der Zellen ausgelöst wurden, plus 1 Volt. Für Ventrikelzellen betrug die Spannung meist zwischen 5-8 Volt, bei Vorhofzellen lag sie meist zwischen 8-11 Volt. Überall, wo keine andere Angabe gemacht ist, erfolgte die Perfusion mit Tyrode bzw. fand keine elektrische Stimulation statt.

#### 3.6.2.1 Charakterisierung von Zellen aus dem linken und rechten Vorhof sowie aus den Ventrikeln

Experimente mit komplexer elektrischer Stimulation

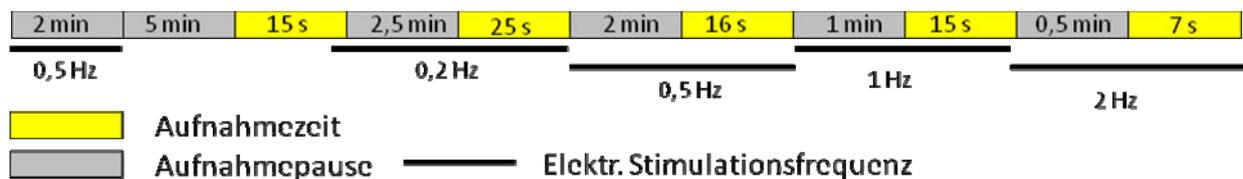


Abbildung 8: Video-Imaging-Protokoll mit Perfusion und elektrischer Stimulation bei Pacing-Experimenten zur Charakterisierung von Kardiomyozyten von verschiedenen Herkunftsorten im Herzen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1.

Koffein-Experimente

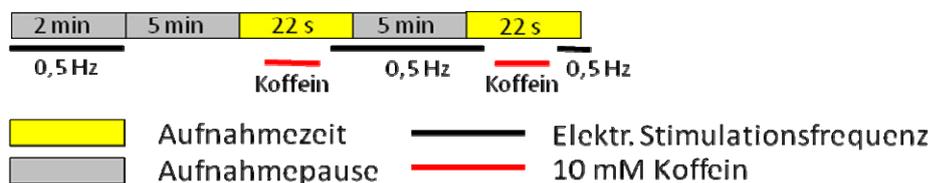


Abbildung 9: Video-Imaging-Protokoll mit Perfusion und elektrischer Stimulation bei Koffein-Experimenten zur Charakterisierung von Kardiomyozyten von verschiedenen Herkunftsorten im Herzen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1.

### 3.6.2.2 Isoproterenol-Experimente

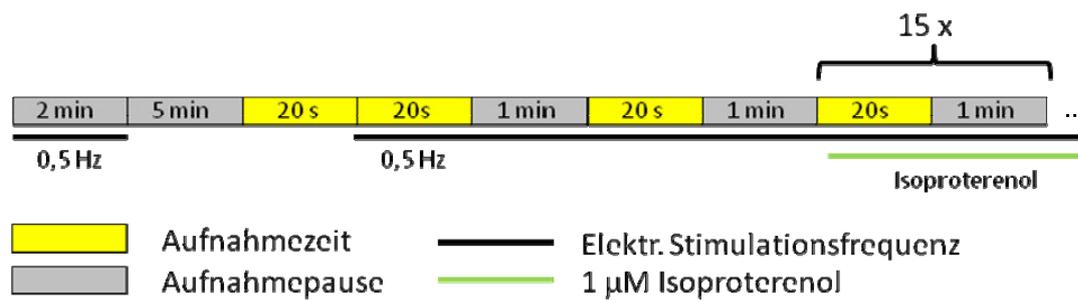


Abbildung 10: Video-Imaging-Protokoll mit Perfusion und elektrischer Stimulation bei Pacing-Experimenten zur Charakterisierung von Kardiomyozyten aus TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1.

### 3.6.2.3 ET-1-Experimente

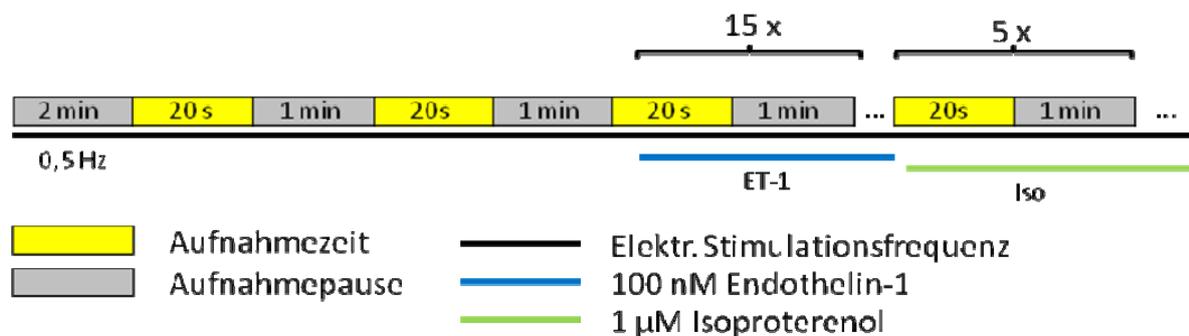


Abbildung 11: Video-Imaging-Protokoll mit Perfusion und elektrischer Stimulation bei Koffein-Experimenten zur Charakterisierung von Kardiomyozyten aus TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Indo-1.

### 3.6.2.4 GCaMP2-Experimente

Experimente mit komplexer elektrischer Stimulation

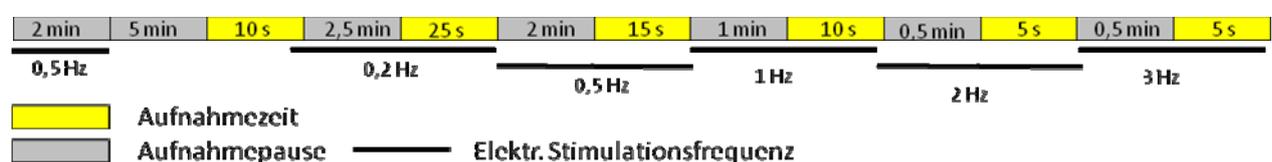


Abbildung 12: Video-Imaging-Protokoll mit elektrischer Stimulation für Experimente mit Fura-2 und dem genetisch kodierten Fluoreszenzfarbstoffs GCaMP2.

## Kinetik-Experimente



Abbildung 13: Video-Imaging-Protokoll mit elektrischer Stimulation für Kinetik-Experimente mit Fura-2 und dem genetisch kodierten Fluoreszenzfarbstoffs GCaMP2.

### 3.6.3 Auswertung der Daten aus Video-Imaging-Messungen

#### 3.6.3.1 Allgemeines

In die Auswertung wurden nur Kardiomyozyten einbezogen, die aufgrund folgender optischer Merkmale als vitale Zellen bewertet werden können: deutliche Querstreifung, klare Zellgrenzen sowie bei Ventrikelzellen quaderförmige Zellform. Zellen, die Arrhythmien oder keine elektrisch induzierten Signale zeigten, wurden aus der weiteren Auswertung herausgenommen, da hier keine bzw. keine fehlerfreien Amplitudenwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ermittelt werden konnten.

#### 3.6.3.2 Indo-1-Auswertung

Da es sich bei Indo-1 um einen emissionsratiometrischen Farbstoff handelt, wurde das Emissionssignal mittels eines Image Splitters in Signale bei 405 nm und 490 nm aufgesplittet, die so auf die Kamera projiziert wurden, dass die Videoaufnahmen das langwellige Signal auf der einen, das kurzwellige Signal auf der anderen Bildhälfte zeigten.

Die Videodateien wurden in ImageJ geladen und die zu betrachtenden Bereiche der Zellen sowie eine freie Hintergrundfläche wurden als Region of interest (ROI) markiert. Für dieselbe Zelle in beiden Hälften des Bildes wurde eine gleiche ROI verwendet.

Aus den einzelnen Bildern der Videos wurden dann Zahlenreihen generiert, so dass für jeden Messpunkt und jede ROI ein Zahlenwert der Fluoreszenzintensität erstellt

wurde. Die Zahlenreihen wurden in Igor importiert, wo mittels eines Makros die Hintergrundkorrektur sowie die Ratiobildung wie folgt durchgeführt wurden:

Ratio Indo-1<sub>Zelle</sub> hintergrundkorrigiert

$$= (I_{\text{Zelle 405 nm}} - I_{\text{Hintergrund 405 nm}}) / (I_{\text{Zelle 490 nm}} - I_{\text{Hintergrund 490nm}})$$

Die so erhaltenen Ratio-Kurven wurden anschließend in IgorPro einer weiteren, nachfolgend beschriebenen Auswertung unterzogen.

#### Experimente mit elektrischer Stimulation

Für die Indo-1-Werte der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Ruhebedingungen wurden die Werte von 50 Messpunkten gemittelt. Zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline während elektrischer Stimulation unter Gleichgewichts-Bedingungen wurden die Minima der Indo-1-Ratio von 5  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten gemittelt. Zur Ermittlung der absoluten Amplituden der elektrisch induzierten Transienten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die Maxima sowie die davorliegenden Minima von 5 Transienten gemittelt und die Minima von den Maxima subtrahiert. Diese absoluten Amplituden bei verschiedenen Frequenzen wurden dann durch die absoluten Amplituden bei 0,2 Hz dividiert, um die prozentuale Veränderung bei unterschiedlichen Frequenzen zu beobachten.

#### Experimente mit Koffein-Applikation

Zur Bestimmung der durch Koffein induzierten Amplitude der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde die Baseline als Durchschnitt von 50 Messpunkten (Zeitspanne von 1,04 s) ermittelt und vom Maximum bei Koffein-Applikation subtrahiert.

Zur Ermittlung der Zeitkonstanten tau 1 (schnellere Abnahme der Indo-1-Ratio nach Beginn der Koffeinapplikation) und tau 2 (langsamere Abnahme der Indo-1-Ratio nach Ende der Koffeinapplikation), siehe Abbildung 14, wurde für die entsprechenden Kurvenabschnitte in IgorPro ein monoexponentieller Fit nach folgender Formel durchgeführt:

$$y = y_0 + A \exp(-(x-x_0)/\text{tau})$$

Für tau 1 wurde der Fit für den Kurvenabschnitt durchgeführt, der von Maximum der Koffein-induzierten Zunahme der Indo-1-Ratio bis zum 400. Messpunkt nach dem Maximum reichte (dies entspricht einer Zeitspanne von 8,34 s).

Für tau 2 wurde ein Kurvenabschnitt ausgewählt, der vom Beginn des Abfalls in der Indo-1-Ratio nach Stopp der Koffeinperfusion bis 250 Messpunkte danach reichte (dies entspricht einer Zeitspanne von 5,21 s).

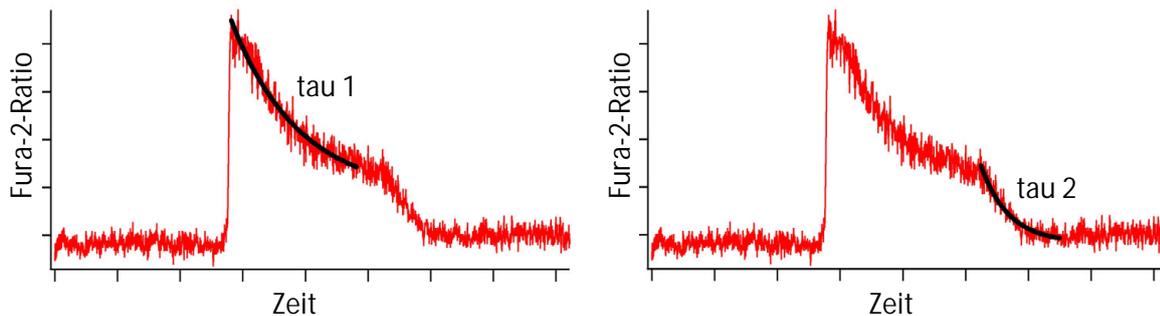


Abbildung 14: Abbildung von Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und deren Zeitkonstanten tau 1 (schnelle Abnahme) nach Beginn der Koffeinzugabe und tau 2 (langsamere Abnahme) nach Ende der Koffeinzugabe in Indo-1-beladenen Kardiomyozyten aus dem Ventrikelgewebe.

### 3.6.3.3 Gleichzeitige Fura-2- und GCaMP2-Messung

Da zum initialen Vergleich beide Fluoreszenzfarbstoffe (Fura-2 und GCaMP2) gleichzeitig in einer Zelle gemessen werden sollten, wurden während des Verlaufs der Messung im Wechsel Bilder bei einer Anregung von 345 nm, 380 nm und 488 nm aufgenommen. Durch dieses Vorgehen entstand zunächst eine Videodatei, die Bilder zu jeder der drei Wellenlängen enthielt. In einem ersten Schritt wurden die Aufnahmen in drei einzelne Videos aufgeteilt, so dass nun jeweils eine Videodatei für 345 nm, 380 nm sowie 488 nm vorlag.

#### Fura-2-Auswertung

Da es sich bei Fura-2 um einen anregungsrationometrischen Farbstoff handelt, der im Wechsel mit 345 nm und 380 nm angeregt wurde, existiert jeweils eine Videodatei für jede der beiden Wellenlängen. In ImageJ wurden zunächst die zu betrachtenden Bereiche der Zellen sowie eine zellfreie Hintergrundfläche als Regions of interest (ROI) markiert. Für verschiedene Videos einer Zelle (verschiedene Wellenlängen oder elektrische Stimulationsfrequenzen) wurden immer die gleichen ROIs

verwendet. Aus den einzelnen Bildern der Videos wurden dann Zahlenreihen generiert, so dass für jeden Messpunkt und jede ROI ein durchschnittlicher Zahlenwert der Fluoreszenzintensität erstellt wurde. Die Zahlenreihen wurden in Excel importiert, wo durch Subtraktion des Hintergrundwertes jedes Zeitpunkts von der Intensität jeder Zell-ROI des entsprechenden Zeitpunktes hintergrundkorrigierte Intensitätswerte entstanden, die dann für eine Ratio-Berechnung verwendet wurden. Zusammenfassend wurde die Ratio nach folgender Formel berechnet:

Ratio Fura-2<sub>Zelle hintergrundkorrigiert</sub>

$$= (I_{\text{Zelle 345 nm}} - I_{\text{Hintergrund 345 nm}}) / (I_{\text{Zelle 380 nm}} - I_{\text{Hintergrund 380 nm}})$$

Die nun erhaltenen Ratio-Werte der Zellen zu jedem Zeitpunkt wurden anschließend in IgorPro importiert, um die Auswertung der erhaltenen Kurven der Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen durchzuführen.

### GCaMP2-Auswertung

Zusätzlich zu den eigentlichen Messungen mit Kardiomyozyten wurde im Anschluss daran eine Aufnahme ohne Zellen unter gleichen Bedingungen gemacht. Dazu wurde eine benachbarte Stelle auf dem Deckglas verwendet oder die Zellen wurden mithilfe einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren der Messlösung vom Deckglas gelöst und weggewirbelt. Diese Leeraufnahme diente im Folgenden dazu, systembedingte Unterschiede in der Ausleuchtung des Hintergrundes korrigieren zu können.

Zunächst wurde von der Videodatei bei 488 nm in ImageJ das Korrekturbild ohne Zellen subtrahiert. Anschließend wurden anhand der ROIs, die bereits für die Videos bei 345 nm und bei 380 nm für die gleichen Zellen verwendet wurden, die Intensitäten der Kardiomyozyten in Zahlenreihen umgewandelt. Die Intensitätswerte der Hintergrund-ROIs wurden nun von den Werten der Zellen abgezogen, so dass ein hintergrundkorrigiertes GCaMP2-Signal entstand:

$$I_{\text{GCaMP2 Zelle hintergrundkorrigiert}} = (I_{\text{Zelle 488 nm}} - I_{\text{Hintergrund 488 nm}})$$

### Experimente mit elektrischer Stimulation

Fura-2: Bei durch elektrische Stimulation induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline unter Gleichgewichts-Bedingungen die Minima der

Fura-2-Ratio von Transienten gemittelt. Um die absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden der Transienten zu ermitteln, wurden 5 Transienten-Maxima der Fura-2-Ratio gemittelt und die Werte der der zugehörigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline davon subtrahiert. Diese absoluten Amplituden bei verschiedenen Frequenzen wurden dann durch die absoluten Amplituden bei 0,2 Hz dividiert, um die prozentuale Veränderung bei unterschiedlichen Frequenzen zu beobachten.

GCaMP2: Zur Auswertung der Amplitude elektrisch stimulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden bei GCaMP2 die Maxima von 5 Transienten gemittelt und durch den Mittelwert der 5 davorliegenden Minima dividiert. Die absoluten Amplituden bei verschiedenen Frequenzen wurden anschließend durch die absoluten Amplituden bei 0,2 Hz dividiert, um die prozentuale Veränderung bei unterschiedlichen Frequenzen zu beobachten.

### Kinetik-Experimente

Für die Korrelationsanalyse der Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei GCaMP2 und Fura-2 wurden die absoluten Amplituden (Maxima minus Minima der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten) durch den Wert des  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline dividiert, um den Effekt unterschiedlicher Expressionslevel des GCaMP2 herauszurechnen.

Die Aufstreichzeit der Kinetiken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurde bestimmt, indem die Zeitspanne zwischen dem Beginn des Aufstrichs der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und dem Erreichen des Maximums ermittelt wurde.

Für die Zeitkonstante tau bei der Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals der Transienten wurde pro Zelle der Mittelwert aus den taus von 3  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten gebildet. Zu Bestimmung von tau einer Transiente wurde einheitlich der Bereich der Kurven nach dem Maximum gewählt, der von 80% der Maximalamplitude bis 20% der Maximalamplitude reichte. Dieses Vorgehen, das von der tau-Ermittlung der später beschriebenen Koffein-Experimenten abweicht, wurde gewählt, da die Kinetiken von GCaMP2 und Fura-2 im Bereich der Maxima der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unterschiedliche Verläufe aufwiesen und bei GCaMP2 dort kein zufriedenstellender Fit möglich war. Der monoexponentielle Fit wurde in Igor Pro nach der unter 3.6.3.2 genannten Formel durchgeführt.

### **3.7 Statistische Tests**

Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt.

Die Stichproben wurden zunächst auf Normalverteilung getestet (D'Agostino and Pearson omnibus normality test).

Bei Stichproben mit Normalverteilung sind Mittelwerte sowie SEM angegeben und das Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurde mit einem t-Test getestet; bei gepaarten Werten handelte es sich um einen gepaarten t-Test, bei ungepaarten Werten um einen ungepaarten t-Test.

Bei Stichproben, die von einer Normalverteilung abweichen, ist der Median angegeben. Zur Prüfung der Signifikanz von Unterschieden wurde bei gepaarten Werten der Mann-Whitney-Test, bei ungepaarten Werten der Wilcoxon-Test verwendet.

Eine Signifikanz wurde unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  bei  $p < 0,05$  angenommen, wobei bei den Abbildungen gilt: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  und \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von Koffein auf spektrale Eigenschaften verschiedener $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe

Bei der Durchführung von Video-Imaging-Experimenten zur Beobachtung der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in lebenden Zellen ist es wichtig, den für die Versuchsbedingungen am besten geeigneten Fluoreszenzfarbstoff auszuwählen. Um Effekte zu minimieren, die nicht auf Veränderungen der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  beruhen, empfiehlt es sich, einen ratiometrischen Farbstoff zu verwenden, da durch die Bildung der Ratio  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Effekte wie z.B. Bleichen des Farbstoffs, Bewegungsartefakte oder pH-Effekte herausgekürzt werden. Aus diesen Gründen sind Fura-2 und Indo-1 gut für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging in Kardiomyozyten geeignet und werden häufig eingesetzt (Wu et al., 2010; Higazi et al., 2009; Bootman et al., 2007).

Bei ersten Experimenten mit Fura-2, in denen Koffein zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SRs appliziert wurde, war jedoch auffällig, dass die Fura-2-Ratio bei Anwesenheit von Koffein nach der erwarteten Zunahme teilweise auf Werte unter den Ausgangswert sank und nach Beendigung der Koffein-Zugabe auf den Ausgangswert zurückkehrte. Abbildung 15 zeigt ein Beispiel für den Verlauf der Fluoreszenz bei Koffeinapplikation in einer mit Fura-2 beladenen Ventrikelzelle.

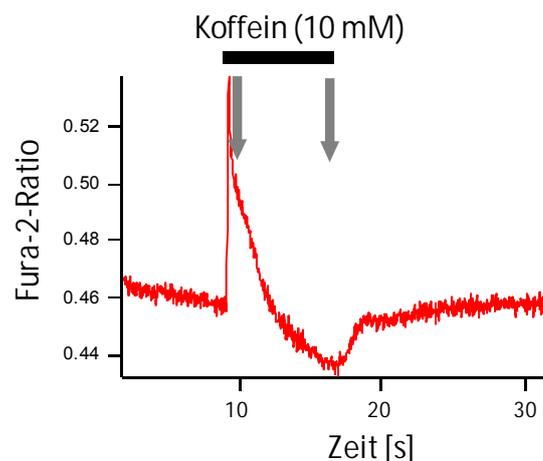


Abbildung 15: Exemplarischer Graph des Verlaufs der Fura-2-Ratio bei Zugabe von 10 mM Koffein zu einer mit Fura-2 beladenen Ventrikelzelle ohne elektrische Stimulation. Graue Pfeile markieren die Stellen des Beginns der unerwarteten Abnahme und der Rückkehr zum erwarteten Kurvenverlauf der Fura-1-Ratio.

Da eine Unterscheidung der basalen  $[Ca^{2+}]$  in der Anwesenheit von Koffein unbekannt war, lag die Vermutung nahe, dass es sich um einen Effekt des Koffeins auf den Fluoreszenzfarbstoff handeln könnte. Ich habe deshalb in *in vitro*-Experimenten mit verschiedenen ratiometrischen  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Fura-2, Fura Red und Indo-1) deren Koffein-abhängige Fluoreszenzveränderung untersucht, um einen Fluoreszenzfarbstoff zu ermitteln, der auch bei Koffein-Experimenten verwendet werden kann. Es ist seit längerem bekannt, dass Koffein das Fluoreszenzverhalten von Calcium-Sensoren verändern kann (Muschol et al., 1999; O'Neill, 1990), dies ist aber noch nicht hinreichend untersucht worden.

Koffein (20 mM) veränderte bei allen drei Fluoreszenzfarbstoffen – wenn auch in unterschiedlichem Maße – die spektralen Eigenschaften der emittierten Fluoreszenz, wie die spektrale Lage des Maximums, Minimums und des isosbestischen Punkts, sowie auch die Fluoreszenzintensitäten. Eine Übersicht über Koffein-induzierte Effekte gibt Tabelle 3. Der Einfluss von Koffein auf die Ratio der Fluoreszenzfarbstoffe bei Wellenlängen, die für Messungen in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen waren (Fura-2 und Indo-1) bzw. wären (Fura Red), ist als Übersicht in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Durch die Anwesenheit von 20 mM Koffein verursachte Veränderung der spektralen Eigenschaften der Anregungsspektren von Fura-2 und Fura Red sowie des Fluoreszenzspektrums von Indo-1 in fluoreszenzspektrometrischen Experimenten mit 10  $\mu$ M Farbstofflösungen bei 2 mM  $Ca^{2+}$  bzw. 10 mM EGTA.

			Spektrale Eigenschaften		
			ohne Koffein [nm]	mit Koffein [nm]	Differenz [nm]
Fura-2	2 mM $Ca^{2+}$	Max	335.50	337.50	2.00
	10 mM EGTA	Max	360.50	362.50	2.00
	isosbest. Punkt		360.50	363.00	2.50
Fura Red	2 mM $Ca^{2+}$	Max	437.50	444.50	7.00
	10 mM EGTA	Max	477.00	477.50	0.50
	isosbest. Punkt		452.50	464.00	11.50
Indo-1	2 mM $Ca^{2+}$	Max	404.50	404.00	-0.50
	10 mM EGTA	Max	465.00	464.00	-1.00
	isosbest. Punkt		461.00	456.50	-4.50

Tabelle 4: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten und der berechneten Fluoreszenz-Ratios von Fura-2, Fura Red und Indo-1 (jeweils 10  $\mu\text{M}$ ) unter dem Einfluss von 20 mM Koffein bei 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 10 mM EGTA.

			Fluoreszenzintensitäten			
			ohne Koffein	mit Koffein	Differenz	Veränderung [%]
Fura-2	2 mM $\text{Ca}^{2+}$	345 nm	500,53	544,10	43,56	8,70
		380 nm	20,04	36,22	16,18	80,70
		Ratio 345 nm/380 nm	24,97	15,02	-9,95	-39,84
	10 mM EGTA	345 nm	196,09	210,43	14,35	7,32
		380 nm	201,01	247,79	46,78	23,27
		Ratio 345 nm/380 nm	0,98	0,85	-0,13	-12,94
FuraRed	2 mM $\text{Ca}^{2+}$	420 nm	83,26	176,75	93,49	112,28
		480 nm	14,15	51,69	37,54	265,37
		Ratio 420 nm/480 nm	5,89	3,42	-2,47	-41,90
	10 mM EGTA	420 nm	41,68	67,41	25,73	61,74
		480 nm	76,07	138,52	62,45	82,10
		Ratio 420 nm/480 nm	0,55	0,49	-0,06	-11,18
Indo-1	2 mM $\text{Ca}^{2+}$	405 nm	737,50	154,97	-582,54	-78,99
		485 nm	198,52	38,41	-160,11	-80,65
		Ratio 405 nm/485 nm	3,72	4,03	0,32	8,61
	10 mM EGTA	405 nm	33,94	10,68	-23,26	-68,54
		485 nm	298,85	67,45	-231,40	-77,43
		Ratio 405 nm/485 nm	0,11	0,16	0,04	39,39

#### 4.1.1 Fura-2

Um das spektrale Verhalten von Fura-2 unter dem Einfluss von Koffein zu untersuchen, wurden in einem Spektralphotometer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Anregungsspektren einer Fura-2-Lösung (10  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Ich wählte für Fura-2 Anregungsspektren, da es sich hierbei um einen anregungsrationometrischen Farbstoff handelt. Abbildung 16 fasst die Ergebnisse eines typischen Experiments zusammen.

Die Zugabe von 20 mM Koffein bewirkte eine Verschiebung der Maxima des Anregungsspektrums von Fura-2 bei 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ebenso wie bei 10 mM EGTA um jeweils 2 nm und der Wellenlänge des isosbestischen Punktes um 2,5 nm zum langwelligen Bereich hin (siehe Tabelle 3 und Abbildung 16).

Wie Tabelle 4 und Abbildung 16 weiterhin zeigen, stiegen unter dem Einfluss von 20 mM Koffein die Fluoreszenzintensitäten bei einer Anregung von 345 nm und 380 nm an. Dieser Anstieg gestaltete sich derart, dass sich die ermittelte Fura-2-Ratio bei 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  um 39,8 %, bei 10 mM EGTA um 12,9 % verringerte.

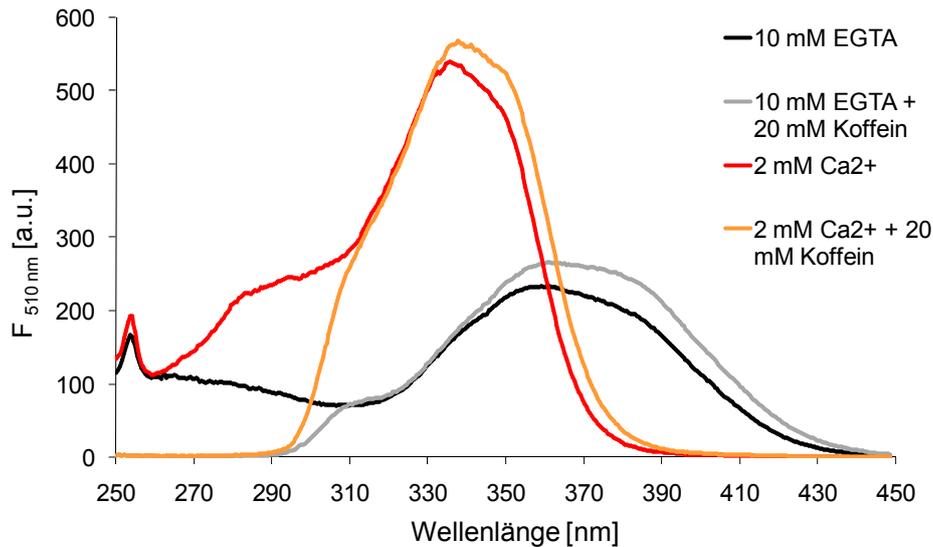


Abbildung 16: Anregungsspektrum von 10  $\mu\text{M}$  Fura-2 mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  oder 10 mM EGTA in der An- bzw. Abwesenheit von 20 mM Koffein bei einer Detektionswellenlänge von 510 nm;  $n = 1$  mit 5 Wiederholungen.

#### 4.1.2 Fura Red

Um das spektrale Verhalten von Fura Red unter dem Einfluss von Koffein zu untersuchen, wurden in einem Spektralphotometer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Anregungsspektren einer Fura-2-Lösung (10  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Ich wählte für Fura Red Anregungsspektren, da es sich hierbei um einen anregungsrationometrischen Farbstoff handelt. Abbildung 17 fasst die Ergebnisse eines typischen Experiments zusammen.

Wie auch bei Fura-2 verschob sich bei Anwesenheit von 20 mM Koffein das Maximum des Anregungsspektrums von Fura Red bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM zum langwelligen Bereich des Spektrums. Allerdings fand hier eine Verschiebung um 7 nm statt. In der EGTA-Lösung waren die Auswirkungen der Koffein-Zugabe geringer; hier lag bei Anwesenheit von Koffein das Maximum 0,5 nm weiter im langwelligen Bereich. Die Lage des isosbestischen Punktes hingegen wurde durch das Koffein stärker beeinflusst als bei Fura-2 und befand sich in der Koffein-haltigen Lösung 11,5 nm weiter im langwelligen Bereich (siehe Tabelle 3).

Bei Anwesenheit von Koffein stieg die Fluoreszenzintensität bei 420 nm und bei 480 nm stark an und es ergaben sich dadurch Ratios, die bei 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  um 41,9 % und bei 10 mM EGTA um 11,2 % unter den Ratios lagen, die ohne Zugabe von Koffein ermittelt wurden (siehe Tabelle 4).

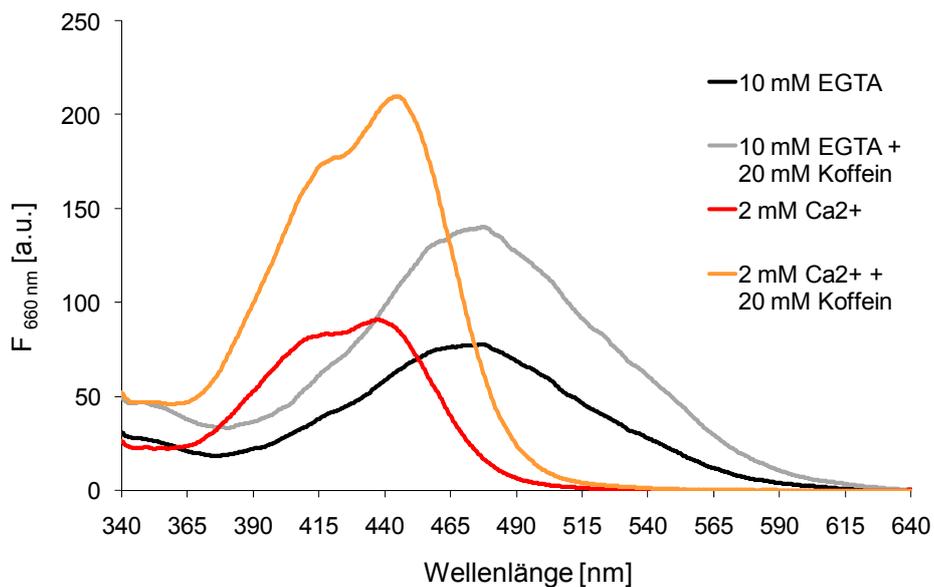


Abbildung 17: Anregungsspektrum von 10 µM Fura Red mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> oder 10 mM EGTA in An- bzw. Abwesenheit von 20 mM Koffein bei einer Detektionswellenlänge von 660 nm; n = 1 mit 5 Wiederholungen.

### 4.1.3 Indo-1

Um das spektrale Verhalten von Indo-1 unter dem Einfluss von Koffein zu untersuchen, wurden in einem Spektralphotometer Ca<sup>2+</sup>-abhängige Emissionsspektren einer Indo-1-Lösung (10 µM) untersucht. Ich wählte für Indo-1 Emissionsspektren, da es sich hierbei um einen emissionsratiometrischen Farbstoff handelt. Abbildung 18 fasst die Ergebnisse eines typischen Experiments zusammen. Die Analyse der Fluoreszenzspektren von Indo-1 ergab, dass sich bei einer Anwesenheit von 20 mM Koffein die Maxima der Fluoreszenzspektren bei 2 mM Ca<sup>2+</sup> um 0,5 nm und bei 10 mM EGTA um 1 nm zum kurzwelligen Bereich hin verschoben (siehe Tabelle 3).

Anders als bei Fura-2 und Fura Red nahmen die Fluoreszenzintensitäten bei den zur Ratiobildung verwendeten Wellenlängen unter Einfluss von Koffein ab. Die Ratio der Ca<sup>2+</sup>-haltigen Lösung veränderte sich um 8,6%, die der EGTA-Lösung um 39,4 % (Tabelle 4). Während bei den beiden Fura-Farbstoffen die größte Änderung in der Ratio bei der Ca<sup>2+</sup>-haltigen Lösung zu beobachten war, war dies bei Indo-1 in der EGTA-haltigen Lösung der Fall.

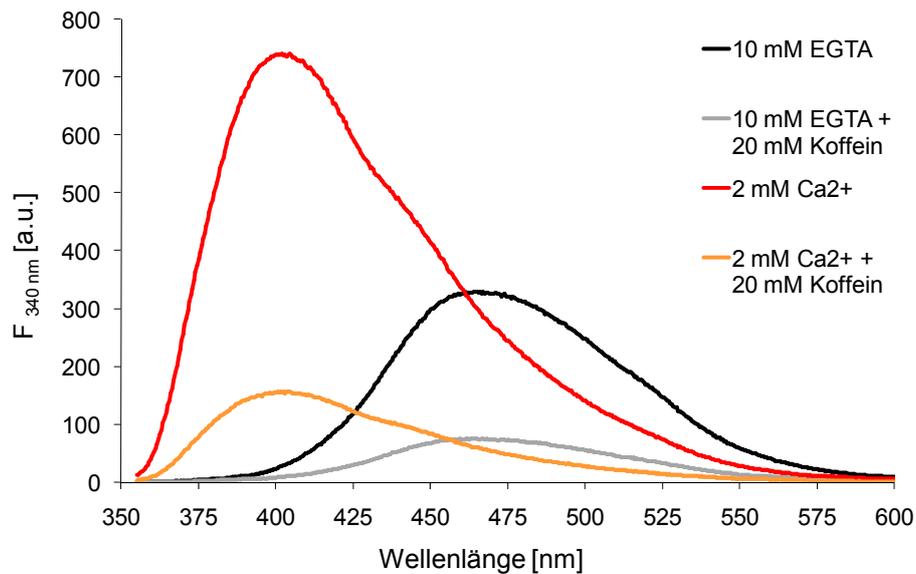


Abbildung 18: Emissionsspektrum von 10 µM Indo-1 mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> oder 10 mM EGTA in An- bzw. Abwesenheit von 20 mM Koffein bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm; n = 1 mit 5 Wiederholungen.

Bei Experimenten, die ich unter der Verwendung von Indo-1 durchgeführt habe, um die Auswirkungen von Koffein auf in Kardiomyozyten zu untersuchen, war keine offensichtliche Veränderung der Indo-1-Ratio zu beobachten, die nicht durch zelluläres Verhalten zu erklären war. Abbildung 19 zeigt die Indo-1-Ratio eines typischen Experiment s in einer mit Indo-1 beladenen Ventrikelzelle bei Zugabe von 10 mM Koffein.

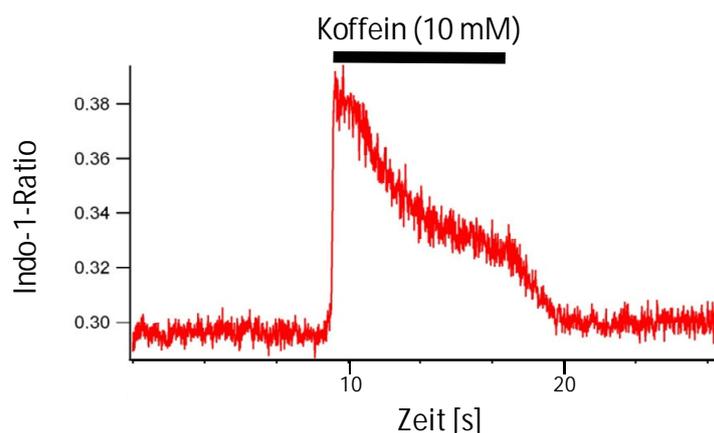


Abbildung 19: Exemplarischer Graph des Verlaufs der Indo-1-Ratio bei Zugabe von 10 mM Koffein zu einer mit Indo-1 beladenen Ventrikelzelle ohne elektrische Stimulation.

Zusammengefasst zeigen diese Versuchsreihen mit Fura-2, Fura Red und Indo-1, dass Koffein abhängig von der Wellenlänge und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration das

spektrale Verhalten aller drei untersuchter Fluoreszenzfarbstoffe beeinflusst hat. Dabei ist auffällig, dass sich die Effekte auf die Gruppe der beiden Fura-Farbstoffe und auf Indo-1 gegenteilig auswirkten. Obwohl das spektrale Verhalten aller drei Fluoreszenzfarbstoffe *in vitro* durch Koffein beeinflusst wurde, schien die Indo-1-Ratio *in den in vivo*-Experimente in Kardiomyozyten unter den vorherrschenden Bedingungen nur wenig störende Veränderungen erfahren zu haben.

## **4.2 Untersuchungen der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration in GCaMP2-exprimierenden Mausventrikelmyozyten**

Bei GCaMP2 handelt es sich um einen genetisch kodierten  $Ca^{2+}$ -Sensor, der aufgrund der komplexen Konformationsänderungen, die GCaMP2 im Rahmen der Erzeugung eines Fluoreszenzsignals nach  $Ca^{2+}$ -Bindung durchlaufen muss. Daher ist es denkbar, dass es sich in seinen Reaktionseigenschaften, wie z.B. der Bindungskinetik, von bisher etablierten, nicht proteinbasierten Fluoreszenzfarbstoffen, wie Fura-2, unterscheidet. Um festzustellen, ob und in welchem Maße Unterschiede zu Fura-2 bestehen, habe ich Versuchsreihen zur Repräsentation der Zellpopulation, zu kinetischen Eigenschaften und zur Eignung in komplexeren Experimenten mit elektrischer Stimulation durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben sind.

### **4.2.1 Eignung von GCaMP2 zur Repräsentation der Zellpopulation im Vergleich zu Fura-2**

Ein erster Vergleichswert, den ich betrachtet habe, um Unterschiede zwischen GCaMP2 und Fura-2 zu untersuchen, war die Anzahl der Zellen, die in ihrem GCaMP2- oder Fura-2-Signal erkennbare Fluoreszenzänderungen bei elektrischer Stimulation aufweisen. Hierzu habe ich Daten aus Experimenten zu Kinetikeigenschaften der Fluoreszenzsignale bei elektrischer Stimulation herangezogen, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

Untersucht wurden Ventrikelzellen aus GCaMP2-Mäusen, die mit Fura-2 beladen wurden, um die Fluoreszenzsignale von Fura-2 und GCaMP2 bei elektrischer Stimulation direkt miteinander vergleichen und charakterisieren zu können.

Abbildung 20 zeigt exemplarisch die Rohdaten einer repräsentativen Zelle, bei der elektrisch induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowohl in den Fura-2-Signalen als auch im GCaMP2-Signal beobachtet werden konnten.

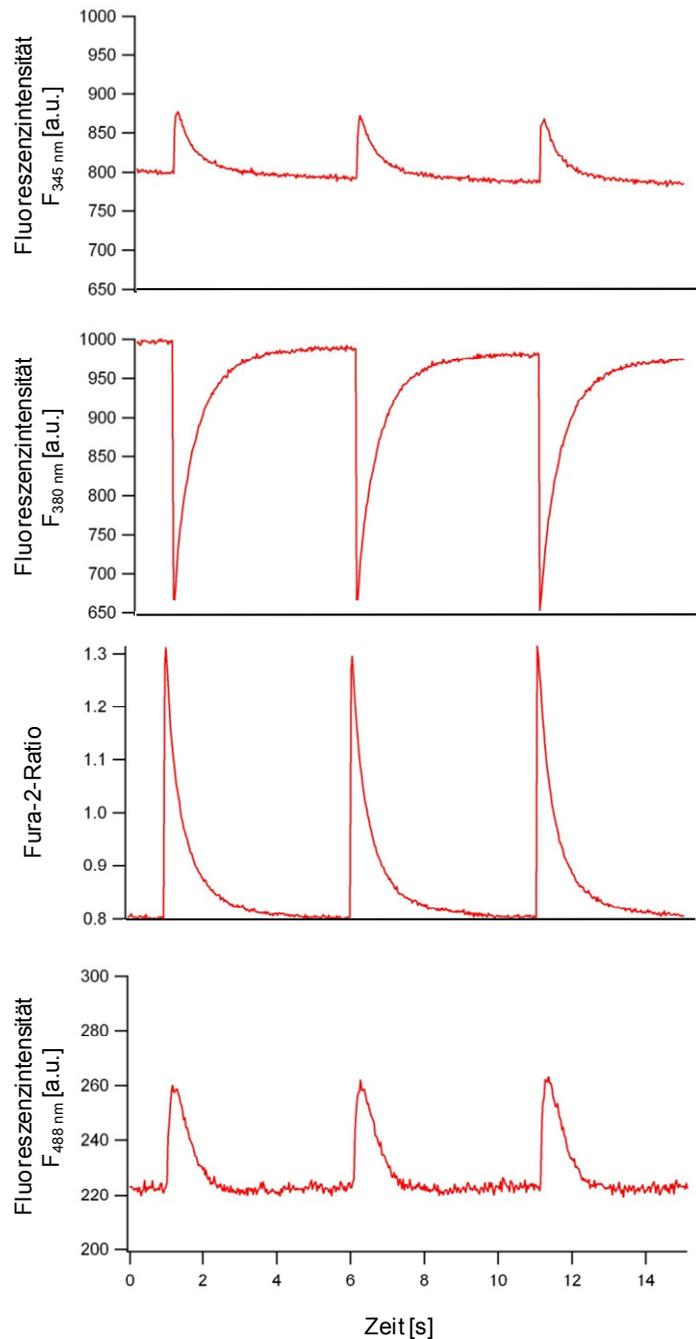


Abbildung 20: Exemplarische Rohdaten (Fluoreszenzintensität bei 345 nm, Fluoreszenzintensität bei 380 nm, Fura-2-Ratio ( $F_{345}/F_{380}$ ) und Fluoreszenzintensität bei 488 nm) einer mit Fura-2 beladenen Ventrikelzelle einer GCaMP2-Maus bei elektrischer Stimulation von 0,2 Hz.

Ich habe für die Kinetikexperimente insgesamt 147 vitale (Definition siehe Material & Methoden), mit Fura-2 beladene Ventrikel-Kardiomyozyten aus vier GCaMP2-Mäusen untersucht. Von den 147 Zellen zeigten 123 Zellen (83,7 % der Zellpopulation) eine durch elektrische Stimulation hervorgerufene Änderung in der Ratio der Fura-2-Fluoreszenz. Von diesen wiederum war in 50 Zellen eine durch die elektrische Stimulation hervorgerufene Änderung in der GCaMP2-Fluoreszenz beobachtbar; dies entspricht 34,0 % der untersuchten Zellpopulation. In keiner der 24 Zellen (16,3 % der Zellpopulation), in denen sich keine Transienten im Fura-2-Signal zeigten, konnte eine Änderung in der GCaMP2-Fluoreszenz bei elektrischer Stimulation beobachtet werden.

Diese Betrachtung zeigte auf, dass mit Fura-2 bei einem deutlich höheren Anteil der Zellpopulation  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet werden konnten als mithilfe von GCaMP2.

Um näher zu untersuchen, aus welchem Grund der Großteil der Zellen, die in der Fura-2-Ratio während elektrisch induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten messbare Fluoreszenzveränderungen zeigten, im GCaMP2-Signal keine messbaren Fluoreszenzveränderungen erkennen ließen, habe ich eine Korrelationsanalyse der auf die jeweilige  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline normierten Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten für beide Farbstoffe durchgeführt. Einbezogen wurden hier alle Zellen der Kinetik-Experimente, in deren elektrische Stimulation zu messbaren Veränderungen der Fura-2-Ratio geführt hat. Die normierten Amplituden beider Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abbildung 21 gegeneinander aufgetragen. Eine Korrelationsanalyse ergab, dass eine signifikante Korrelation existiert ( $p < 0,0001$ ;  $n = 4$  Mäuse, 123 Zellen). Abbildung 21 zeigt, dass die Zellen, die keine im GCaMP2-Signal erkennbare Fluoreszenztransienten (GCaMP2-Amplitude = 0) aufwiesen, eher eine kleine Fura-2-Amplitude zeigten. Bei steigenden Fura-2-Transienten waren zunehmend auch GCaMP2-Transienten  $> 0$  zu erkennen, die tendenziell größer wurden, je größer die Fura-2-Amplitude war. Der Einfluss durch unterschiedliche Expressionslevel von GCaMP2 in den einzelnen Zellen wurde durch die Normierung der Amplitude auf die jeweilige  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline korrigiert.

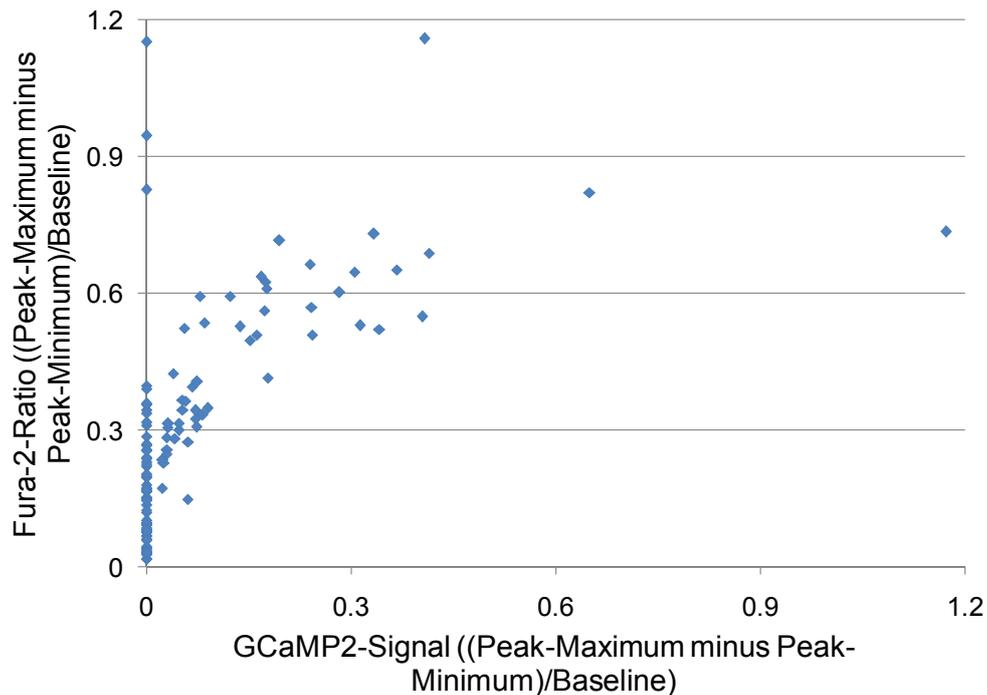


Abbildung 21: Beziehung zwischen dem GCaMP2- und Fura-2-Signals der Amplitude (Maximum minus Minimum) von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Frequenz 0,2 Hz), normiert auf die jeweiligen Werte vor Stimulation. Korrelation signifikant mit  $p < 0,0001$ ;  $n = 4$  Mäuse, 123 Zellen).

Dies bedeutet, dass bei Verwendung von GCaMP2 vor allem diejenigen Zellen nicht erfasst werden konnten, die kleinere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aufwiesen.

Um herauszufinden, ob die Fura-2-Ratio und das absolute GCaMP2-Signal der diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale miteinander korrelieren, habe ich auch hier eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dies ermöglicht eine Aussage, ob andere Faktoren als  $\text{Ca}^{2+}$ , wie z.B. das Expressionslevel des GCaMP2 in verschiedenen Zellen einen Einfluss auf die Höhe von absoluten GCaMP2-Fluoreszenzsignalen haben können. Eine Korrelationsanalyse der Fura-2-Ratio und des GCaMP2-Signals der basalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei allen Zellen der Kinetik-Experimente (siehe Abbildung 22) ergab keine Korrelation.

Dieses Ergebnis zeigt auf, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen diastolischem Fura-2- und GCaMP2-Signal bestand ( $n = 4$  Mäuse, 147 Zellen).

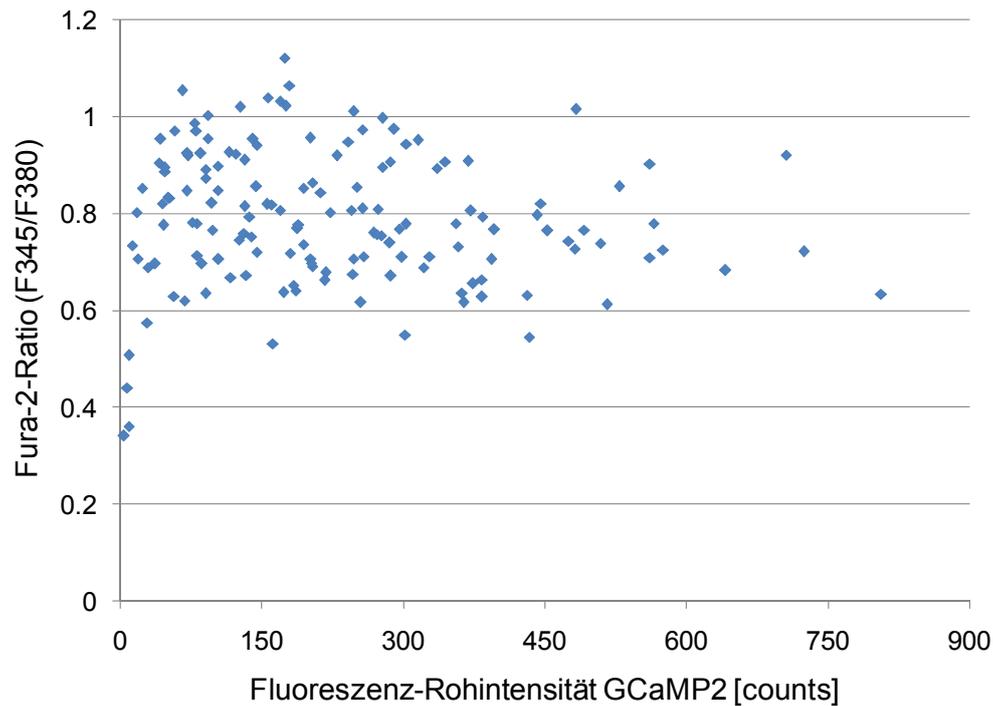


Abbildung 22: Beziehung zwischen dem diastolischen GCaMP2- und Fura-2-Signal in Mausventrikelmiozyten. Korrelation nicht signifikant; n = 4 Mäuse, 147 Zellen.

#### 4.2.2 Vergleich der Kinetiken von GCaMP2 und Fura-2 bei elektrisch induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Da GCaMP2 im Rahmen der Erzeugung des Fluoreszenzsignals nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung komplexe Konformationsänderungen durchlaufen muss, ist es möglich, dass die Bindungskinetik langsamer ist als die anderer, nicht-proteinbasierter Fluoreszenzfarbstoffe. Daher habe ich die kinetischen Eigenschaften der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Fluoreszenzsignalen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe bei elektrischer Stimulation untersucht.

Ich habe hierzu ein Protokoll verwendet, mit dem ich zwei kinetische Eigenschaften der Fluoreszenzsignale von Fura-2 und GCaMP2 bei elektrischer Stimulation untersuchen konnte: die Aufstichzeit und die die Zeitkonstante  $\tau$  der Fluoreszenzabnahme der elektrisch induzierten Transienten.

Um die beiden Fluoreszenzfarbstoffe direkt miteinander vergleichen zu können, habe ich die Kinetiken bei elektrischer Stimulation in Zellen beobachtet, die parallel beide Farbstoffe enthielten.

Ein repräsentatives Beispiel für die Kinetik von GCaMP2 bzw. Fura-2 ist in Abbildung 23 dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei Transienten, die zeitgleich in der gleichen Zelle aufgenommen wurden, deren Signal zu Beginn des Aufstrichs auf Null gesetzt und die auf das Maximum der Transiente normiert wurden.

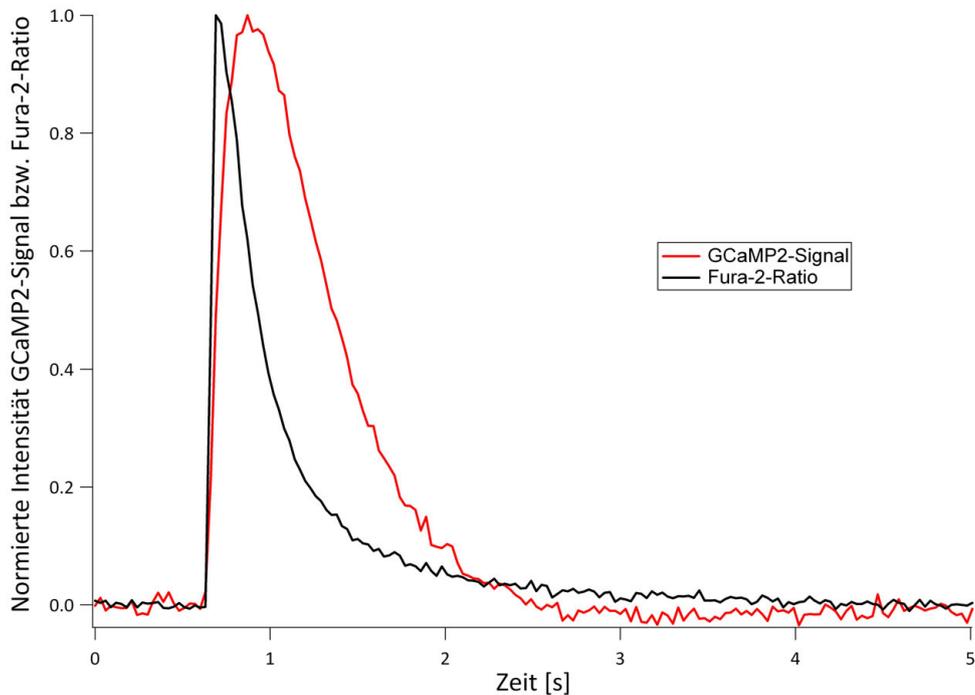


Abbildung 23: Typische Transienten, die in einer Fura-2-beladenen Ventrikel-Kardiomyozyte einer GCaMP2-Maus aufgezeichnet wurden (Stimulationsfrequenz: 0,2 Hz). Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Transienten unter Gleichgewichtsbedingungen miteinander gemittelt. Es wurden normierte Fluoreszenzen aufgetragen.

Die beiden Merkmale, an denen die Unterschiede in der Kinetik der beiden Farbstoffe festgemacht werden können (Aufstrichzeit und die Zeitkonstante  $\tau$  der Fluoreszenzabnahme), habe ich im Folgenden näher analysiert.

#### 4.2.2.1 Aufstrichzeit

Die Aufstrichzeit bei einer elektrischen Stimulation von 0,2 Hz beträgt bei Fura-2 82,50 ms ( $n = 4$  Mäuse, 123 Zellen) und dauert bei GCaMP2 mit 220,0 ms ( $n = 4$  Mäuse, 50 Zellen) deutlich länger (siehe Abbildung 24). Der Unterschied in der Aufstrichzeit der beiden Farbstoffe war signifikant ( $p < 0,0001$ ).

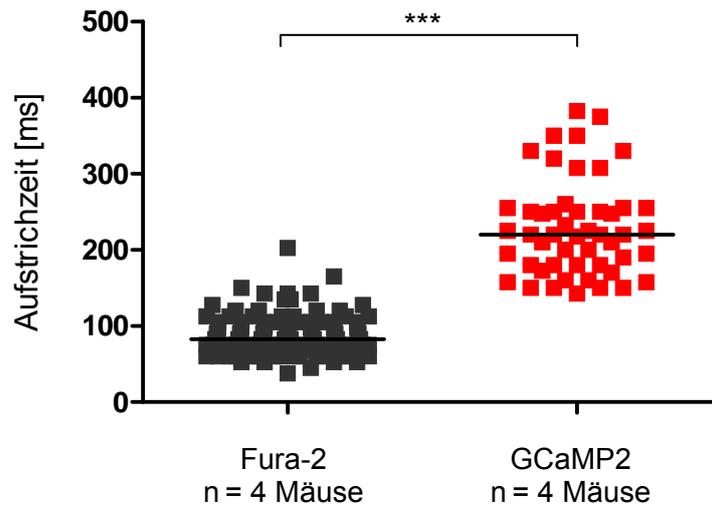


Abbildung 24: Zeit von Beginn des Aufstreichs der elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente bis zum Erreichen des Transientenmaximums (Aufstreichzeit) in Fura-2-beladenen GCaMP2-Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz. Mediane;  $p < 0,0001$ ; Fura-2:  $n = 4$  Mäuse, 123 Zellen; GCaMP2:  $n = 4$  Mäuse, 50 Zellen.

#### 4.2.2.2 Zeitkonstante Tau der Fluoreszenzabnahme elektrisch stimulierter $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Die Zeitkonstante tau ist eine Überlagerung der Abnahmegeschwindigkeit der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  und der Bindungskinetik des verwendeten Farbstoffs. Idealerweise ist die Bindungskinetik des Farbstoffs sehr viel schneller als die des Calcium-Signals, so dass erstere vernachlässigt werden kann. Da sich die Form der Kurven der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten der beiden Farbstoffe v.a. im Bereich des Maximums stark unterscheidet, scheint die oben formulierte Idealkonstellation zumindest für GCaMP2 nicht zuzutreffen. Das kommt auch darin zum Ausdruck, dass bei GCaMP2 kein monoexponentieller Fit zur Ermittlung von tau möglich war. Daher wurde bei beiden Farbstoffen der Bereich von 80 % bis 20 % der Maximalamplitude zur Berechnung von tau herangezogen.

Die Abnahme der Fura-2-Ratio war signifikant schneller ( $p < 0,0001$ ) als die des GCaMP2-Signals (siehe Abbildung 25). Das tau von GCaMP2 betrug 641,4 ms ( $n = 4$  Mäuse, 46 Zellen) und war signifikant größer als das tau von Fura-2, das 267,6 ms ( $n = 4$  Mäuse, 46 Zellen) betrug.

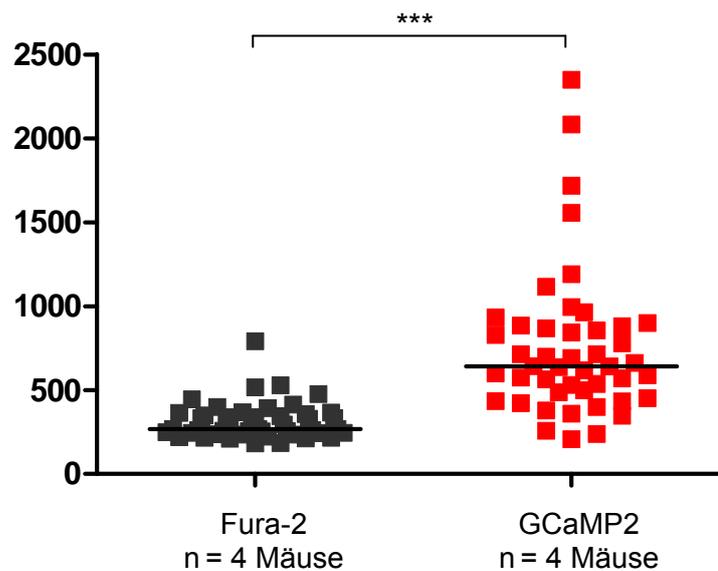


Abbildung 25: Zeitkonstante tau der Abnahme des GCaMP2-Signals bzw. der Fura-2-Ratio bei elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (0,2 Hz) in Fura-2-beladenen GCaMP2-Kardiomyozyten. Mediane;  $p < 0,0001$ ; Fura-2: n = 4 Mäuse, 46 Zellen; GCaMP2: n = 4 Mäuse, 46 Zellen.

### 4.2.3 Vergleich der Eignung von GCaMP2 und Fura-2 bei komplexeren Messungen mit elektrischer Stimulation

#### 4.2.3.1 Einfluss der beiden Farbstoffe in Parallelmessungen auf die Fluoreszenz-Intensitäten unter Ruhebedingungen

Bei Parallelmessungen zweier Fluoreszenzfarbstoffe in derselben Zelle besteht die Möglichkeit einer einseitigen oder wechselseitigen Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften aufgrund einer Überlagerung ihrer Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Dieser sogenannte Cross-Talk entsteht, wenn bei Anregung eines der beiden Farbstoffe auch der zweite angeregt wird oder das Fluoreszenzsignal des einen Farbstoffs seinerseits den zweiten anregt (sog. FRET). In beiden Fällen kommt es zu einer Verfälschung des detektierten Fluoreszenzsignals, falls nicht die Möglichkeit besteht, die beiden Farbstoffe spektral zu trennen.

Um einen möglichen Cross-Talk zwischen GCaMP2 und Fura-2 in Parallelmessungen zu untersuchen, habe ich die Fluoreszenz-Signale sowie die Fura-2-Ratio in vier verschiedenen Zellgruppen unter Ruhebedingungen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 zusammengefasst.

Die Anwesenheit von GCaMP2 in Fura-2-beladenen Kardiomyozyten veränderte die Fluoreszenz-Intensitäten von Fura-2 bei Anregung mit 345 nm und 380 nm im Vergleich zu wt-Zellen, die kein GCaMP2 exprimierten (siehe Abbildung 26). Die Fluoreszenz-Intensitäten bei 345 nm und 380 nm nahmen tendenziell ab, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (wt mit Fura-2: n = 2 Mäuse, 32 Zellen; GCaMP2-Mäuse mit Fura-2: n = 5 Mäuse, 42 Zellen).

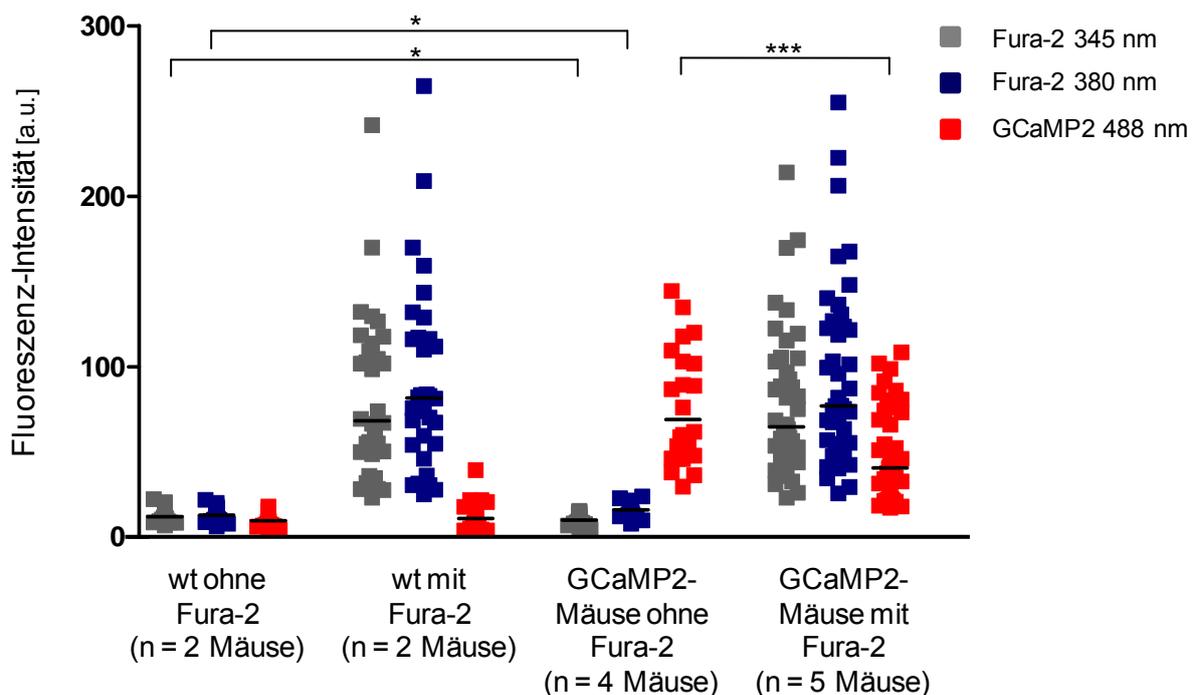


Abbildung 26: Fluoreszenz-Intensitäten bei den Fura-2-Anregungswellenlängen 345 nm und 380 nm sowie der GCaMP2-Anregungswellenlänge 488 nm in Kardiomyozyten aus wt- und GCaMP2-Mäusen mit bzw. ohne Fura-2-Beladung unter Ruhebedingungen (ohne elektrische Stimulation). Mediane; wt ohne Fura-2: n = 2 Mäuse, 26 Zellen; wt mit Fura-2: n = 2 Mäuse, 32 Zellen; GCaMP2-Mäuse ohne Fura-2: n = 4 Mäuse, 22 Zellen; GCaMP2-Mäuse mit Fura-2: n = 5 Mäuse, 42 Zellen.

Die Verschiebung der Fluoreszenz-Intensität durch die Anwesenheit von GCaMP2 bei den Fura-2-Anregungswellenlängen führte bei den Fura-2-beladenen Zellen zu

einer signifikanten Abnahme ( $p = 0,001$ ) in der Fura-2-Ratio um 11,3% (siehe Abbildung 27).

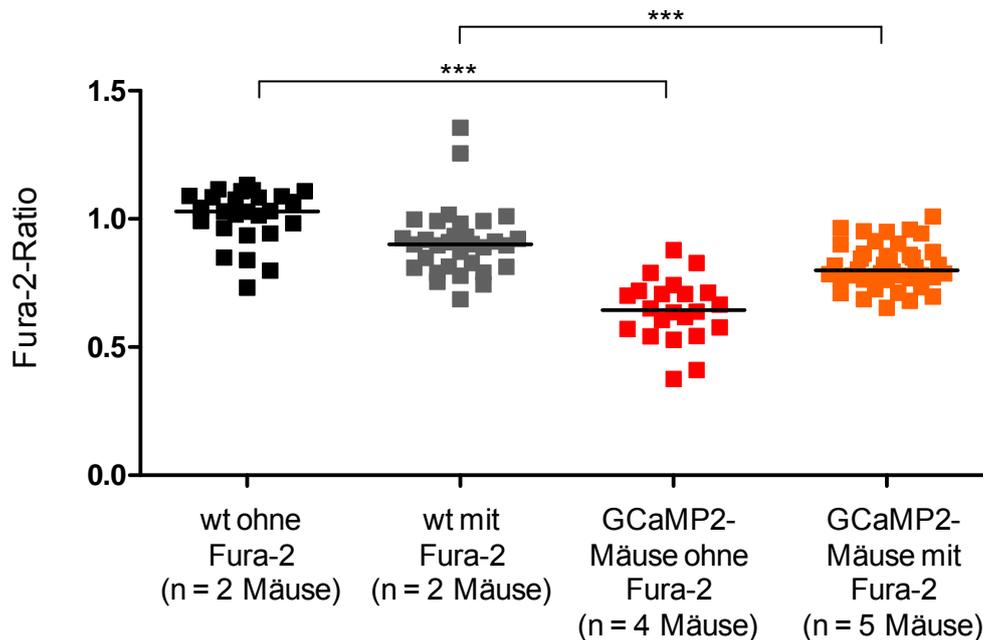


Abbildung 27: Fura-2-Ratio in Kardiomyozyten aus wt- und GCaMP2-Mäusen mit bzw. ohne Fura-2-Beladung unter Ruhebedingungen. Mediane; wt ohne Fura-2: n = 2 Mäuse, 26 Zellen; wt mit Fura-2: n = 2 Mäuse, 32 Zellen; GCaMP2-Mäuse ohne Fura-2: n = 4 Mäuse, 22 Zellen; GCaMP2-Mäuse mit Fura-2: n = 5 Mäuse, 42 Zellen.

Es konnte allerdings nicht nur eine Beeinflussung der Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 festgestellt werden, sondern es handelte sich um eine gegenseitige Beeinflussung, wie die Betrachtung der GCaMP2-Fluoreszenz zeigt.

Die Anwesenheit von Fura-2 quenchte in GCaMP2-Zellen die Fluoreszenz-Intensität des GCaMP2-Signals im Vergleich zu nicht mit Fura-2 beladenen GCaMP2-Zellen signifikant um 41,2 % ( $p = 0,0008$ ; GCaMP2-Mäuse ohne Fura-2: n = 4 Mäuse, 22 Zellen; GCaMP2-Mäuse mit Fura-2: n = 5 Mäuse, 42 Zellen) (siehe Abbildung 26). Eine Gruppe von Kardiomyozyten aus wt-Mäusen, die nicht mit Fura-2 beladen wurden, diente als Kontrolle, um das Hintergrundsignal bei Fura-2-Messungen sichtbar zu machen. Auch in Fura-2-unbeladenen Kardiomyozyten hatte GCaMP2 einen Einfluss auf das Fura-2-Hintergrundsignal. GCaMP2 veränderte die Wellenlängen derart (siehe Abbildung 26), dass in Fura-2-unbeladenen GCaMP2-Zellen die Ratio des Fura-2-Hintergrundsignals im Vergleich zu wt-Zellen signifikant um 39,2% erniedrigt war ( $p < 0,0001$ ; wt ohne Fura-2: n = 2 Mäuse, 26 Zellen; GCaMP2-Mäuse ohne Fura-2: n = 4 Mäuse, 22 Zellen) (siehe Abbildung 27).

### 4.2.3.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzsignale von der Stimulationsfrequenz

Während die oben vorgestellten Ergebnisse eine initiale Charakterisierung der beiden Fluoreszenzsensoren erlaubten, habe ich im Folgenden untersucht, inwieweit GCaMP2 im Vergleich zu Fura-2 trotz seiner langsameren Kinetik (s.o.) in der Lage war,  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen wiederzugeben. Hierzu wurden die Fluoreszenzsignale von unbeladenen bzw. mit Fura-2 beladenen wt- und GCaMP2-Ventrikelzellen bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen aufgezeichnet und analysiert.

Abbildung 28 zeigt exemplarisch die Fura-2-Ratio und das GCaMP2-Signal einer Ventrikelzelle in einem solchen Experiment.

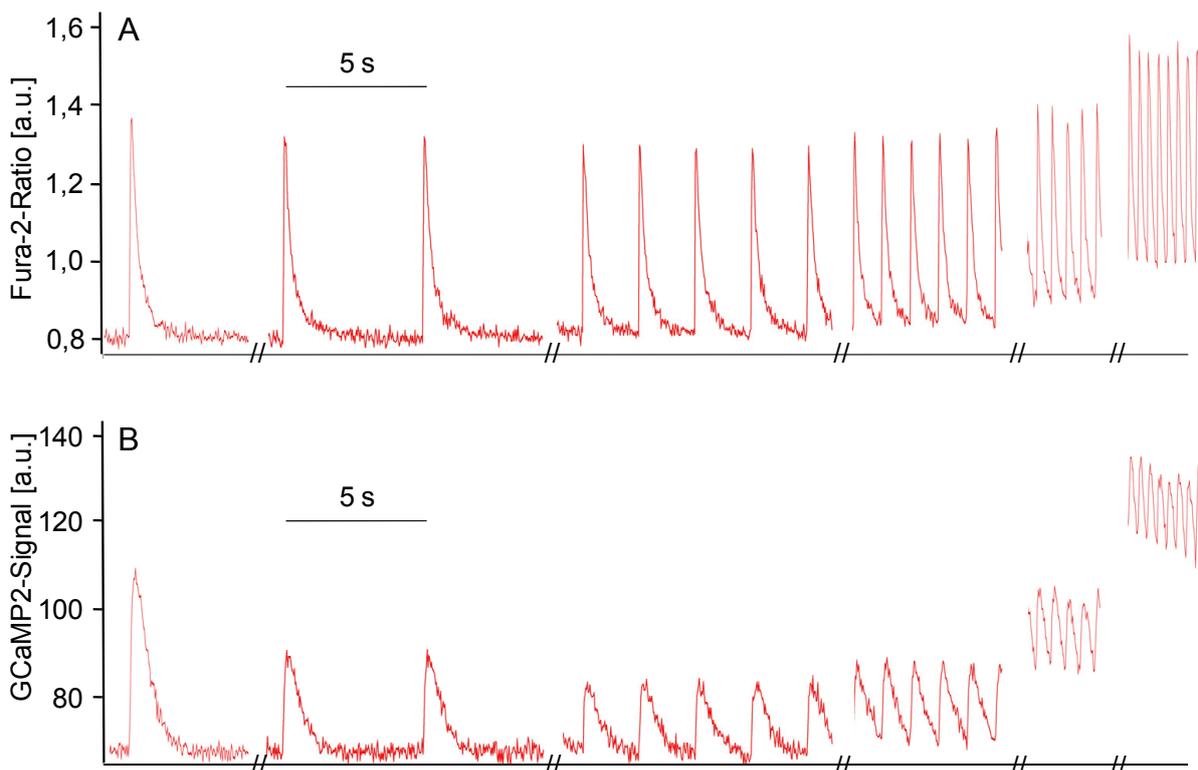


Abbildung 28: Exemplarischer Graph des Verlaufs der Fura-2-Ratio (A) bzw. des GCaMP2-Signals (B) einer Fura-2-beladenen Ventrikelzelle einer GCaMP2-Maus bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen entsprechend des in Abbildung 12 dargestellten Protokolls: einsetzende Stimulation von 0,2 Hz; 0,2 Hz; 0,5 Hz; 1 Hz; 2 Hz; 3 Hz.

Abbildung 29 fasst die Ergebnisse der Analyse dieser Experimentserie zusammen und zeigt, dass in Zellen, die GCaMP2 und Fura-2 parallel enthalten, eine negative, dann gleichbleibende Frequenz-Amplituden-Beziehung zu beobachten war, während Zellen mit jeweils nur einem der beiden Farbstoffe eine positive Frequenz-Amplituden-Beziehung aufwiesen. In Zellen, die nur Fura-2 enthielten, stieg die Amplitude der Fura-2-Ratio der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei 3 Hz gegenüber 0,2 Hz signifikant um 48,3 % an ( $p < 0,0001$  ; wt-Maus mit Fura-2:  $n = 2$  Mäuse, 32 Zellen), in Zellen, die nur GCaMP2 enthielten, war die Zunahme der Transientenamplitude des GCaMP2-Signals ebenfalls signifikant und betrug 118,9 % ( $p = 0,0004$ ; GCaMP2-Maus ohne Fura-2:  $n = 4$  Mäuse, 22 Zellen). Diese beiden Kurven der Zellen mit jeweils nur Fura-2 oder GCaMP2 unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Die Kurven der GCaMP2- und Fura-2-Signale von Zellen, die beide Farbstoffe enthielten, zeigten keine signifikante Unterschiede zueinander (GCaMP2-Maus mit Fura-2:  $n = 5$  Mäuse, 42 Zellen), unterschieden sich jedoch signifikant von den beiden Kurven der Zellen mit jeweils nur einem Farbstoff.

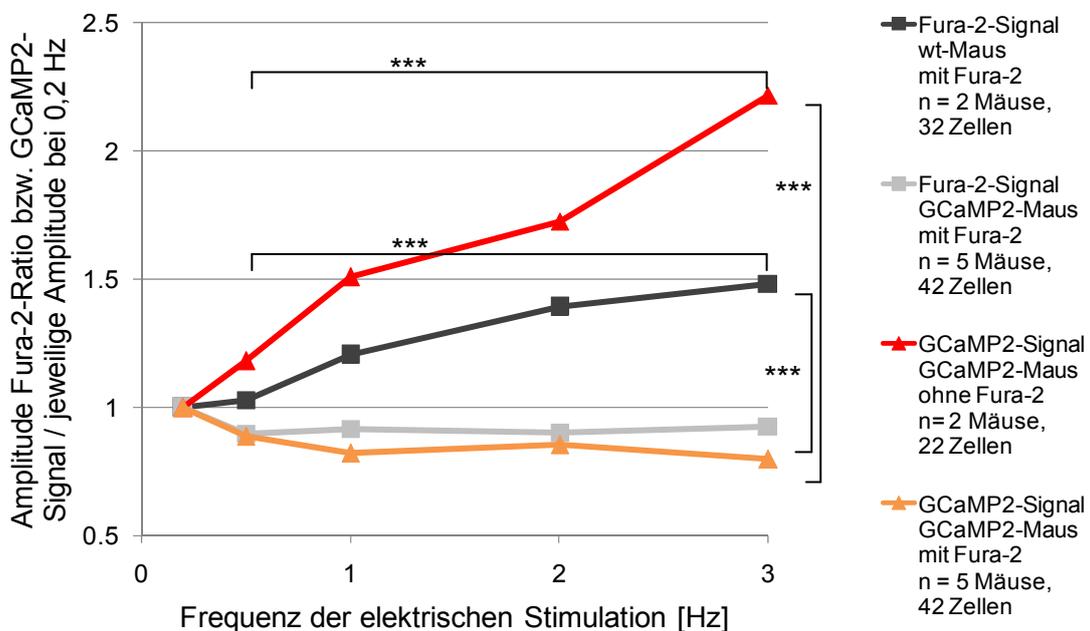


Abbildung 29: Relative Veränderung der Amplitude der Fura-2-Ratio bzw. des GCaMP2-Signals von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei elektrischer Stimulation mit verschiedenen Frequenzen, normiert auf 0,2 Hz, in Ventrikel-Kardiomyozyten aus Wildtypmäusen mit Fura-2-Beladung sowie GCaMP2-Mäusen mit und ohne Fura-2-Beladung; Mediane.

Tabelle 5: Überblick über Signifikanzen der Abbildung 29 zugrundeliegenden Messergebnisse.

		Fura-2-Signal wt-Maus mit Fura-2					Fura-2-Signal GCaMP2-Maus mit Fura-2					GCaMP2-Signal GCaMP2-Maus ohne Fura-2					GCaMP2-Signal GCaMP2-Maus mit Fura-2				
		0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz
Fura-2-Signal wt mit Fura-2	0.2 Hz		n.s.	**	***	***															
	0.5 Hz			***	***	***															
	1 Hz				***	***															
	2 Hz					***															
	3 Hz																				
Fura-2-Signal GCaMP2-Maus mit Fura-2	0.2 Hz						***	*	n.s.	n.s.											
	0.5 Hz	***							n.s.	n.s.											
	1 Hz		***							n.s.											
	2 Hz			***						*											
	3 Hz				***																
GCaMP2-Signal GCaMP2-Maus ohne Fura-2	0.2 Hz							***			*	**	***	***							
	0.5 Hz	n.s.										*	*	***							
	1 Hz		n.s.					***					*	***							
	2 Hz			n.s.					***					**							
	3 Hz				n.s.					***											
GCaMP2-Signal GCaMP2-Maus mit Fura-2	0.2 Hz														**	n.s.	n.s.	n.s.			
	0.5 Hz	**					n.s.				***					n.s.	n.s.	n.s.			
	1 Hz		***					n.s.				***				n.s.	n.s.				
	2 Hz			***					n.s.				***				*				
	3 Hz				***				n.s.					***							

### 4.3 Charakterisierung von Myozyten der Vorhöfe und des Ventrikels mit Indo-1

Kardiale Arrhythmien können unabhängig voneinander sowohl im Vorhof- als auch im Ventrikelgewebe entstehen. Welchen Einfluss die jeweilige  $Ca^{2+}$ -Homöostase und eventuelle Unregelmäßigkeiten auf die Entstehung oder Aufrechterhaltung der Arrhythmien haben und welche Unterschiede beim  $Ca^{2+}$ -Haushalt in Maus-Kardiomyozyten unterschiedlicher Herkunft existieren, ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Bei Rattenkardiomyozyten aus den Vorhöfen bzw. den Ventrikeln konnten Unterschiede in der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase aufgezeigt werden (Walden et al., 2009).

Da in zunehmendem Maße Mausmodelle genutzt werden, um Mechanismen von Herzerkrankungen zu untersuchen, ist es wichtig, das Verhalten von Ventrikelmyozyten sowie auch von Myozyten aus beiden Vorhöfen grundsätzlich zu charakterisieren. Daher habe ich vergleichende Experimente in Kardiomyozyten aus diesen drei Geweben in wt-Mäusen durchgeführt.

Hierfür entwickelte ich zwei Standardprotokolle, die eine genaue Charakterisierung des Calcium-Haushaltes in diesen Zellen erlaubte. Das eine der beiden Protokolle

bestand aus mehreren Messperioden, um elektrisch-induzierte Calcium-Transienten sowohl zu Beginn der Stimulation als auch unter Gleichgewichtsbedingungen bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen zu analysieren. Hiermit konnte ich die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowie das sogenannte Post-Rest-Verhalten (PRV) untersuchen.

Abbildung 30 zeigt den Verlauf der Indo-1-Ratio eines typischen Experiments mit diesem Protokoll in einer repräsentativen Ventrikelzelle.

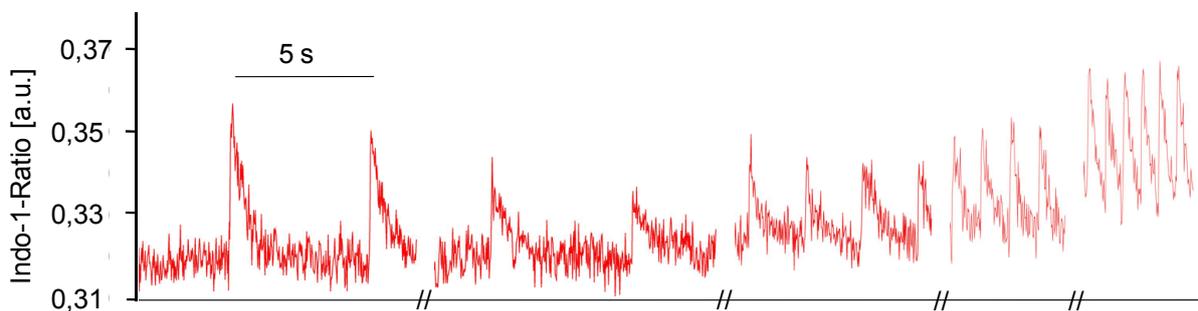


Abbildung 30: Exemplarischer Graph des Verlaufs der Indo-1-Ratio einer Indo-1-beladenen Ventrikelzelle bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen entsprechend des in Abbildung 8 dargestellten Protokolls: einsetzende Stimulation von 0,2 Hz; 0,2 Hz; 0,5 Hz; 1 Hz; 2 Hz.

Das zweite Protokoll erlaubte mir, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SRs sowie die zelluläre Aktivität des NCX und der SERCA-Pumpe zu bestimmen. Hierzu wurden kurze Koffeingaben (10 mM) appliziert.

Der typische Verlauf eines Experiment mit diesem Protokoll ist in Abbildung 37 dargestellt.

#### 4.3.1 Diastolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Ruhebedingungen

Die diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ , die im Zytosol der Kardiomyozyten unter Ruhebedingungen vorliegt, stellt die Ausgangsbasis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase dar. Wie Abbildung 31 zeigt, liegt der Wert der diastolischen Indo-1-Ratio in Ventrikelzellen bei 0,29 ( $n = 4$  Mäuse, 53 Zellen), in Zellen des rechten Vorhofs bei 0,31 ( $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen) und in Zellen des linken Vorhofs bei 0,30 ( $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen), wobei die Werte nicht signifikant voneinander abweichen.

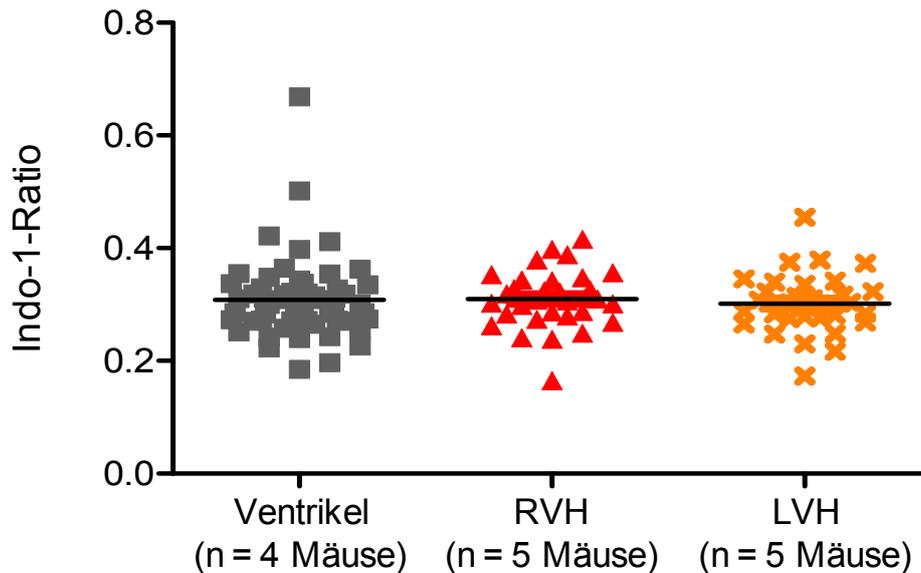


Abbildung 31: Indo-1-Ratio der diastolischen  $[Ca^{2+}]$  unter Ruhebedingungen in Zellen aus Ventrikel, rechtem und linkem Vorhof von wt-Mäusen. Mediane; Ventrikel: n = 4 Mäuse, 53 Zellen; RVH: n = 5 Mäuse, 31 Zellen; LVH: n = 5 Mäuse, 31 Zellen.

#### 4.3.2 Diastolische $Ca^{2+}$ -Konzentration bei verschiedenen elektrischen Stimulationsfrequenzen

Die zytosolische  $[Ca^{2+}]$  ist durch die Aktivität verschiedener Kanäle und anderer Transportmechanismen während Aktionspotenzialen und der damit verknüpften elektromechanischen Kopplung starken Veränderungen unterworfen. Diese Veränderungen müssen strikt kontrolliert und reguliert werden, um ein Gleichgewicht wiederherstellen zu können, das die nachfolgenden APs und Kontraktionen ermöglicht. Im Hinblick darauf habe ich die diastolische  $[Ca^{2+}]$  untersucht, wenn die Kardiomyozyten zeitlich aufeinanderfolgend mit verschiedenen Frequenzen elektrisch stimuliert werden.

Abbildung 32 fasst die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammen. Die auf die Stimulationsfrequenz 0,2 Hz normierten diastolischen Werte zeigten für alle Zelltypen eine positive Korrelation zur Stimulationsfrequenz.

Die diastolische  $[Ca^{2+}]$  stieg von 0,2 Hz bis 2 Hz signifikant um 4,0 % in Ventrikelzellen ( $p < 0,0001$ ; n = 4 Mäuse, 53 Zellen) an, in Zellen des linken Vorhofs

um 4,4 % ( $p < 0,0001$ ;  $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen) und in Zellen des rechten Vorhofs um 3,8 % ( $p < 0,0001$ ;  $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen).

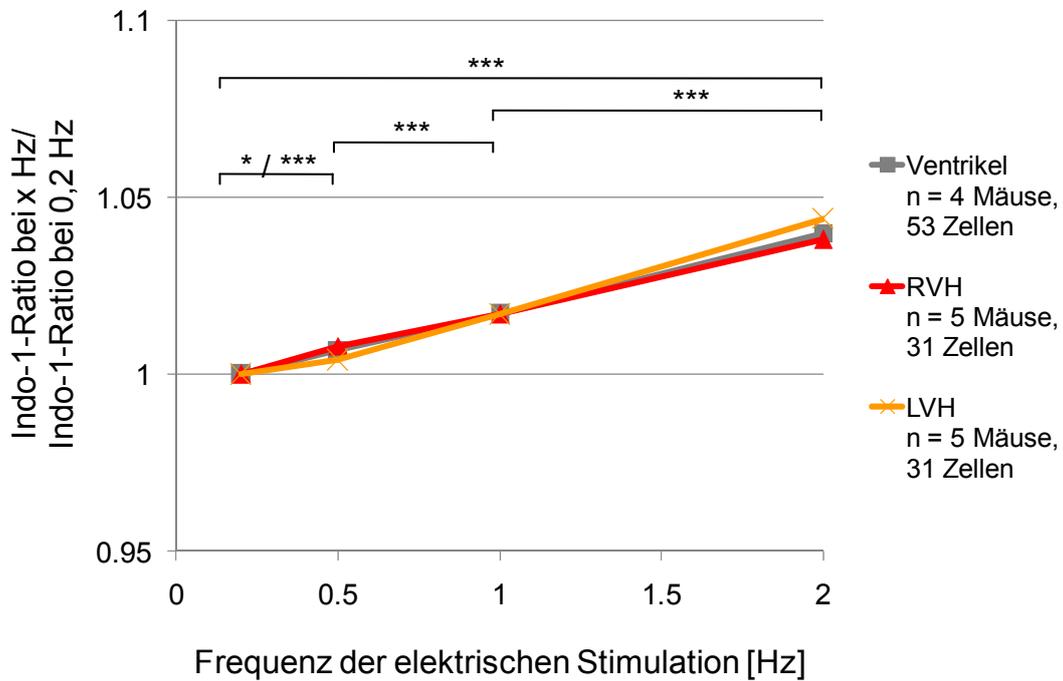


Abbildung 32: Beziehung zwischen normierter diastolischer Indo-1-Ratio und Stimulationsfrequenz; Mediane.

Tabelle 6: Überblick über Signifikanzen der Abbildung 32 zugrundeliegenden Messergebnisse.

	Ventrikel				Rechter Vorhof				Linker Vorhof			
	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz
Ventr 0.2 Hz		***	***	***								
Ventr 0.5 Hz			***	***								
Ventr 1 Hz				***								
Ventr 2 Hz												
RVH 0.2 Hz						***	***	***				
RVH 0.5 Hz		n.s.					***	***				
RVH 1 Hz			n.s.					***				
RVH 2 Hz				n.s.								
LVH 0.2 Hz										*	***	***
LVH 0.5 Hz		n.s.				*					***	***
LVH 1 Hz			n.s.				n.s.					***
LVH 2 Hz				n.s.				n.s.				

### 4.3.3 Frequenzabhängigkeit von $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Mausmyozyten

Bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist es bei steigenden Stimulationsfrequenzen bislang noch hinreichend geklärt, ob und welche Unterschiede zwischen Kardiomyozyten unterschiedlichen Ursprungs existieren. Daher habe ich im Folgenden die Effekte von unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen auf die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten analysiert.

Die Auswirkungen von steigenden Frequenzen auf die Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sind im Folgenden dargestellt und in Abbildung 33 zusammengefasst. Die Frequenz-Amplituden-Beziehung unterscheidet sich in Ventrikelzellen deutlich von Vorhofzellen. In Ventrikelzellen war als Trend eine positive, in Vorhofzellen eine negative Frequenz-Amplituden-Beziehung zu beobachten.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude war im Ventrikel ab 1 Hz signifikant erhöht gegenüber dem Ausgangswert bei 0,2 Hz und erreicht bei 2 Hz eine Zunahme von insgesamt 16,1 % gegenüber dem Ausgangswert bei 0,2 Hz ( $p < 0,0001$ ;  $n = 4$  Mäuse, 53 Zellen).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude im rechten Vorhof ist ab 0,5 Hz signifikant verkleinert gegenüber 0,2 Hz und erreicht bei 2 Hz eine Gesamtabnahme von 15,1% ( $p = 0,0002$ ;  $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen), während beim linken Vorhof erst bei 2 Hz eine signifikante Abnahme gegenüber der Amplitude bei 0,2 Hz beobachtet werden kann, die bei 11,3% liegt ( $p = 0,0075$ ;  $n = 5$  Mäuse, 31 Zellen).

Die Veränderungen der beiden Vorhöfe unterscheiden sich bei keiner Frequenz signifikant voneinander, während sich der Ventrikel mit Ausnahme bei der Frequenz von 0,5 Hz von beiden Vorhöfen signifikant unterscheidet.

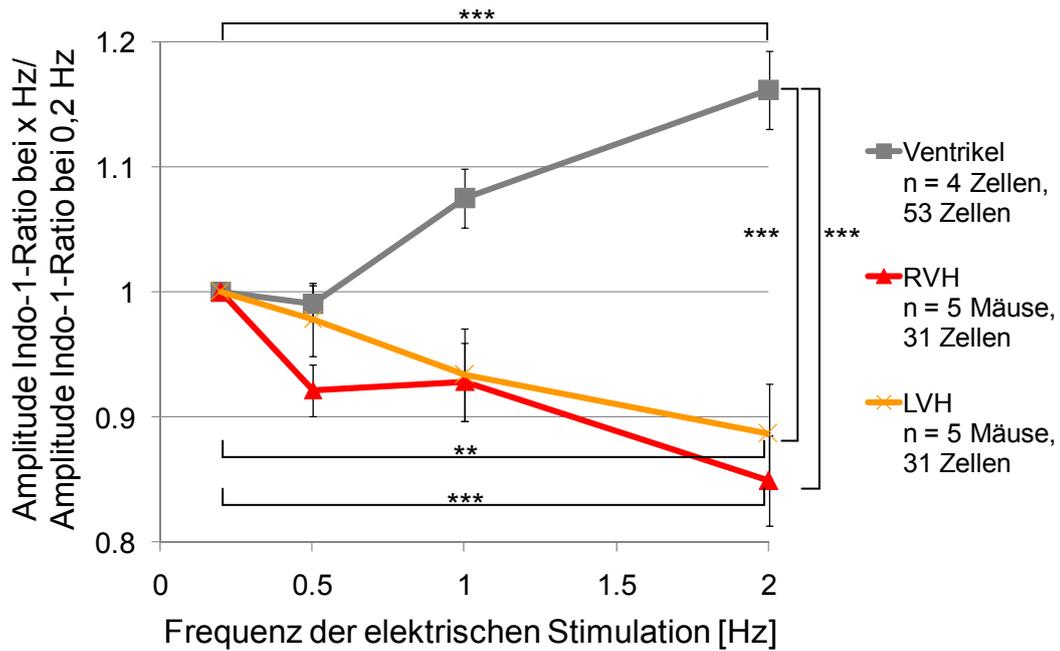


Abbildung 33: Relative Veränderung der Indo-1-Ratio der Amplitude von  $Ca^{2+}$ -Transienten bei steigender elektrischer Stimulationsfrequenz, bezogen auf die Indo-1-Ratio bei 0,2 Hz; Mittelwerte +/- SEM.

Tabelle 7: Übersicht über Signifikanzen der Abbildung 33 zugrundeliegenden Messergebnisse.

	Ventrikel				Rechter Vorhof				Linker Vorhof			
	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz	0.2 Hz	0.5 Hz	1 Hz	2 Hz
Ventr 0.2 Hz		n.s.	**	***								
Ventr 0.5 Hz			***	***								
Ventr 1 Hz				***								
Ventr 2 Hz												
RVH 0.2 Hz						***	*	***				
RVH 0.5 Hz		**					n.s.	**				
RVH 1 Hz			***					***				
RVH 2 Hz				***								
LVH 0.2 Hz										n.s.	n.s.	**
LVH 0.5 Hz		n.s.				n.s.					*	***
LVH 1 Hz			**				n.s.					**
LVH 2 Hz				***				n.s.				

#### 4.3.4 Effekt von Ruheperioden und Post Rest Verhalten

Eine weitere Charakterisierung von Kardiomyozyten ist möglich anhand des Füllverhaltens des SRs und einer Nettoaufnahme oder eines Nettoverlusts von  $Ca^{2+}$  des SRs bzw. der Zelle. Um dies zu untersuchen, habe ich das Post Rest Verhalten der verschiedenen Kardiomyozytentypen sowie deren diastolische  $[Ca^{2+}]$  während

der Ruhephase und der Gleichgewichts-Periode der einsetzenden elektrischen Stimulation ermittelt.

#### 4.3.4.1 Diastolische $[Ca^{2+}]$ unter Ruhe- und Gleichgewichtsbedingungen

Zunächst habe ich die diastolische  $[Ca^{2+}]$  von elektrisch induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten analysiert und mit der diastolischen  $[Ca^{2+}]$  unter Ruhebedingungen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

Vergleicht man die Werte der Indo-1-Ratio für die basale  $[Ca^{2+}]$  unter Ruhebedingungen mit Indo-1-Ratio der diastolischen  $[Ca^{2+}]$  unter Gleichgewichtsbedingungen der elektrischen Stimulation mit 0,2 Hz, waren kaum Unterschiede erkennbar. Die Werte der diastolischen  $[Ca^{2+}]$  waren bei allen drei Zelltypen unter Ruhebedingungen geringfügig kleiner als unter Gleichgewichtsbedingungen bei 0,2 Hz (Ventrikel: 0,4 %, n = 4 Mäuse, 53 Zellen; Rechter Vorhof: 0,3%, n = 5 Mäuse, 31 Zellen; Linker Vorhof: 0,25 %, n = 5 Mäuse, 31 Zellen) und unterschieden sich zwischen den Zellen verschiedenen Ursprungs nicht signifikant.

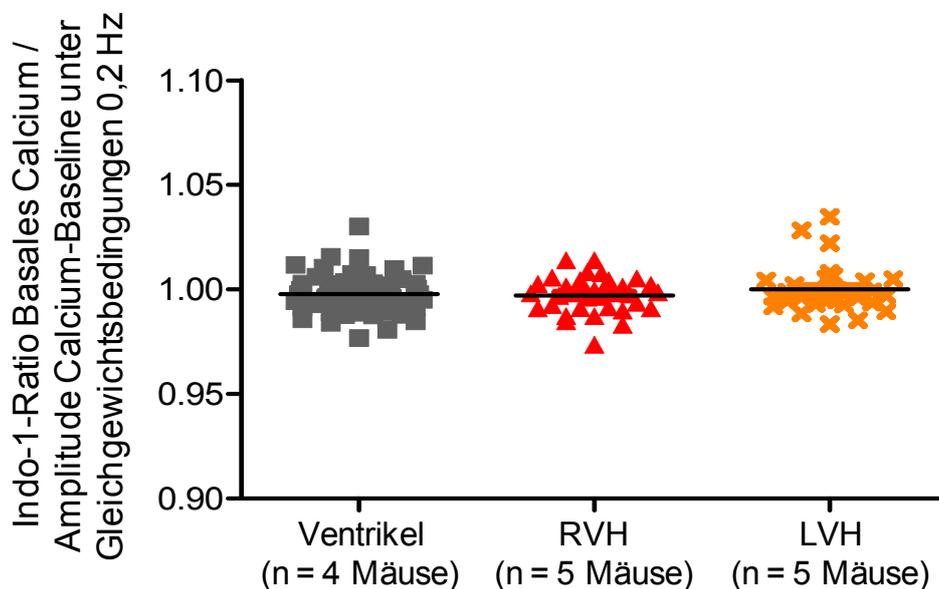


Abbildung 34: Indo-1-Ratio der basalen  $[Ca^{2+}]$  unter Ruhebedingungen gegenüber der Indo-1-Ratio der basalen  $[Ca^{2+}]$  unter Gleichgewichtsbedingungen nach Einsetzen elektrischer Stimulationen mit einer Frequenz von 0,2 Hz. Mediane; Ventrikel: n = 4 Mäuse, 53 Zellen; RVH: n = 5 Mäuse, 31; LVH: n = 5 Mäuse, 31 Zellen.

#### 4.3.4.2 Amplitude der ersten $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente nach Ruhephase

Zur Berechnung des Post Rest Verhaltens sind die Amplituden der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach einsetzender elektrischer Stimulation und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Gleichgewichtsbedingungen notwendig.

Die Ergebnisse der Analyse der ersten Transienten nach der Ruhephase sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Amplitude nach einsetzender elektrischer Stimulation betrug in Ventrikelzellen 0,06 (n = 4 Mäuse, 53 Zellen), in Zellen des rechten Vorhofs 0,06 (n = 5 Mäuse, 31 Zellen) und in Zellen des linken Vorhofs 0,07 (n = 5 Mäuse, 31 Zellen). Die Unterschiede zwischen den drei Kardiomyozytentypen waren statistisch nicht signifikant.

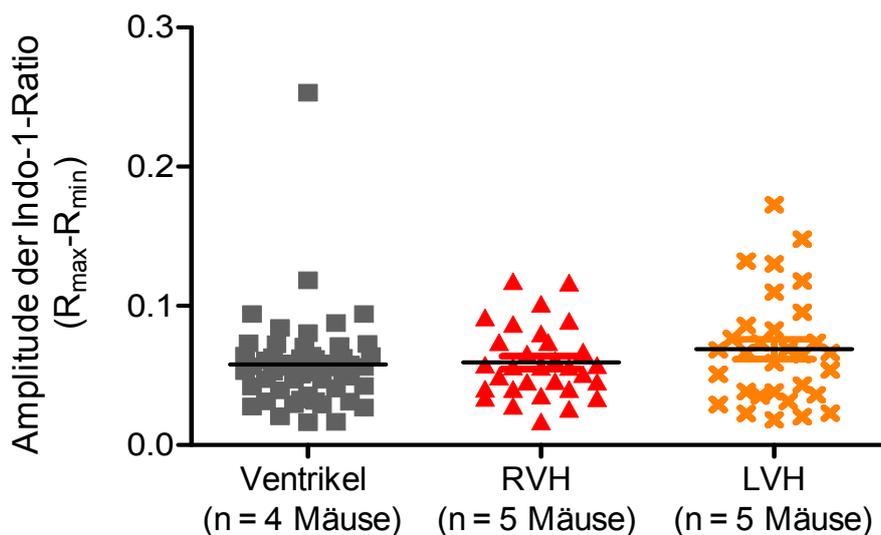


Abbildung 35: Indo-1-Ratio der absoluten Amplitude der 1.  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente bei einsetzender elektrischer Stimulation von 0,2 Hz nach einer Ruhephase. Mediane; Ventrikel: n = 4 Mäuse, 53 Zellen; RVH: n = 5 Mäuse, 31 Zellen; LVH: n = 5 Mäuse, 31 Zellen.

#### 4.3.4.3 Post Rest Verhalten

Mit Hilfe der Amplitude der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach einsetzender elektrischer Stimulation und der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter

Gleichgewichtsbedingungen habe ich das Post Rest Verhalten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 zusammengefasst.

Sowohl Ventrikel- als auch Vorhofkardiomyozyten zeigten ein Post Rest Potentiation, wobei es in Ventrikelzellen deutlich stärker ausgeprägt war. In Ventrikelzellen war die erste Amplitude nach der Ruhephase durchschnittlich um 69,7% gegenüber den Amplituden im Gleichgewicht erhöht (n = 4 Mäuse, 53 Zellen), in rechten Vorhofzellen um 13,5% (n = 5 Mäuse, 31 Zellen) und in linken Vorhofzellen um 21,3% (n = 5 Mäuse, 31 Zellen). Die Werte der Vorhofzellen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, wichen jedoch höchst signifikant von den in Ventrikelzellen ermittelten Werten ab (p < 0,0001 für rechte Vorhofzellen bzw. p < 0,0001 für linke Vorhofzellen).

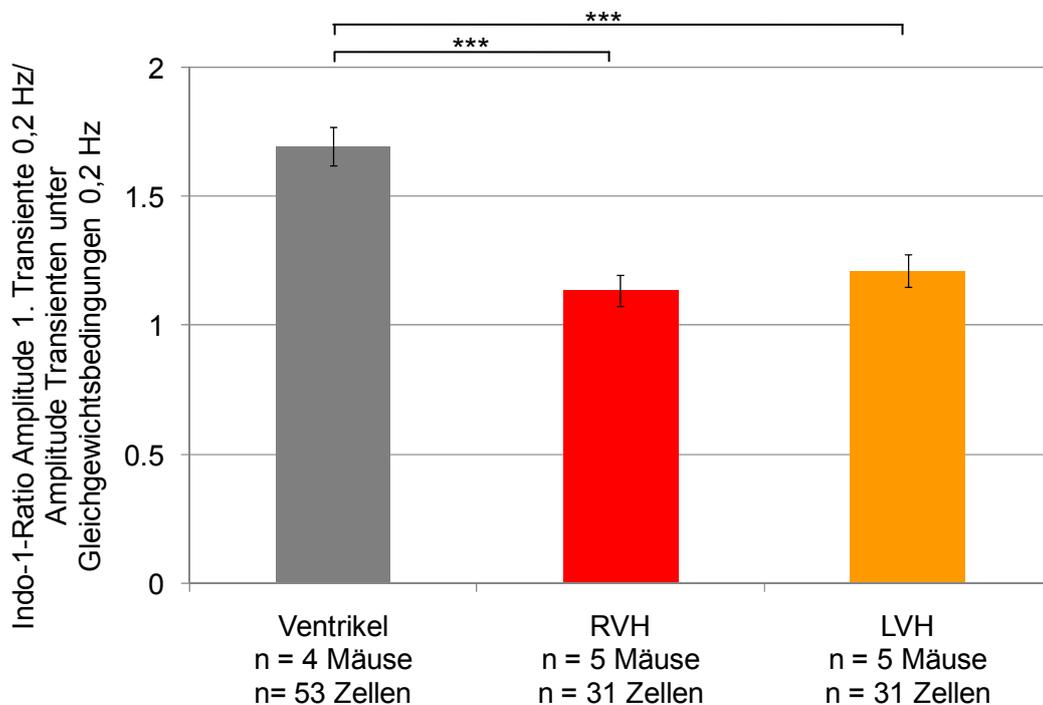


Abbildung 36: Post Rest Potentiation: Prozentuale Erhöhung der Indo-1-Ratio der 1.  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente von Kardiomyozyten nach einer Ruhephase von 5 min gegenüber der Amplitudenhöhe unter Gleichgewichts-Bedingungen bei 0,2 Hz; Mittelwerte + SEM.

Zusammenfassend zeigen diese Versuchsreihen, dass sich die Amplituden der jeweils ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach einsetzender elektrischer Stimulation der drei Kardiomyozytentypen nicht signifikant voneinander unterscheiden, sich jedoch in Ventrikelzellen ein signifikant erhöhtes Post Rest Potentiation beobachten lässt.

### 4.3.5 SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt, NCX und SERCA-Pumpe

Ein erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Gehalt im SR von Kardiomyozyten wurde in der Vergangenheit mit Ca<sup>2+</sup>-Wellen und Extratransienten in diesen Zellen in Verbindung gebracht (Eisner et al., 2009). Da solche Ereignisse zu Arrhythmien führen können (Eisner et al., 2009), habe ich als weitere Aspekte im Rahmen einer Grundcharakterisierung der drei Kardiomyozytentypen im Folgenden den Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR sowie die Aktivität des NCX und der SERCA-Pumpe untersucht.

Um diese drei Parameter in Ventrikel- und Vorhofzellen zu untersuchen, habe ich die Zellen mit kurzen Gaben von 10 mM Koffein perfundiert. Die dadurch ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Transiente erlaubt es, anhand ihrer Amplitude Rückschlüsse auf den SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt zu ziehen und durch die Zeitkonstanten der Abnahme des Fluoreszenzsignals während und nach Koffeinapplikation Aussagen über die Aktivität des NCX und der SERCA-Pumpe zu treffen. Diese Experimente erfolgten zum einen unter Ruhebedingungen, zum anderen unter Bedingungen, die Gleichgewichtsbedingungen möglichst nahe kamen. Um letzteres zu erreichen, wurde die elektrische Stimulation kurz vor Zugabe des Koffeins abgebrochen, um sie nach Wiederherstellung der ursprünglichen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wieder aufzunehmen.

Abbildung 37 zeigt den Verlauf der Indo-1-Ratio eines typischen Experiments mit Koffeinapplikation in einer repräsentativen Ventrikelzelle.

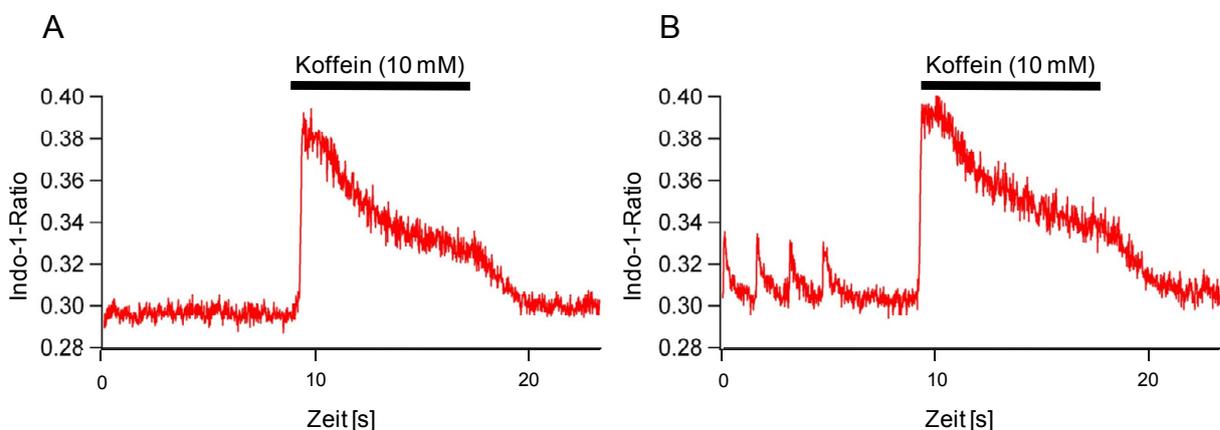


Abbildung 37: Exemplarische Rohdaten der Indo-1-Ratio einer mit Indo-1 beladenen Ventrikelzelle, die einer Applikation mit 10 mM Koffein ausgesetzt wird, unter Ruhebedingungen (A) bzw. unter Gleichgewichtsbedingungen bei elektrischer Stimulation von 0,5 Hz (B).

### 4.3.5.1 Amplitude von Koffein-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Die Ergebnisse der Analyse der Amplituden der Indo-1-Ratio von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die durch 10 mM Koffein ausgelöst wurden, sind in Abbildung 38 zusammengefasst. Sowohl unter Ruhe- als auch unter Gleichgewichts-Bedingungen ( $n = 4$  Mäuse, 60 Zellen bzw.  $n = 4$  Mäuse, 51 Zellen) war die Amplitude in Ventrikelzellen signifikant geringer als in Vorhofzellen (Ventrikel vs. rechter Vorhof, Ruhe bzw. Gleichgewicht jeweils  $p < 0,0001$ ; Ventrikel vs. linker Vorhof, Ruhe bzw. Gleichgewicht jeweils  $p < 0,0001$ ). Die Amplituden des rechten Vorhofs unter Ruhebedingungen bzw. unter Gleichgewichts-Bedingungen ( $n = 3$  Mäuse, 48 Zellen bzw.  $n = 3$  Mäuse, 25 Zellen) unterschieden sich nicht signifikant von denen des linken Vorhofs ( $n = 5$  Mäuse, 30 Zellen bzw.  $n = 3$  Mäuse, 17 Zellen). Beim Vergleich der Amplituden unter Ruhe- bzw. Gleichgewichts-Bedingungen innerhalb eines Zelltyps fand sich nur bei Zellen des rechten Vorhofs ein signifikanter Unterschied; hier war die Amplitude in Ruhe mit signifikant erniedrigt gegenüber der Amplitude bei elektrischer Stimulation ( $p = 0,0284$ ).

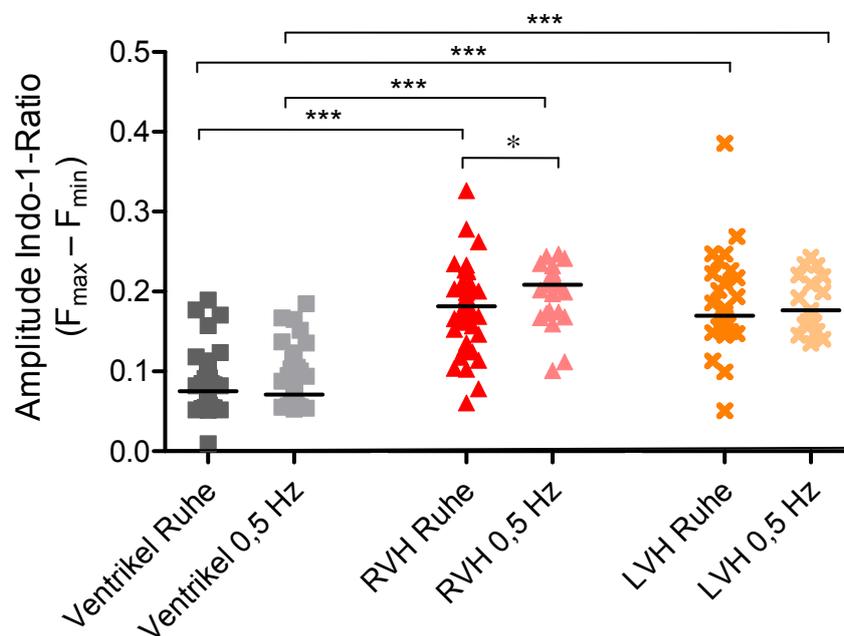


Abbildung 38: Amplitude der Indo-1-Ratio von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die durch 10 mM Koffein induziert wurden, unter Ruhe- und Gleichgewichts-Bedingungen bei 0,5 Hz. Mediane; Ventrikel Ruhe:  $n = 4$  Mäuse, 60 Zellen; Ventrikel 0,5 Hz:  $n = 4$  Mäuse, 51 Zellen; RVH Ruhe:  $n = 3$  Mäuse, 48 Zellen; RVH 0,5 Hz:  $n = 3$  Mäuse, 25 Zellen; LVH Ruhe:  $n = 5$  Mäuse, 30 Zellen; LVH 0,5 Hz:  $n = 3$  Mäuse, 17 Zellen.

### 4.3.5.2 Zelluläre NCX-Aktivität

Die Ergebnisse der Analyse der Zeitkonstanten tau 1 während der Koffeinapplikation, die die zelluläre NCX-Aktivität repräsentiert, sind in Abbildung 39 zusammengefasst. Innerhalb der Zelltypen existierte kein signifikanter Unterschied zwischen Ruhe- und Gleichgewichts-Bedingungen.

Beim Vergleich der Zelltypen untereinander fiel auf, dass tau 1 in Zellen des rechten Vorhofs unter Ruhebedingungen mit 204,5 ms (n = 3 Mäuse, 40 Zellen) signifikant erhöht war gegenüber den Werten der Ventrikelzellen mit 163,1 ms (p = 0,041; n = 4 Mäuse, 52 Zellen) und der Zellen des linken Vorhofs mit 162,6 ms (p = 0,0309; n = 5 Mäuse, 29 Zellen). Linke Vorhofzellen und Ventrikelzellen zeigten bezüglich tau 1 keinen signifikanten Unterschied.

Unter Gleichgewichts-Bedingungen war tau 1 der Zellen des rechten Vorhofs mit 209,6 ms (n = 3 Mäuse, 21 Zellen) signifikant erhöht gegenüber tau 1 der Ventrikelzellen, die ein tau 1 von 152,5 ms aufwiesen (p = 0,0076; n = 4 Mäuse, 45 Zellen). Zwischen Ventrikel und linkem Vorhof (tau 1 = 180,0 ms; n = 3 Mäuse, 16 Zellen) sowie zwischen rechtem und linkem Vorhof gab es keinen signifikanten Unterschied.

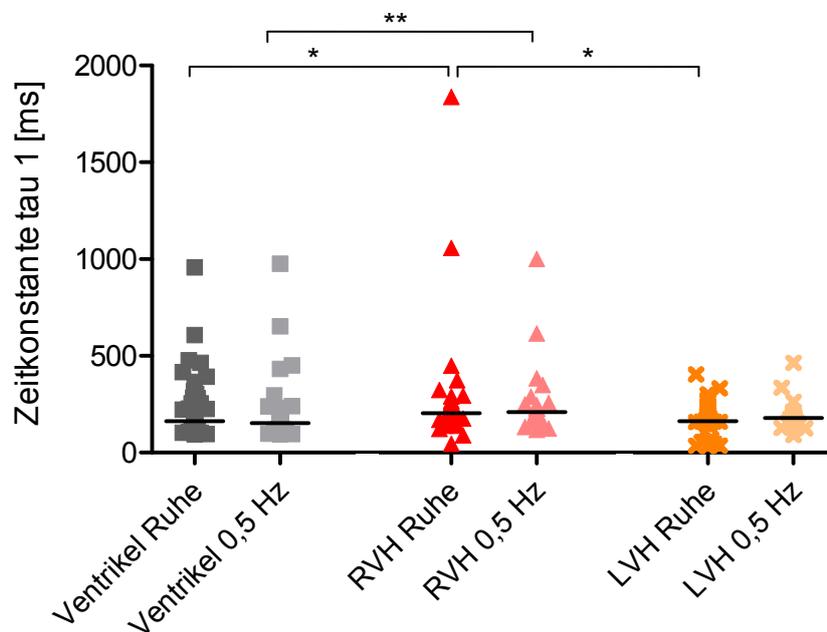


Abbildung 39: Zeitkonstante tau 1 der Abnahme der Indo-1-Ratio von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die durch 10 mM Koffein induziert wurden, unter Ruhe- und Gleichgewichts-Bedingungen bei 0,5 Hz. Mediane; Ventrikel Ruhe: n = 4 Mäuse, 52 Zellen; Ventrikel 0,5 Hz: n = 4 Mäuse, 45 Zellen; RVH Ruhe: n = 3 Mäuse, 40 Zellen; RVH 0,5 Hz: n = 3 Mäuse, 21 Zellen; LVH Ruhe: n = 5 Mäuse, 29 Zellen; LVH 0,5 Hz: n = 3 Mäuse, 16 Zellen.

### 4.3.5.3 Kombinierte NCX und SERCA-Aktivität

Die Ergebnisse der Analyse der Zeitkonstanten tau 2 nach dem Ende der Koffeinapplikation, die die kombinierte zelluläre NCX- und SERCA-Aktivität repräsentiert, sind in Abbildung 40 zusammengefasst.

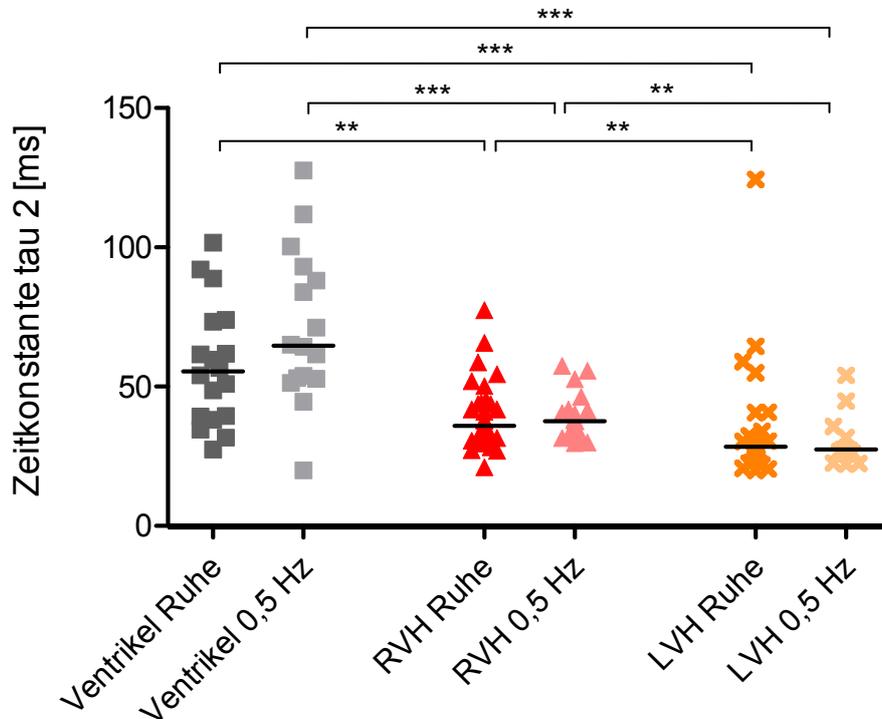


Abbildung 40: Zeitkonstante tau 2 der Abnahme der Indo-1-Ratio bei durch 10 mM Koffein induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Kardiomyozyten von in wt-Mäusen. Mediane; Ventrikel Ruhe: n = 4 Mäuse, 18 Zellen; Ventrikel 0,5 Hz: n = 4 Mäuse, 16 Zellen; RVH Ruhe: n = 3 Mäuse, 34 Zellen; RVH 0,5 Hz: n = 3 Mäuse, 19 Zellen; LVH Ruhe: n = 4 Mäuse, 24 Zellen; LVH 0,5 Hz: n = 3 Mäuse, 13 Zellen.

Bei der Zeitkonstante tau 2 nach dem Ende der Koffeinzugabe waren wie bei tau 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen Ruhe- und Gleichgewichts-Bedingungen innerhalb der einzelnen Zelltypen zu erkennen.

Zwischen den einzelnen Zelltypen waren sowohl unter Ruhe- als auch unter Gleichgewichts-Bedingungen deutliche Unterschiede vorhanden. Die Zeitkonstanten in Ventrikelzellen lagen bei 55,38 ms unter Ruhebedingungen (n = 4 Mäuse, 18 Zellen) sowie bei 64,7 ms unter Gleichgewichts-Bedingungen (n = 4 Mäuse, 16 Zellen) und waren signifikant größer als die tau 2-Werte in Zellen des rechten Vorhofs, der ein tau 2 in Höhe von 35,94 ms ( $p = 0,0019$ ; n = 3 Mäuse, 34 Zellen) bzw. 37,52 ms ( $p < 0,0001$ ; n = 3 Mäuse, 19 Zellen) aufwies, und die des linken Vorhofs, dessen tau 2 bei 28,46 ms ( $p = 0,0002$ ; n = 4 Mäuse, 24 Zellen) bzw.

27,39 ms ( $p = 0,0002$ ;  $n = 3$  Mäuse, 13 Zellen) lag. Die tau 2-Werte des linken Vorhofs waren gegenüber denen des rechten Vorhofs signifikant kleiner ( $p = 0,0053$  und  $0,0024$ ).

#### 4.3.5.4 Fraktionale $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Anhand der Amplitude einer elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente, die durch Koffein ausgelöst wird, ist es möglich, zu berechnen, welcher Anteil des im SR enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  im Rahmen einer elektrisch induzierten Transiente freigesetzt wird.

Um zu ermitteln, ob diese fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sich in den verschiedenen Zelltypen unterscheidet und unter Gleichgewichts-Bedingungen anders ist als die direkt im Anschluss an eine Ruhephase, habe ich die elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden der ersten Transienten nach Ruhe aus Abbildung 35 und die Transienten unter Gleichgewichts-Bedingungen, die der Berechnung für Abbildung 33 zugrunde liegen, sowie die Amplituden aus den Koffeinexperimenten aus Abbildung 38 herangezogen.

Tabelle 8: Ausgangswerte und Ergebnis der Berechnung der fraktionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung während der 1. elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente nach Ruhebedingungen und unter Gleichgewichts-Bedingungen bei 0,5 Hz.

	Indo-1- Amplitude 1. Post Rest- Transiente	Indo-1- Amplitude Steadystate 0,5 Hz	Indo-1- Amplitude Koffein Rest	Indo-1- Amplitude Koffein 0,5 Hz	Fraktionale $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung 1. Amplitude [%]	Fraktionale $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung 0,5 Hz [%]
Ventrikel	0.0559	0.0230	0.0753	0.0710	74.24	32.39
RVH	0.0562	0.0374	0.1816	0.2086	30.95	17.93
LVH	0.0663	0.0478	0.1697	0.1766	39.07	27.07

Wie Tabelle 8 zeigt, beträgt die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente in Ventrikelzellen 74,2 % und im Gleichgewicht 32,4 % und ist damit jeweils deutlich erhöht gegenüber der fraktionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Vorhofzellen. Bei den Vorhofzellen besitzt der linke Vorhof mit 39,1 % bei der ersten Transiente und 27,1 % im Gleichgewicht eine höhere fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung als der rechte Vorhof mit 31,0 % und 17,9 %. Allen drei Zelltypen gemeinsam ist, dass der bei

Transienten freigesetzte Anteil des im SR enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$  bei der ersten Transiente nach einer Ruhephase deutlich höher ist als unter Gleichgewichts-Bedingungen.

#### ***4.4 Endothelin-1-abhängige Veränderung der Calcium-Homöostase in Mauskardiomyozyten***

Für ET-1 wurde gezeigt, dass es bei akuter Zugabe zu Herzzellen verschiedener Spezies Extratransienten und eine Erhöhung der Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bewirkt. Da die vorhergehenden Ergebnisse meiner Arbeit aufzeigen, dass es bei der Grundcharakterisierung von Kardiomyozyten aus Ventrikel, rechtem und linkem Vorhof bei verschiedenen Parametern signifikante Unterschiede gibt, habe ich im Folgenden beleuchtet, ob die chronische Gabe von ET-1 unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen Kardiomyozytentypen hat.

Daher habe ich die Amplitude von elektrisch stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Kardiomyozyten von wt-Mäusen, die 2 Wochen lang chronisch eine ET-1- bzw. als Kontrolle eine NaCl-Lösung verabreicht bekamen, untersucht. Die Kardiomyozyten wurden während der Experimente akut 100 nM ET-1 bzw. einer NaCl-Lösung ausgesetzt, um auch mögliche Unterschiede in der Reaktion auf akute ET-1-Gabe zu untersuchen. Zur Überprüfung der Reaktionsfähigkeit und der Viabilität der Zellen wurde im Anschluss an die akute ET-1-Gabe 1  $\mu\text{M}$  Isoproterenol zugesetzt, das über eine  $\beta$ 1-Stimulation eine Amplitudenerhöhung bewirkt.

##### **4.4.1 Relative Veränderung der Amplitude bei Endothelin-1-Applikation**

Die Veränderungen in der Indo-1-Ratio der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten der verschiedenen Kardiomyozytengruppen als Reaktion auf eine akute ET-1-Gabe oder die Zugabe einer NaCl-Lösung sind als Übersicht in Abbildung 41 zusammengefasst. Alle Zellen, die mit ET-1 perfundiert wurden, haben auf die anschließende  $\beta$ 1-adrenerge Stimulation durch Isoproterenol positiv reagiert und wurden als reaktionsfähig eingestuft.

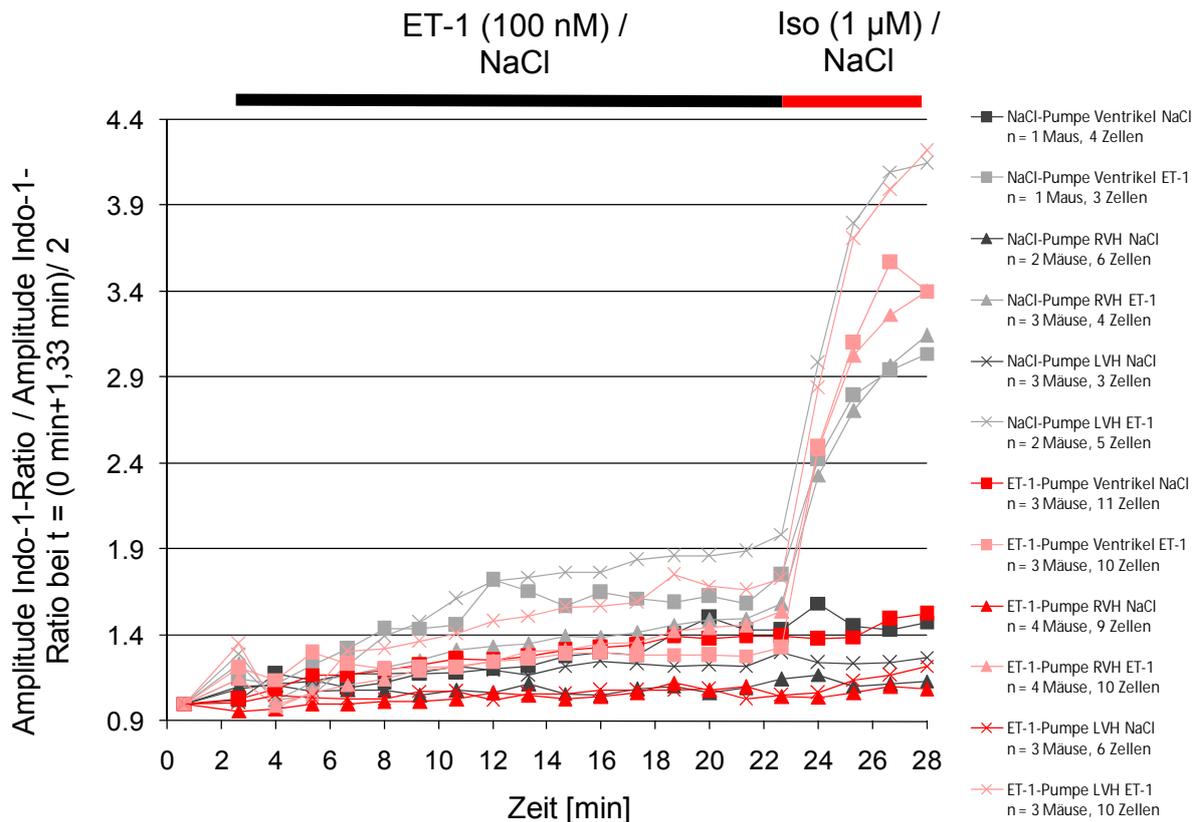


Abbildung 41: Veränderung der Indo-1-Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei elektrischer Stimulation von 0,5 Hz nach Zugabe von 100 nM ET-1 mit anschließender 1  $\mu\text{M}$  Isoproterenol-Gabe bzw. NaCl-Lösung bezogen auf den Mittelwert der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei  $t = 0$  und  $t = 1,33$  min. Die Kardiomyozyten stammen aus wt-Mäusen mit bzw. ohne osmotische Minipumpe und sind mit Indo-1 beladen. Akute ET-1-Zugabe bei  $t = 2,5$  min, Isoproterenol-Zugabe bei  $t = 21,5$  min. Mittelwerte (zur Übersichtlichkeit ohne SEM). Vierecke: Ventrikelzellen; Dreiecke: Zellen aus rechtem Vorhof; Kreuze: Zellen aus linkem Vorhof; graue Symbole: NaCl-Pumpe; rote Symbole: ET-1-Pumpe; dunklere Farben: akute Perfusion mit NaCl-Lösung; hellere Farben: akute Perfusion mit ET-1-Lösung.

Zur genaueren Betrachtung der Veränderungen in der Amplitude der Indo-1-Ratio von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurde der Mittelwert zu den Zeitpunkten  $t = 14,7$  min, 16 min und 17,3 min ausgewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 dargestellt.

Bei den Mäusen, die eine Pumpe mit einer 0,9%-igen NaCl-Lösung trugen, haben die Amplituden der drei Kardiomyozytentypen unter dem ET-1-Einfluss stärker zugenommen als bei Perfusion mit der NaCl-Kontrolllösung, wobei dies bei den Ventrikelzellen noch nicht signifikant war. In Ventrikelzellen stieg die Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplitude unter ET-1-Einfluss von 28,4 % auf 61,1 % an. In den Zellen des rechten Vorhofs war eine signifikante Zunahme von 6,4 % auf 39,7 % zu

beobachten ( $p = 0,022$ ), in den Zellen des linken Vorhofs nahm die Amplitude signifikant von 23,2 % auf 79,2 % zu ( $p = 0,0382$ ).

Bei Mäusen, deren Pumpe die ET-1-Lösung enthielt, nahmen unter akutem ET-1-Einfluss nur die Amplituden der Vorhofszellen zu. Die Zunahme in Zellen der rechten Vorhofszellen von 4,5 % auf 33,9 % war hierbei nicht signifikant, die der linken Vorhofszellen von 7,2 % auf 57,2 % jedoch einfach signifikant ( $p = 0,0211$ ).

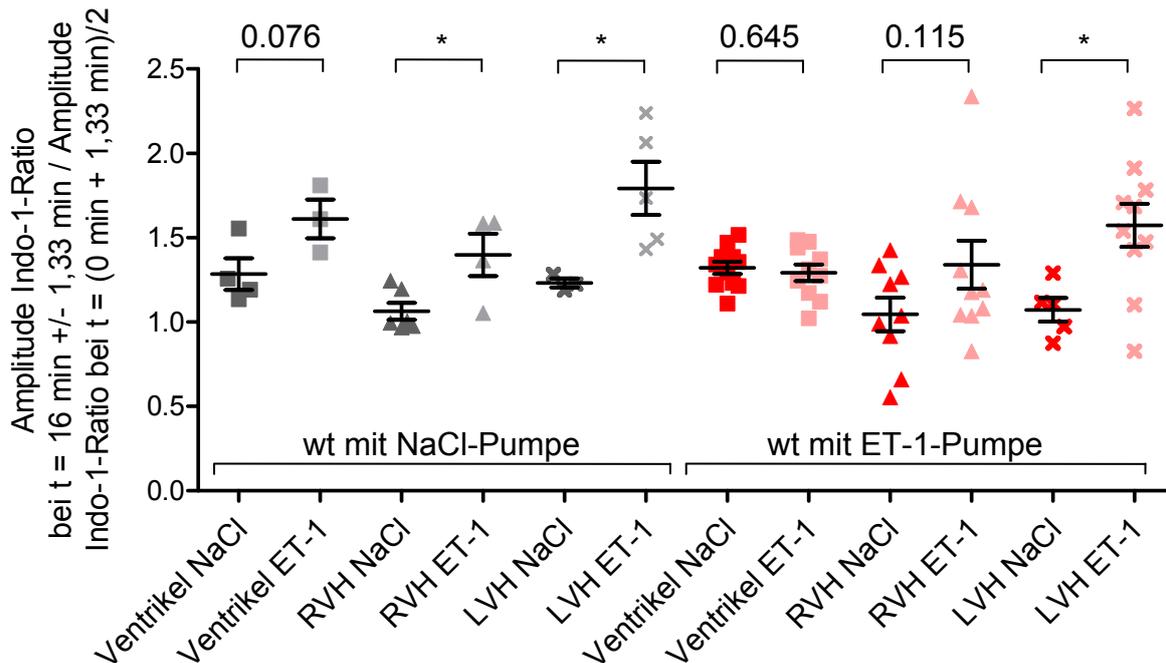


Abbildung 42: Veränderung der Amplitude der Indo-1-Ratio von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei elektrischer Stimulation von 0,5 Hz nach Zugabe von 100 nM ET-1 und anschließender 1  $\mu\text{M}$  Isoproterenol-Gabe bzw. bei Perfusion mit NaCl-Lösung. Mittelwertes bei  $t = 14,7$  min, 16,0 min und 17,3 min bezogen auf den Mittelwert der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei  $t = 0$  und 1,3 min. Akute ET-1-Zugabe bei  $t = 2,5$  min, Isoproterenol-Zugabe bei  $t = 21,5$  min. Mittelwerte + SEM; n-Werte siehe Abbildung 41.

#### 4.4.2 ET-1-Konzentrationen im Blutplasma

Da sich bei einer subkutanen Applikation von ET-1 nicht genau abschätzen lässt, wie stark sich die Konzentration des Hormons im Blutkreislauf tatsächlich erhöht, wurden von Mäusen ohne Pumpe, mit einer Schein-Operation, mit einer NaCl- oder ET-1-Pumpe und mit einer Dummy-Pumpe aus Plexiglas Blutproben entnommen. Aus diesen Blutproben wurde Plasma gewonnen, das zur Bestimmung der ET-1-

Konzentration an ein AnalySELabor eingesandt wurde. Die ET-1-Bestimmung der Plasmaproben wurde von dem AnalySELabor an mehreren Terminen durchgeführt. Auffällig war zunächst, dass Proben von Kontrolltieren ohne Pumpe an verschiedenen Terminen signifikant unterschiedliche ET-1-Konzentrationen im Plasma ergaben, obwohl sie mit dem gleichen Immunoassay ermittelt wurden. Auch konnten zu Kontrollzwecken zugesetzte bekannte Mengen an ET-1 aus einer Stocklösung in Plasmaproben nicht korrekt bestimmt werden. Daher wurden dem AnalySELabor ET-1-Stocklösung sowie humanes Plasma zur Verfügung gestellt, um eine Verdünnungsreihe mit beiden für geeignet beurteilten ET-1-Tests zu erstellen. Die beiden Tests lieferten für gleiche Verdünnungsproben und für die mitgelieferten Kontrollproben des jeweils anderen Tests unterschiedliche Werte.

Da es mit den beiden ausgewählten Tests nicht möglich war, aussagekräftige Ergebnisse für eine ET-1-Bestimmung im Blutplasma der Mäuse zu bestimmen, ist eine Darstellung dieser Messergebnisse obsolet.

#### **4.4.3 Herzgewicht im Verhältnis zur Tibialänge**

Um zu überprüfen, ob die chronische Gabe von ET-1 über zwei Wochen, die Operation oder die Anwesenheit eines Fremdkörpers im Mäusekörper eine Hypertrophie in den Mäusen ausgelöst haben, wurde das Gewicht des Herzens im Verhältnis der Länge der Tibia ermittelt. Die Bezugsgröße Tibialänge wurde ausgewählt, da sie im Gegensatz zum Körpergewicht relativ unabhängig vom Ernährungszustand der Mäuse ist. Aufgrund der Operation konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Mäuse an den ersten postoperativen Tagen ein verändertes Verhalten in der Nahrungsaufnahme zeigten. Das Verhältnis Herzgewicht zu Tibialänge wurde in Mäusen ohne Pumpe, mit einer Schein-Operation, mit einer NaCl- oder ET-1-Pumpe und mit einer Dummy-Pumpe aus Plexiglas ermittelt.

Bei keiner der Gruppen gab es eine signifikante Abweichung des Verhältnisses von Herzgewicht zur Länge der Tibien (siehe Abbildung 43). Die Werte Herzgewicht/Tibialänge betragen 6,8 mg/mm, 6,73 mg/mm, 6,88 mg/mm, 6,8 mg/mm und 6,76 mg/mm in Mäusen ohne OP (n = 10), mit einer Schein-Operation (n = 5),

mit einer NaCl-Pumpe (n = 9), mit einer ET-1-Pumpe (n = 10) bzw. mit einem Dummy aus Plexiglas (n = 5).

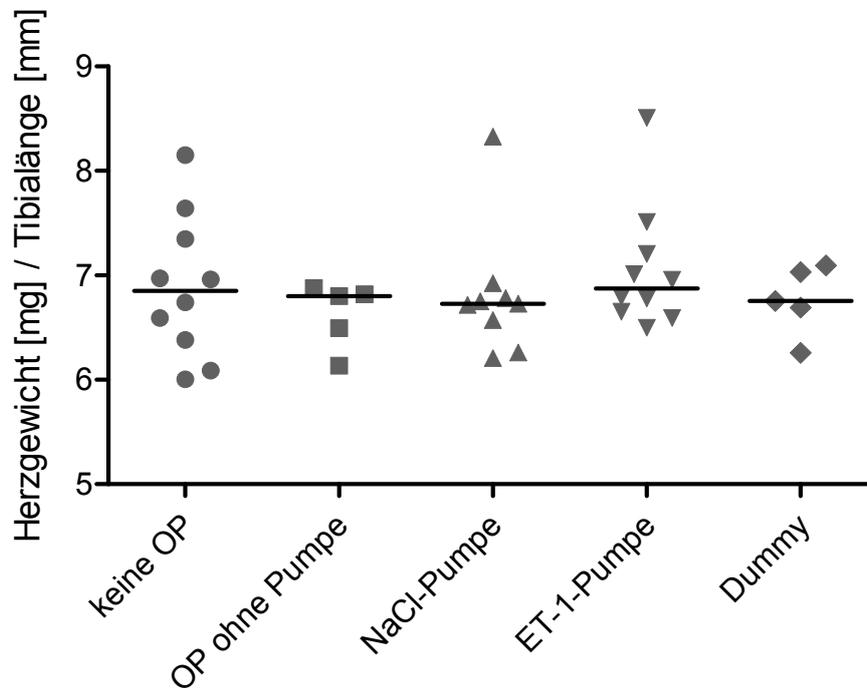


Abbildung 43: Verhältnis des Gewichts der Herzen zum Mittelwert der Länge der beiden Tibien von Mäusen verschiedener Versuchsgruppen. Mediane.

#### **4.5 Isoproterenol-Experimente in Kardiomyozyten aus *TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen***

Da sowohl TRPC1- als auch TRPC4-Kanäle als Kandidaten gelten, die vermutlich eine Rolle bei der Regulation des  $Ca^{2+}$ -Haushaltes und der Entwicklung von Herzkrankheiten spielen, habe ich im Folgenden überprüft, ob die Abwesenheit dieser Kanäle das Verhalten von elektrisch induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten in Ventrikelzellen ändert. Es wurden dazu *TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>*-Tiere und die entsprechenden wt-Tiere verwendet. Die Experimente wurden ohne und mit  $\beta$ 1-adrenerger Stimulation durch Isoproterenol – sowohl chronisch im Vorlauf der Experimente im ganzen Tier als auch akut während Einzelzellexperimenten – durchgeführt, um zu beobachten, ob Unterschiede bei normaler Herzaktivität und unter sympathischer Stimulation vorliegen könnten.

#### 4.5.1 Relative Veränderung der elektrisch stimulierten $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude bei Isoproterenol-Applikation

Die zeitliche Entwicklung der Amplitude elektrisch induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (absolute Amplitude bezogen auf die absolute Amplitude bei  $t = 2,6$  min) der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  von Ventrikelzellen in Abbildung 44 dargestellt.

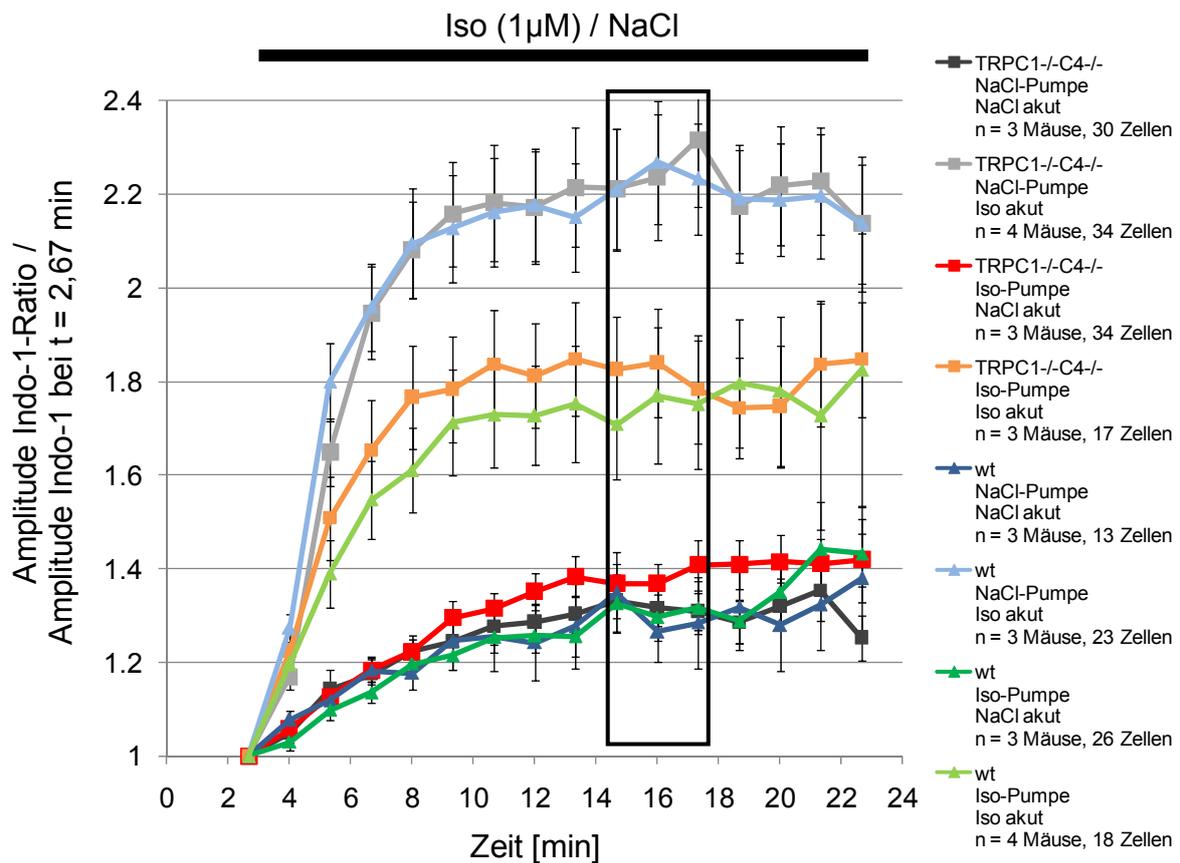


Abbildung 44: Veränderung der Indo-1-Ratio der Amplitude (bezogen auf die Amplitude bei  $t = 2,7$  min) der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  in Ventrikelzellen verschiedener Mausgruppen bei Perfusion mit  $1 \mu\text{M}$  Isoproterenol (Iso) bzw. Tyrode (NaCl). Zugabe von Iso bei  $t = 3$  min. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Balkenmarkierung: für weitere Auswertung verwendete Zeitpunkte.

Eine akute Perfusion der Ventrikelzellen mit  $1 \mu\text{M}$  Isoproterenol bewirkte eine Zunahme der Amplitude in der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei elektrischer Stimulation mit  $0,5$  Hz.

Die stärkste Zunahme infolge von akuter Isoproterenol-Zugabe lag bei Kardiomyozyten von wt- und von TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einer Pumpe vor, die als Kontrolllösung 0,9%-ige NaCl-Lösung enthält.

Bei Tieren mit einer Isoproterenol-Pumpe, sowohl bei wt- als auch bei TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Tieren, war die Zunahme der Amplitude weniger stark ausgeprägt.

Auch bei Perfusion der Kardiomyozyten von Tieren der genannten vier Gruppen mit NaCl-Lösung (Tyrode) statt mit Isoproterenol-haltiger Tyrode war eine leichte Zunahme der relativen Amplitude zu beobachten. Dieser Effekt könnte durch eine Zunahme der Stoffwechselaktivität der Zellen bei anhaltender elektrischer Stimulation auftreten und kann als Hintergrundlinie angesehen werden.

Zur genaueren Betrachtung der Veränderungen der Ca<sup>2+</sup>-Amplitude wurde der Mittelwert zu den Zeitpunkten t = 14,7 min, 16 min und 17,3 min (siehe graue Markierung in Abbildung 44) ausgewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 dargestellt.

Die Zunahme der Höhe der Amplitude unterschied sich bei wt- und TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne akute Isoproterenol-Zugabe nicht signifikant, unabhängig davon, ob sie eine NaCl- oder Isoproterenol-Pumpe implantiert hatten, und lag zu diesem Zeitpunkt bei 31,8 % für TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse mit NaCl-Pumpe (n = 3 Mäuse, 30 Zellen), bei 38,2 % für TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Isoproterenol-Pumpe (n = 3 Mäuse, 34 Zellen), bei 33,0 % für wt-Mäuse mit NaCl-Pumpe (n = 3 Mäuse, 13 Zellen) und 31,1 % für wt-Mäuse mit Isoproterenol-Pumpe (n = 3 Mäuse, 26 Zellen).

Eine akute Isoproterenol-Perfusion der Ventrikelzellen erhöhte bei TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen und bei wt-Mäusen die Amplitudenzunahme signifikant gegenüber den Zunahmen der mit NaCl-Lösung perfundierten Zellen, unabhängig davon, welchen Inhalt die Pumpe hatte (Iso-Zugabe vs. NaCl-Lösungszugabe;  $p_{\text{TRPC1}^{-/-}/\text{C4}^{-/-}, \text{NaCl-Pumpe}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{TRPC1}^{-/-}/\text{C4}^{-/-}, \text{Iso-Pumpe}} = 0,0002$ ;  $p_{\text{wt}, \text{NaCl-Pumpe}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{wt}, \text{Iso-Pumpe}} = 0,0016$ ). Diese Amplitudenerhöhung war jedoch bei Mausgruppen stärker ausgeprägt, wenn die Pumpe eine NaCl-Lösung enthielt. Bei TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen mit NaCl-Pumpe betrug die Zunahme unter akutem Isoproterenol-Einfluss 123,0 % (n = 4 Mäuse, 34 Zellen) und bei wt-Mäusen mit NaCl-Pumpe 123,8 % (n = 3 Mäuse, 23 Zellen); zwischen diesen beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied.

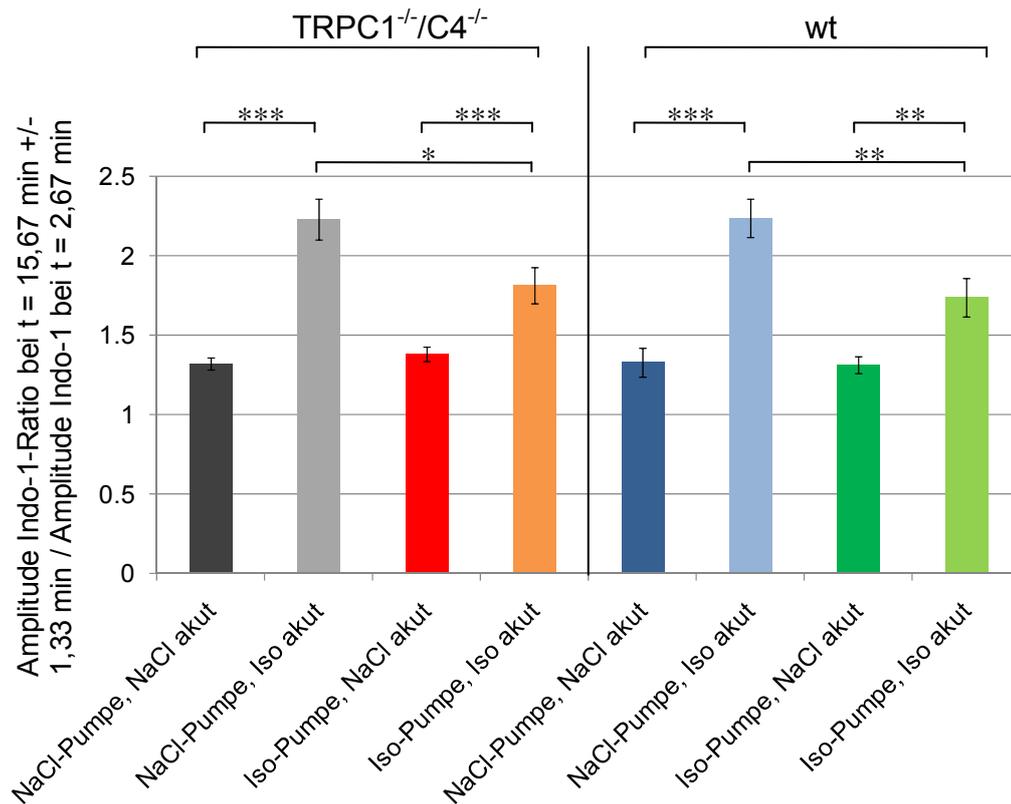


Abbildung 45: Mittelwert der Indo-1-Ratio der Amplitude der intrazellulären  $[Ca^{2+}]$  bei  $t = 14,7$  min,  $16,0$  min und  $17,3$  min bezogen auf die Amplitude zum Zeitpunkt  $t = 2,7$  min in Ventrikelzellen verschiedener Mausgruppen bei Perfusion mit  $1 \mu\text{M}$  Isoproterenol (Iso) bzw. Tyrode (NaCl) ab  $t = 2,7$  min. Mittelwerte  $\pm$  SEM; n-Werte siehe Abbildung 44.

Trugen die TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse und wt-Mäuse eine Isoproterenol-Pumpe, zeigten sich unter akutem Isoproterenol-Einfluss Erhöhungen der Amplitudenzunahme, die bei 81,6 % (n = 3 Mäuse, 17 Zellen) bzw. bei 73,6 % (n = 4 Mäuse, 18 Zellen) lagen und untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren.

Die bei akuter Zugabe von Isoproterenol beobachteten Erhöhungen der Amplitude waren bei TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>- und wt-Mäusen mit NaCl-Pumpe signifikant stärker ausgeprägt als bei den TRPC1<sup>-/-</sup>/C4<sup>-/-</sup>- und wt-Mäusen mit Isoproterenol-Pumpe (p = 0,0273 bzw. 0,009).

Zusammenfassend lässt sich für dieses Experiment sagen, dass ohne akute Iso-Perfusion weder die An- oder Abwesenheit von TRPC1- oder TRPC4-Kanälen noch der Inhalt der Pumpe einen Einfluss auf die Zunahme der Transientenamplitude haben. Bei akuter Isoproterenol-Perfusion bewirkte nicht die An- oder Abwesenheit

von TRPC1- und TRPC4-Kanälen einen Effekt, sondern die Anwesenheit von Isoproterenol in der Pumpe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Spektren: Einfluss von Koffein auf Fluoreszenzfarbstoffe

Meine Beobachtungen aus Kapitel 4.1 bei der Untersuchung des Koffein-Einflusses auf das Anregungsspektrum von Fura-2 stimmen prinzipiell mit den Beobachtungen von Muschol und Kollegen (Muschol et al., 1999) überein, der ebenfalls von einer Zunahme der Fluoreszenzintensität und einer bathochromen Verschiebung der Maxima berichtet, wenn die Fura-2-Lösung Koffein-Konzentrationen bis zu 60 mM enthält. Die in meinen Experimenten bei 20 mM Koffein und 10 mM EGTA beobachteten Änderungen der Fluoreszenzintensität und des Spektrums liegen zwischen den Werten, die Muschol und Kollegen für 15 mM und 45 mM Koffein berichten. Die Veränderung in der Ratio von Fura-2 in meinen Experimenten mit 10 mM EGTA lag durch die wellenlängenabhängige Beeinflussung der Fluoreszenzen bei -12,9 %.

Die Messungen von Muschol und Kollegen wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösungen mit 5 mM EGTA durchgeführt, nicht jedoch in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösungen. In meinen Experimenten stellte sich daher durch die Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösungen noch zusätzlich heraus, dass die Änderungen in der Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  weitaus stärker sind. Da in Kardiomyozyten die  $[\text{Ca}^{2+}]$  im Zytosol bei Koffein-Applikation steigt, ist es wichtig, den Einfluss von Koffein auch bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zu betrachten. Bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM zeigte Fura-2 *in vitro* eine starke Veränderung in der Ratio von -39,8 % aufgrund des hier stärker wellenlängenabhängigen Effekts durch das Koffein. Die Konzentrationen von 10 mM EGTA und 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  für die Farbstofflösungen wurden ausgewählt, da Fura-2 in den Lösungen für die Experimente  $\text{Ca}^{2+}$ -frei bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigt vorliegen sollte. Daher wurden diese beiden Extremwerte ausgewählt, obwohl sie nicht den physiologischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  in Kardiomyozyten entsprechen.

Fura Red verhält sich bei Anwesenheit von Koffein ähnlich wie Fura-2, vermutlich aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zwischen diesen beiden Fluoreszenzfarbstoffen. Die Änderungen in der Fluoreszenzintensität bei den beiden betrachteten Wellenlängen sind jedoch weitaus höher als bei Fura-2, führen aber zu

ähnlichen Veränderungen in der Ratio wie auch bei Fura-2, sowohl bei 2 mM Calcium als auch bei 10 mM EGTA. Bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM liegt die Veränderung der Fura Red-Ratio bei -41,9 % gegenüber -11,2 % bei 10 mM EGTA.

Indo-1, bei dem die Emissionsspektren analysiert wurden, zeigt im Gegensatz zu Fura-2 und Fura Red in seinem Emissionsspektrum eine leichte Verschiebung der Maxima in den kurzwelligeren Bereich hinein und eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten bei Anwesenheit von Koffein. Im Unterschied zu den Fura-Farbstoffen ist die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten jedoch in der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung mit 10 mM EGTA stärker wellenlängenabhängig, so dass sich bei der Bildung der Ratio eine Koffein-induzierte Veränderung von + 39,4 % ergibt. In der Lösung mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  hingegen scheint die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten durch Koffein weniger wellenlängenabhängig zu sein, da sich die Indo-1-Ratio durch Koffein nur um 8,6 % erhöht.

Ein Quenching der Indo-1-Fluoreszenzen, wie es in meiner Arbeit zu beobachten war, wurde bereits 1990 von O'Neill et al. berichtet, der bei *in-vitro*-Messungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ - und Koffein-Konzentration mit Hilfe von Indo-1 in Ratten-Kardiomyozyten eine Abnahme des Fluoreszenzsignals während der Zugabe von Koffein bei den beiden Wellenlängen von 400 nm und 500 nm beobachtet. Die Ratio aus den beiden Wellenlängen, 400 nm und 500 nm, blieb jedoch unverändert, so dass er von einem wellenlängen- aber auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Effekt ausging. In fluoreszenzspektrometrischen *in-vitro* Messungen des Farbstoffsalzes von Indo-1 konnte er bei 10 mM EGTA sowie bei 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  die gleiche Größenordnung in der Abnahme der Fluoreszenz bei Anwesenheit von Koffein beobachten (O'Neill et al., 1990). Das Ergebnis der *in vitro*-Experimente, dass unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen die gleichen wellenlängenunabhängigen Auswirkungen des Koffeins bestehen wie bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ , konnte ich nicht bestätigen, da in meinen Experimenten bei 10 mM EGTA ein stärker wellenlängenabhängiger Einfluss des Koffeins auf die Indo-1-Fluoreszenz sichtbar wurde als bei 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Ein Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnten darin liegen, dass O'Neill bei seinen fluoreszenzspektrometrischen *in vitro*-Experimenten als  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung eine Saline-Lösung mit 10 mM EGTA und einem pH-Wert von 7,0 gewählt hat. Im Gegensatz dazu lag der Farbstoff in meinen *in vitro*-Messungen als Salz in

destilliertem Wasser vor, dem 10 mM EGTA zugesetzt waren. Die Zusammensetzung der Ionen oder der pH-Wert kann einen Effekt auf die Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem zugegebenen Koffein bewirkt haben, so dass unterschiedliche Effekte des Koffeins ermittelt wurden. Die *in vivo*-Experimente von O'Neill können zur Klärung dieses abweichenden Ergebnisses der *in vitro*-Experimente unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen nicht herangezogen werden, da sie nicht unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen durchgeführt wurden. Ferner beschreibt O'Neill, dass die Affinität von Koffein, die Indo-1-Fluoreszenz zu quenchen, *in vitro* höher ist als *in vivo*; dadurch ist es möglich, dass die Versuchsbedingungen meiner Experimente die Realität in der Zelle nicht genau abbilden.

Laut Muschol interagiert Koffein nicht mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle der Fluoreszenzfarbstoffe und der Effekt von Koffein auf die durch ihn untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe beruht auf nichtspezifischen, hydrophoben Interaktionen (Muschol et al., 1999). Daher sind nach dieser Studie die betrachteten Fluoreszenzfarbstoffe nicht grundsätzlich für Experimente mit Applikation von Koffein ungeeignet, wenn es korrekt ist, dass Koffein und  $\text{Ca}^{2+}$  nicht um die gleichen Bindungsstellen konkurrieren.

Da alle Fluoreszenzfarbstoffe bei den beiden von mir betrachteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0 mM und 2 mM) unterschiedliche Beeinflussungen durch Koffein zeigen, ist daher wichtig, zu berücksichtigen, welcher der Fluoreszenzfarbstoffe bei den typischen, im Zytosol vorliegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch Koffein die geringste Änderung erfährt. Neben den beiden Extremkonzentrationen, die ich bei meinen *in vitro*-Experimenten verwendet habe, wäre es sinnvoll, auch weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zu verwenden, um den zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  nahezukommen.

Der Verlauf der Stärke der Beeinflussung durch das Koffein zwischen den beiden von mir verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kann verschiedenste Formen haben. Es ist z.B. ein linearer, exponentieller, aber auch sigmoidaler Verlauf möglich. Zur Bestimmung dieses Verlaufs wären daher weitere Versuchsreihen nötig, die mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen beinhalten.

Die Beobachtung, dass bei Koffein-Zugabe der typische Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente bei Indo-1 im Vergleich zu Fura-2 (Vgl. Abbildung 15 und Abbildung 19) kaum deformiert wird, spricht dafür, dass der wellenlängenabhängige Einfluss von Koffein auf Indo-1 bei verschiedenen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen relativ konstant ist. Die tatsächliche Höhe des Einflusses von Koffein und damit die Größe der Verfälschung der Amplitude bei Koffeinzugabe ist jedoch nicht bekannt, so dass zwar ein Vergleich zwischen Amplituden verschiedener Zellen im Rahmen der Versuchsreihe, jedoch keine korrekte Angabe über die absolute Amplitudenhöhen möglich ist.

Für alle folgenden Experimente unter Koffein-Zugabe habe ich mich aufgrund des vergleichsweise geringeren Einflusses von Koffein auf die Indo-1-Ratio für die Verwendung dieses Fluoreszenzfarbstoffs entschieden.

## **5.2 Genetisch kodierter Calcium-Sensor GCaMP2**

### **5.2.1 Parallelmessungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ mit Fura-2 und GCaMP2**

Die Ergebnisse in Kapitel 4.2 zeigen, dass Messungen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe in einer Zelle durch wechselseitige Beeinflussungen beeinträchtigt sind im Vergleich zu Zellen, die nur mit einem der beiden Farbstoffe markiert waren. In Zellen mit beiden Farbstoffen war sowohl die Fura-2-Ratio als auch das GCaMP2-Signal signifikant verringert.

Für GCaMP2 liegen seitens der spektralen Eigenschaften keine Indizien für einen Cross Talk mit Fura-2 vor. Bei Anregung von GCaMP2 mit 488 nm dürfte keine Anregung des Fura-2 erfolgen. Auch erfolgte durch die Emission von Fura-2 keine Anregung des GCaMP2, da sich das Anregungsspektrum von GCaMP2 und das Emissionsspektrum von Fura-2 nicht überlappen.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Fluoreszenz von GCaMP2 bei Anwesenheit von Fura-2 im Vergleich zu GCaMP2-Zellen, die nicht mit Fura-2 beladen waren, könnten Unterschiede im Expressionslevel von GCaMP2 sein, die

sich auswirken, da hier die absolute Fluoreszenz-Intensität und nicht ein Ratio-Wert wie bei Fura-2 betrachtet wurde.

Ein anderer Grund für die Verringerung des GCaMP2-Signals in den Fura-2-beladenen GCaMP2-Zellen, den ich als wahrscheinlicher erachte, könnte in der Ähnlichkeit der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der beiden Fluoreszenzfarbstoffe liegen. Für Fura-2 werden in der Literatur  $K_D$ -Werte zwischen 135 nM und 239 nM unter *in vitro*-Bedingungen (Grynkiewicz et al., 1985; Berlin et al., 1993; www.invitrogen.com: The Handbook – A guide to fluorescent probes and labeling technologies) und zwischen 312 nM und 371 nM *in vivo* berichtet (Ladilov et al., 1997; Petr et al., 1997), für GCaMP2 liegt dieser gemäß Literaturangaben *in vitro* bei 146 nM (Tallini et al., 2006) und für GCaMP2-Fusionsprodukte *in vivo* bei 247-259 nM (Lee et al., 2006). Die  $K_D$ -Werte beider Farbstoffe wurden jeweils unter unterschiedlichen Bedingungen ermittelt, liegen jedoch etwa in einem ähnlichen Bereich. Da  $K_D$ -Werte stark abhängig von diversen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung der Ionenkonzentrationen im Umgebungsmilieu sind, wäre es erforderlich die  $K_D$ -Werte für Fura-2 und GCaMP2 im gleichen Zelltyp unter gleichen Bedingungen zu ermitteln, damit eine endgültige Aussage darüber getroffen werden kann, wie nah die  $K_D$ -Werte *in vivo* in Kardiomyozyten tatsächlich beieinander liegen. Durch einen ähnlichen  $K_D$ -Wert beider Farbstoffe kann es passieren, dass sie v.a. bei hohen Expressions- bzw. Beladungsleveln um die  $Ca^{2+}$ -Ionen konkurrieren, sie sich gegenseitig wegfangen und daher beide eine erniedrigte Fluoreszenz-Intensität aufweisen. Es liegt also vermutlich bei Parallelmessungen mit Fura-2 und GCaMP2 eine Pufferung des  $Ca^{2+}$  durch den jeweils anderen Farbstoff vor.

Im Falle von Fura-2 müsste darüber hinaus noch einen zusätzlicher, wellenlängenabhängiger Effekt existieren, da nicht nur die Fluoreszenz-Rohintensitäten bei 340 nm und 380 nm verringert waren, sondern auch die Fura-2-Ratio.

Diese wellenlängenabhängige Beeinflussung der Fura-2-Signale könnte durch einen Crosstalk der beiden Farbstoffe durch eine Überlappung des Fluoreszenzspektrums von Fura-2 mit dem Anregungsspektrum von GCaMP2 erklärt werden. Möglicherweise waren die Versuchsbedingungen in meinen *in vivo*-Experimenten

abweichend von den Bedingungen, unter denen das Spektrum von Tallini und Kollegen aufgenommen wurde (Tallini et al., 2006), so dass im Grenzbereich zwischen Fura-2 und GCaMP2 doch eine gewisse Überlappung bestand. GCaMP2 basiert auf dem Fluoreszenzfarbstoff EGFP und besitzt v.a. bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ähnliche spektrale Eigenschaften wie EGFP (Tallini et al., 2006). Das Anregungsspektrum von EGFP reicht im kurzwelligen Wellenlängenbereich bis hin zu 350 nm. Daher könnte sich die für Fura-2 gemessene Fluoreszenz bei einer Anregung von 380 nm aufgrund zwar geringer, aber vorhandener Anregung von GCaMP2 im kurzwelligen Bereich des Anregungsspektrums von EGFP um eine Zusatzfluoreszenz von GCaMP2 erhöhen. Dieses Phänomen wurde bei paralleler Verwendung von Fura-2 und EGFP von Bolsover berichtet (Bolsover et al., 2001). Er untersuchte parallele Messungen von Fura-2 und EGFP in RBL-2H3-Zellen und stellte auch fest, dass durch die Beeinflussung der Fluoreszenz bei Anregungen mit 380 nm auch die Fura-2-Ratio verändert wurde. Die Fura-2-Ratio nahm umso stärker ab, desto höher die EGFP-Expression der untersuchten Zellen war. Eine Lösung für die Vermeidung einer Verunreinigung des Fura-2-Signals durch EGFP-Farbstoffe wurde von Berkova et al. vorgeschlagen (Berkova et al., 2003), der berichtet, dass die Beeinflussung der Fura-2-Fluoreszenz durch EGFP bei Verwendung von Detektionswellenlängen von 510 nm am größten ist. Bei Verwendung von höheren Detektionswellenlängen nimmt der Einfluss von EGFP auf das Fura-2-Signal ab und ist bei einer Wellenlänge von 560 nm vernachlässigbar oder nicht mehr existent. Dieser Effekt bei höheren Detektionswellenlängen beruht darauf, dass der EGFP Peak im Anregungsspektrum bei Detektionswellenlängen von über 560 nm verschwindet. Für meine Parallelmessungen von Fura-2 und GCaMP2 könnte dies bedeuten, dass die Reduktion der Fura-2-Fluoreszenz-Rohintensität durch Konkurrenz um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit GCaMP2 bei Anregung mit 380 nm aufgrund einer leichten Emission des GCaMP2 nicht ganz so stark ausfällt wie bei 340 nm, was auf eine zusätzliche Verfälschung der Ratio hindeutet.

In einem komplexeren Experiment mit steigender Stimulationsfrequenz zeigte sich, dass die in Ventrikelzellen erwartete und in Zellgruppen mit nur einem Farbstoff auch nachgewiesene Zunahme der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei steigender Stimulationsfrequenz nicht dargestellt werden konnte, wenn beide Farbstoffe gleichzeitig in einer Zelle vorlagen. Die gegenseitige Beeinflussung führte

anscheinend dazu, dass bei beiden Farbstoffen eine leichte Abnahme bzw. eine Stagnation der Amplitudenhöhe zu beobachten war, obwohl die Amplitude stetig hätte steigen müssen wie bei den Messungen mit nur einem Farbstoff.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von GCaMP2 und Fura-2 sind also Verfälschungen der Messergebnisse bei der Untersuchung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen möglich. Daher sollte von Versuchen, in denen Fura-2 als  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator verwendet wird, von der Verwendung von EGFP oder GCaMP2 als Expressionsmarker für eine Transfektionseffizienz mit einem Genkonstrukt für ein eingeschleustes Protein abgesehen werden. Auch für einen Vergleich der Performance von GCaMP2 und Fura-2 als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor sind parallele Messungen in den gleichen Zellen aufgrund der wechselseitigen Beeinflussungen nicht optimal. Es muss genau abgewogen werden, wann diese wechselseitige Beeinflussung und damit die Verfälschung des Messergebnisses der zu treffenden Aussage im Wege steht. Die Vergleiche der Performance von Fura-2 und GCaMP2 wurden im Folgenden z.T. mithilfe von Zellgruppen vorgenommen, die ausschließlich einen der beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren besaßen, z.T. aber auch mithilfe von Zellgruppen, die parallel beide  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren trugen.

### **5.2.2 Eignung von GCaMP2 als $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff bei der Untersuchung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter Ruhebedingungen und während elektrischer Stimulation**

Bislang werden viele Bestimmungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Zellen mithilfe von extern zugeführten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Hier haben sich in der Vergangenheit immer mehr die AM-Ester-Formen dieser Farbstoffe durchgesetzt, da aufgrund ihrer Membrangängigkeit die Zellen bei der Beladung weniger geschädigt werden als bei der Einschleusung der Salze dieser Farbstoffe. Nichtsdestotrotz besitzen diese Farbstoffe verschiedene Nachteile. So wirken sie z.B. bei längerer Exposition zytotoxisch, so dass vor allem Langzeitmessungen durch unspezifische, nicht-physiologische Effekte verfälscht werden könnten. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Farbstoffmoleküle durch verschiedene Transportmechanismen, v. a. unspezifische Anionentransporter, aus dem Zytosol transportiert werden, so dass bei nicht-ratiometrischen Farbstoffen die gemessene  $[\text{Ca}^{2+}]$  verfälscht werden kann.

In zunehmendem Maße wird daher an endogenen, genetisch codierten Fluoreszenzfarbstoffen u.a. für  $\text{Ca}^{2+}$  gearbeitet. Diese haben den Vorteil, dass die Beladung entfällt, die Toxizität geringer ist und sie über lange Zeit in der Zelle zur Verfügung stehen. Da es sich hier allerdings meist um große Protein-Konstrukte handelt, gehen die genannten Vorteile meist auf Kosten der Reaktionsgeschwindigkeit, da der Vorgang der Fluoreszenzerzeugung Konformationsänderungen beinhaltet, die langsamer sind als Elektronenanregungsprozesse. Es sollte daher geprüft werden, ob ein genetisch codierter Fluoreszenzfarbstoff wie GCaMP2 für die Fragestellung der vorgesehenen Experimente geeignet ist.

### **5.2.2.1 Basale $[\text{Ca}^{2+}]$ unter Ruhebedingungen**

Bei der Bestimmung des absoluten GCaMP2-Signals unter Ruhebedingungen zeigte sich in Ventrikelkardiomyozyten mit GCaMP2 und Fura-2, dass keinerlei Korrelation zu der gleichzeitig ermittelten Fura-2-Ratio bestand.

Von der Bestimmung von absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Baselines oder absoluten Amplituden, mittels GCaMP2 ist abzusehen, da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  abhängt, sondern auch vom Expressionslevel des GCaMP2 in den betrachteten Zellen.

Relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, z.B. das Verhältnis Amplitude zu basalem  $\text{Ca}^{2+}$ , oder relative Veränderungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in der gleichen Zelle sind mit GCaMP2 möglich, da sich Effekte durch unterschiedliche Expressionslevel durch die Verhältnisbildung herauskürzen.

### **5.2.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter elektrischer Stimulation**

#### ***Repräsentation der Zellpopulation***

Bei Fura-2-Messungen wurden in 83,7 % der Zellen elektrisch induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten abgebildet, d.h. Fura-2 repräsentiert einen Großteil der Zellen hinsichtlich ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Bei GCaMP2-Messungen konnten nur in 28,1 % der betrachteten Zellen elektrisch induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet werden, was bedeutet, dass GCaMP2 nur einen kleineren Teil der Zellpopulation

repräsentiert, so dass mit einer Abweichung des gemessenen Parameters vom tatsächlichen Wert gerechnet werden muss.

Die Beobachtung, dass die Zellen, die keine im GCaMP2-Signal erkennbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente aufweisen, eine kleine Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Fura-2-Signal zeigen, und dass bei Zellen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im GCaMP2-Signal deren Amplitude tendenziell größer ist, je größer die Amplitude in der Fura-2-Ratio ist, deutet darauf hin, dass sich GCaMP2 nur eignet, um größere Veränderungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]$  darzustellen. Dies spricht für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung durch die Farbstoffe, wobei diese Ergebnisse darauf hin deuten, dass entweder Fura-2 einen geringeren  $K_D$ -Wert aufweist oder bei gleichem  $K_D$  ein Vielfaches der dynamischen Breite besitzt. Bei ähnlichen  $K_D$ -Werten von GCaMP2 und Fura-2 wäre eigentlich eine ähnliche dynamische Breite in der Detektion von  $\text{Ca}^{2+}$  zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist diese bei GCaMP2 zu höheren Bereichen hin verschoben oder eingeschränkter, als es bei Fura-2 der Fall ist.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Bindungskinetik von GCaMP2 für  $\text{Ca}^{2+}$ . Wie alle auf Calmodulin basierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren bindet GCaMP2 mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Bei kooperativer Bindung ist es möglich, dass  $\text{Ca}^{2+}$  bei niedrigen Konzentrationen und schnellen Transienten nicht schnell genug binden kann, um diese Transienten entsprechend abzubilden.

GCaMP2 scheint nicht dazu geeignet zu sein, die im Zytosol von Kardiomyozyten vorhandenen  $[\text{Ca}^{2+}]$  und deren Änderungen realitätsnah abzubilden.

### ***Kinetische Eigenschaften***

Da bei GCaMP2 unter Raumtemperaturbedingungen die Aufstrichzeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nahezu dreimal so groß und die Zeitkonstante  $\tau$  der Fluoreszenzabnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten knapp doppelt so groß ist wie bei Fura-2, eignet sich GCaMP2 nicht optimal für Beobachtungen von schnellen Veränderungen in der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Es ist daher nicht der  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator der Wahl bei der Analyse von z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks oder der Amplitude von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei hoher Stimulationsfrequenz. Bei letzterem würden zum einen bei einer Analyse der kinetischen Eigenschaften der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse nicht deren Parameter ermittelt, sondern hauptsächlich die der

GCaMP2-Kinetik. Ein zweiter Kritikpunkt ist der, dass die Höhe der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse zu niedrig abgebildet würde, wenn das Maximum der Amplitude erreicht ist und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bereits wieder abnimmt, bevor es durch GCaMP2 angezeigt werden kann. Dies trifft dann zu, wenn die Aufstrichzeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente kürzer als die des GCaMP2 ist, also weniger als 220 ms beträgt, wie es bei meinen Experimenten gemäß den Fura-2-Messungen der Fall ist. Zusätzlich würde auch nicht der reale Wert für die diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  angezeigt werden, wenn die nächste  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente einsetzt, bevor das GCaMP2-Signal dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal folgen kann. Diese Verfälschungen des Maximums und des Minimums der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale führt zu einer summierten Verfälschung im Sinne einer Unterschätzung der abgebildeten Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse.

Diese Effekte sind bei GCaMP2 deutlich stärker ausgeprägt als bei Fura-2, da bei dem Protein-Konstrukt in den Prozess der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorik und der Fluoreszenzerzeugung Konformationsänderungen und Transitionen zum und vom photoaktiven Zustand eingebunden sind, während bei Fura-2 nur schnelle Elektronenanregungs- und -relaxationsvorgänge involviert sind.

Es hängt damit sehr stark davon ab, wie schnell die zu beobachtenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse sind ob GCaMP2 verwendet werden kann oder ob Fura-2 zu favorisieren ist.

Gemäß Tallini et al. ist es möglich, bei GCaMP2 die Verzögerungen in der Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, verursacht durch die kinetischen Eigenschaften von GCaMP2, durch Fluoreszenzassoziations- und -dissoziationskonstanten zu korrigieren (Tallini et al., 2006). Dies würde einen zusätzlichen Schritt in der Analyse der GCaMP2-Messungen bedeuten.

Für Experimente, wie sie hier durchgeführt wurden (maximal 45 min, Frequenzen bis 3 Hz, RT), ist Fura-2 geeigneter und in der Analyse weniger aufwendig als GCaMP2, um alle Parameter möglichst realitätsnah zu bestimmen.

### ***Experimente bei komplexeren Messungen mit elektrischer Stimulation***

Wie in Kapitel 4.2.3 gezeigt wurde, bildet GCaMP2 eine stärkere Zunahme der Amplitude von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei steigender Pacing-Frequenz ab als Fura-2, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist.

Dieser Effekt könnte daran liegen, dass GCaMP2 seinen dynamischen Detektionsbereich bei höheren  $[\text{Ca}^{2+}]$  besitzt als Fura-2. Eine gute Detektion ist zwar erst ab größeren Veränderungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]$  sichtbar, jedoch werden dann die  $[\text{Ca}^{2+}]$  besser aufgelöst. Fura-2 nähert sich bei großen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten möglicherweise bereits seinem Sättigungsbereich, während GCaMP2 die Grenze des Detektionsbereichs noch nicht erreicht hat.

Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse in Kapitel 4.2.1 (Eignung zur Repräsentation der Zellpopulation) unterstützt. Die Bandbreite, in dem die basalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  unter Ruhebedingungen dargestellt werden, ist bei Fura-2 deutlich kleiner als bei GCaMP2 und liegt bei den meisten Zellen zwischen einer Ratio von 0,6 und 1,0. Bei GCaMP2 liegen die Werte zwischen knapp über 0 und rund 750 Counts bei der Rohintensität (siehe Abbildung 22).

Diese möglicherweise vorhandene bessere Auflösung der Unterschiede in der  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei GCaMP2 fällt jedoch bei der Beurteilung der Eignung beider Farbstoffe nicht ins Gewicht, da die Amplitudenermittlung durch GCaMP2 durch dessen kinetische Eigenschaften bei schnellen  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen nicht realitätsgetreu durchgeführt wird.

### **5.3 Charakterisierung von Myozyten der Vorhöfe und des Ventrikels mit Indo-1**

Vorhofflimmern zählt zu den häufigsten Herzerkrankungen und unterscheidet sich in Vorkommen, Häufigkeit und Auswirkungen von ventrikulären Arrhythmien. Über die zellulären und molekularen Mechanismen, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns führen, ist jedoch bislang z.T. nur wenig bekannt. Daher gibt es wenig Ansatzpunkte für eine wirksame Prävention oder eine Therapie.

Aufgrund zunehmender Hinweise werden als eine mögliche Ursache für Arrhythmien Verschiebungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase angesehen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling in

Ventrikelzellen ist inzwischen bei verschiedenen Spezies intensiv untersucht (Behrs, 2001), doch zu Vorhofzellen liegen bislang wenige Daten - und nur aus wenigen Spezies - vor.

Da zur Untersuchung von Pathologien zunehmend Maus-Modelle genutzt werden, ist ein genaueres Verständnis der Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Ventrikelzellen und Zellen aus linkem und rechtem Vorhof von Mäusen zur Untersuchung von Kardiopathologien erstrebenswert. Darüberhinaus können sich eventuell ergebende Unterschiede genutzt werden, um Hypothesen aufzustellen, welche Parameter bei Maus und möglicherweise beim Mensch bei Vorhofflimmern eine Rolle spielen könnten.

Daher habe ich in einer Studie eine Grundcharakterisierung verschiedener Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Mäuse-Kardiomyozyten getrennt nach linkem und rechtem Vorhof sowie Ventrikel vorgenommen.

Zur Bestimmung der Beladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$  wurden Experimente verwendet, in denen die Kardiomyozyten 10 mM Koffein ausgesetzt wurden. Die Erhöhung der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  mithilfe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht eine Ermittlung der Größenordnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR und einen Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen. Der Fluoreszenzfarbstoff detektiert jedoch nicht jedes einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion genau einmal, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht aus Farbstoff und  $\text{Ca}^{2+}$  einerseits sowie dem Farbstoff- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex andererseits ein. Um einen absoluten Wert für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR zu erhalten, eignet sich die Methode nach (Trafford et al., 1997). Hier wird der Strom durch die Plasmamembran bestimmt, so dass die Menge der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die aus dem Zytoplasma über den NCX entfernt werden, bestimmt werden kann. Um jedoch einen Vergleich zwischen Zellen aus den verschiedenen Herzregionen anzustellen, ist die Methode, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR qualitativ durch Indo-1 zu bestimmen, ausreichend. Über die Zeitkonstanten  $\tau$  der Abnahme der Fluoreszenzintensität können Aussagen über Transportmechanismen für  $\text{Ca}^{2+}$  getroffen werden, wenn die Aufstrichzeiten der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten gleich sind.  $\tau_1$  der Abnahme nach Beginn der Koffeinzugabe zeigt die Abnahme der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  durch Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX aus der Zelle hinaus, während  $\tau_2$  der Abnahme nach Ende der Koffeinzugabe den Transport über den NCX und zusätzlich über die SERCA-

Pumpe ins SR abbildet. Da  $\tau_1$  im Vergleich zu  $\tau_2$  groß ist, also der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX vergleichsweise langsam ist, kann der Einfluss des NCX-Transportweges auf  $\tau_2$  vernachlässigt werden und  $\tau_2$  überwiegend dem SERCA-Transportweg zugeordnet werden.

### 5.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase unter Ruhebedingungen

Die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  unter Ruhebedingungen weist in Kardiomyozyten aus Ventrikel und Vorhöfen keinen signifikanten Unterschied auf. Betrachtet man jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR, der durch Koffein-Experimente bestimmt wurde, kann beobachtet werden, dass dieser bei Zellen aus beiden Vorhöfen um mehr als das Doppelte erhöht ist gegenüber Ventrikelzellen. Die Indo-1-Ratio der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten der Vorhöfe beträgt das Doppelte der Indo-1-Ratio in den Ventrikelzellen.

Vorhofzellen besitzen im Vergleich zu Ventrikelzellen weniger oder keine T-Tubuli. Dadurch ist die Oberfläche der Plasmamembran geringer und damit auch die Menge an L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die sich in der Plasmamembran befinden. Um die dadurch weniger gute Kopplung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und RyR in Vorhofzellen zu kompensieren, ist es physiologisch sinnvoll, dass Vorhofzellen eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR aufweisen. Dadurch kann ein effektives CICR betrieben werden, auch wenn vergleichsweise weniger  $\text{Ca}^{2+}$  durch die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Vorhofzelle eintreten kann.

Die bei Koffein-Experimenten ermittelten Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  können zum einen als mögliche Erklärung der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR bei Ventrikel- und Vorhofzellen herangezogen werden oder aber durch die unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR begründet werden:

Nimmt man die aus den Zeitkonstanten ermittelten Eigenschaften der Transportmechanismen als Ursache der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR an, kann die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR in Vorhofzellen dadurch plausibilisiert werden, dass die SERCA-Pumpe das SR befüllt, und das  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR pumpt, das nicht durch den NCX aus der Zelle entfernt wird.  $\tau_1$  war bei Zellen aus rechtem Vorhofgewebe signifikant erhöht gegenüber Zellen aus Ventrikel- und linkem Vorhofgewebe. Dies

bedeutet, dass der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX-Weg in rechten Vorhofzellen verlangsamt ist. Daneben ist  $\tau_2$  in Zellen aus den beiden Vorhöfen erniedrigt, besonders in Zellen des linken Vorhofs, während  $\tau_2$  in Ventrikelzellen deutlich höher ist. Dies sagt aus, dass der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  über die SERCA-Pumpe in das SR hinein in Vorhofzellen, insbesondere aus dem linken Vorhof, schneller ist als in Ventrikelzellen. Beide Effekte, verringerter Transport aus der Zelle hinaus über den NCX-Weg in rechten Vorhofzellen und verstärkter Transport ins SR über den SERCA-Weg, können als Ursache der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR in den Vorhofzellen angenommen werden.

Der schnelle Transport des  $\text{Ca}^{2+}$  in Ventrikelzellen aus der Zelle hinaus über den NCX könnte an einer höheren Anzahl an NCX-Molekülen, die sich in der äußeren Plasmamembran und in den ausgeprägten T-Tubuli befinden, oder an einer erhöhten Aktivität dieser Transportmoleküle liegen. Beim Menschen beträgt der Proteinlevel des NCX in Vorhofzellen nur ca. 50% des Levels in Ventrikelzellen (Wang et al., 1996). Falls dies bei Mäusen ebenfalls der Fall ist, wäre dies eine Erklärung dafür, dass der NCX-Weg für  $\text{Ca}^{2+}$  in Vorhofzellen weniger aktiv ist als in Ventrikelzellen und dass das  $\text{Ca}^{2+}$  vornehmlich über die SERCA-Pumpe in das SR aufgenommen wird, um die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  zu normalisieren. Darüberhinaus könnte für die in Vorhofzellen erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR auch die durch  $\tau_2$  belegte höhere Aktivität des SERCA-Transportweges dienen, entweder durch eine erhöhte Anzahl an SERCA-Molekülen oder eine höhere Aktivität.

Umgekehrt kann z.B. die Zeitkonstante  $\tau_2$  des SERCA-Transportweges auch durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR beeinflusst worden sein. Da die SERCA-Pumpe u.a. durch  $\text{Ca}^{2+}$  über Phospholamban und Calmodulin Kinasen aktiviert wird (Erkasap, 2007; Vangheluwe et al., 2005) ist es auch möglich, dass in Vorhofzellen deshalb ein kleineres  $\tau_2$  zu beobachten ist als in Ventrikelzellen, da die Koffein-induzierte Amplitude größer und damit die Menge des ins Zytoplasma freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  größer ist als in Ventrikelzellen und so verstärkt die SERCA-Pumpe aktiviert.

### 5.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei einsetzender elektrischer Stimulation nach Ruhebedingungen

Die Untersuchung der Höhe der Amplitude der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei einsetzender elektrischer Stimulation zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Ventrikel- und Vorhofzellen. Da jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR in Vorhofzellen deutlich erhöht ist gegenüber Ventrikelzellen, bedeutet dies, dass der Anteil des im SR enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$ , der bei der ersten Amplitude ausgeschüttet wird, bei Vorhofzellen geringer ist als bei Ventrikelzellen. Die berechnete fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente beträgt bei Ventrikelzellen ca. das Doppelte der fraktionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Vorhofzellen. Dies könnte daraus resultieren, dass Vorhofzellen weniger T-Tubuli als Ventrikelzellen oder keine T-Tubuli besitzen und somit weniger L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vorhanden sind. Dadurch strömt bei einem AP weniger  $\text{Ca}^{2+}$  von außen in die Vorhofzellen und es wird im Rahmen des CICR ein geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anteil aus dem SR von Vorhofzellen freigesetzt als in Ventrikelzellen.

Beim Vergleich der Höhe der Amplitude der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mit der Amplitude unter Gleichgewichtsbedingungen, zeigt sich bei Zellen von allen drei Gewebetypen eine erhöhte Amplitude nach Ruhebedingungen im Vergleich zu Gleichgewichtsbedingungen, was bei Ventrikelzellen besonders stark ausgeprägt ist. Dieses Post Rest Verhalten wird als Post Rest Potentiation (PRP) bezeichnet. Die Erhöhung der Amplitude der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach einer Ruhephase kann durch eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR während der Ruhephase oder durch eine erhöhte fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung direkt nach der Ruhephase verursacht werden. Da sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR unter Gleichgewichtsbedingungen bei allen drei Kardiomyozytentypen nicht sehr stark von der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR unter Ruhebedingungen unterscheidet und sie nur bei Zellen aus dem rechten Vorhof signifikant erhöht ist, das PRP bei Ventrikelzellen jedoch sehr viel stärker ausgeprägt ist als bei Vorhofzellen, kann daraus geschlossen werden, dass die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Ventrikelzellen bei der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente nach Ruhe stark erhöht ist gegenüber Gleichgewichtsbedingungen. Bei Vorhofzellen scheint diese fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach Ruhe nicht so stark erhöht zu sein.

### 5.3.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase unter Gleichgewichtsbedingungen

Werden Kardiomyozyten nach der ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten weiter stimuliert, erreichen sie nach einer Zeit, die von der Stimulationsfrequenz abhängig ist, Gleichgewichtsbedingungen. In diesem Gleichgewicht wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling ebenfalls streng kontrolliert und reguliert, um immer wieder erneut die Voraussetzungen für gleichbleibende  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu schaffen.

Die diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  unterscheidet sich im Gleichgewicht – wie unter Ruhebedingungen – bei Zellen aus Ventrikel und den Vorhöfen nicht signifikant. Bei steigenden Frequenzen nimmt die diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei allen Zelltypen leicht zu, jedoch ebenfalls nicht signifikant. Dieser nicht-signifikante Anstieg könnte daran liegen, dass bei höherer Stimulationsfrequenz für die Transportmechanismen nicht mehr ausreichend Zeit zur Verfügung steht, alles  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aus dem Zytosol zu entfernen.

Gibt man zu Kardiomyozyten, die bei 0,5 Hz unter Gleichgewichtsbedingungen stimuliert werden, nach einer kurzen Stimulationspause Koffein zu, kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR unter Bedingungen ermittelt werden, die den Gleichgewichtsbedingungen sehr nahe kommen. Bei Ventrikelzellen zeigte sich eine um mehr als die Hälfte kleinere  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR im Vergleich zu den Vorhofzellen, was bereits unter Ruhebedingungen beobachtet werden konnte. Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  der Koffein-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unterscheiden sich unter Gleichgewichtsstimulation nicht von den Zeitkonstanten unter Ruhebedingungen:  $\tau_1$  der rechten Vorhofzellen ist am größten und signifikant erhöht gegenüber den Ventrikelzellen,  $\tau_2$  ist in Ventrikelzellen signifikant am größten und in Zellen des linken Vorhofs signifikant am kleinsten. Dies deutet darauf hin, dass die Vorgänge, um die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR zu regulieren, unter Gleichgewichtsbedingungen ähnlich sind zu denen unter Ruhebedingungen.

Betrachtet man die absolute Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei 0,5 Hz, fällt auf, dass die absoluten Amplituden in Ventrikelzellen signifikant kleiner sind. Da das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  nicht unterschiedlich war, liegt der Grund dafür in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR und in der fraktionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -

Freisetzung ist im Ventrikel jedoch leicht erhöht gegenüber rechtem und linkem Vorhof, von denen der rechte Vorhof die geringste fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aufweist. Die geringere absolute Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beruht in Ventrikeln daher vermutlich auf der geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR.

Vergleicht man die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR unter Ruhebedingungen mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR bei einer elektrischen Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, kann keine Änderung festgestellt werden. Um Aussagen darüber treffen zu können, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR bei höheren Aktivitäten von Kardiomyozyten steigt, müsste dies noch bei anderen Frequenzen getestet werden. Da sich bei zwischen 0 Hz und 0,5 Hz keinen Unterschied in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR ergibt, sich jedoch die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verändert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass sich statt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR eher die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ändert, wenn die Stimulationsfrequenzen ändern. Dies müsste jedoch in weiteren Experimenten belegt werden.

Die Amplitude der Erhöhung der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$  ist die Basis für die Kontraktionskraft der Myozyte bei elektrischer Stimulation. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob sich die Kontraktionskraft der Zellen bei steigenden Frequenzen ändert und sich zwischen Zellen des Ventrikels und der Vorhöfe unterscheidet, wurden die Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den drei Zelltypen bei steigender Stimulationsfrequenz untersucht.

Es zeigte sich, dass die Ventrikelzellen bei der niedrigsten Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz eine geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude aufweisen als die Zellen der beiden Vorhöfen. Mit steigender Stimulationsfrequenz nimmt die Amplitude in den Vorhofzellen ab, während sie in den Ventrikelzellen ansteigt, so dass sich die Amplituden so stark annähern, dass kein signifikanter Unterschied bei den höheren Frequenzen mehr zu beobachten ist.

Da im Vergleich von Gleichgewichtsbedingungen bei 0,5 Hz und Ruhebedingungen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR bei den Zellen aus Ventrikel und aus dem linken Vorhof unverändert und nur bei Zellen des rechten Vorhofs leicht signifikant erhöht ist, deutet dies darauf hin, dass die Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude in

Ventrikelzellen und die Abnahme in Vorhofzellen eine andere Ursache als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR hat.

Eine mögliche Ursache für die Amplitudenabnahme bei steigender Stimulationsfrequenz ist eine Verringerung der fraktionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Da diese direkt nach Ruhe höher als im Gleichgewicht ist, wäre es denkbar, dass sie in Vorhofzellen bei steigender Stimulationsfrequenz weiter abnimmt. Dies müsste durch weitere Experimente, bei denen die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung auch bei anderen Frequenzen ermittelt wird, belegt werden.

Da die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Ventrikelzellen steigt, scheint hier ein anderer Mechanismus vorzuliegen. Zum einen könnte die fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, statt weiter zu sinken, wieder zunehmen. Eine andere Erklärung könnte eine mit der Stimulationsfrequenz steigende Menge an Trigger- $\text{Ca}^{2+}$  sein, die die aus dem SR freigesetzte Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aufgrund einer anderweitig regulierten Aktivität der RyR nicht beeinflusst.

In den Experimenten mit längerer konstanter elektrischer Stimulation (z.B. ET-1-Experimente), die ebenfalls mit Zellen aus Ventrikel und beiden Vorhöfen durchgeführt wurden, hat sich gezeigt, dass bei Kontrollzellen, die weder im Vorfeld noch während der Experimente mit einem Hormon in Kontakt kamen, die Amplitude der elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz über die Versuchsdauer zunimmt. Diese Erhöhung liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie die Erhöhung bei den Ventrikelzellen in diesem Experiment. Die Herkunft und Vorbereitung dieser Kontrollzellen war jeweils die gleiche wie bei den Zellen dieses Experimentes, nur wurde während des ET-1-Experimentes konstant mit einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz stimuliert, statt mit einer Ruhephase zu beginnen und die Stimulationsfrequenz stufenweise zu erhöhen. Es scheint in den ET-1-Experimenten so, dass Zellen aus Ventrikel und Vorhöfen eine zeitabhängige Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude aufweisen, die z.B. aufgrund einer Stoffwechselaktivierung bestehen könnte. In den ET-1-Experimenten zeigen jedoch sowohl Ventrikel- als auch Vorhofzellen diese Erhöhung in der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. In den Experimenten dieses Kapitels nimmt nur die Amplitude in den Ventrikelzellen zu, während die Amplitude in den Zellen aus beiden Vorhöfen im Verlaufe des Experimentes mit steigender elektrischer

Stimulationsfrequenz abnimmt. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Erhöhung der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Ventrikelzellen nicht von der steigenden Stimulationsfrequenz herrührt, sondern zeitabhängig ist. In den Vorhofzellen jedoch kann während einer Erhöhung der Stimulationsfrequenz eine Veränderung der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet werden, die gegenläufig zu der möglicherweise zeitabhängigen Entwicklung während des ET-1-Experimentes ist. Daher ist in Vorhofzellen neben einer eventuellen Zeitabhängigkeit auf jeden Fall zusätzlich auch von einer Frequenzabhängigkeit auszugehen. Um zu untermauern, dass in Ventrikel- und Vorhofzellen eine Zeitabhängigkeit bezüglich der Höhe der Transientenamplitude besteht, wären weitere Experimente unter Beibehaltung konstanter Stimulationsfrequenzen und mit einer Veränderung der Stimulationsfrequenz notwendig, die keine steigende Abfolge darstellt, z.B. eine fallende Stimulationsfrequenz oder Stimulationsfrequenzen mit einer willkürlich gewählten Reihenfolge.

#### **5.3.4 Speziesunterschiede in der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei Ratte und Maus**

Viele der Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, die in dieser Arbeit bei Mäuse-Kardiomyozyten ermittelt wurden, verhalten sich ähnlich zu Beobachtungen, die von Walden et al. bei Ratten-Kardiomyozyten gemacht wurden (Walden et al., 2009).

Dennoch gibt es auch abweichende Ergebnisse, die von Speziesunterschieden zwischen Mäusen und Ratten herrühren könnten.

Gemeinsamkeiten, die bei Vorhofzellen im Vergleich zu Ventrikelzellen beobachtet werden können, sind die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR, eine verringerte fraktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, eine schnellere SERCA-abhängige Aufnahme des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR und eine geringere Bedeutung des sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux-Mechanismus.

Abweichend zu den Ergebnissen dieser Arbeit stellte Walden et al. fest, dass bei Ratten die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei der von ihm verwendeten Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz in Ventrikelzellen größer ist als in Vorhofzellen. Bei meinen Untersuchungen an Mäuse-Kardiomyozyten zeigen die Experimente den umgekehrten Fall: die Amplitude bei 0,5 Hz ist in Ventrikelzellen niedriger als in

Vorhofzellen. Da eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung auf eine verstärkte Kontraktionskraft hinweist, ist es möglich, dass die Vorhofzellen von Mäusen eine relativ gesehen größere Kontraktionskraft entwickeln als dies bei Ratten der Fall ist.

Mäuse besitzen mit 550 – 650 Schlägen/min eine höhere Herzfrequenz als Ratten mit 250 – 400 Schlägen/min ([www.tierklinik-oberhaching/tierlexikon](http://www.tierklinik-oberhaching/tierlexikon)). Da bei hoher Herzfrequenz vor allem die Diastole, also die Füllphase des Ventrikels, verkürzt ist, besteht bei der Maus möglicherweise die Notwendigkeit, durch eine aktivere Vorhofkontraktion die Befüllung des Ventrikels zu unterstützen, was durch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude in den Vorhofzellen ermöglicht werden kann.

Unveröffentlichte Ergebnisse von Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Lipp an der Universität des Saarlandes zeigen, dass nicht nur Ventrikelzellen, sondern auch Vorhofzellen von Mäusen Tubuli, Einstülpungen der Plasmamembran, aufweisen. In Kardiomyozyten aus linken Vorhöfen finden sich Strukturen ähnlich zu den T-Tubuli von Ventrikelzellen, während sie in Kardiomyozyten aus rechten Vorhöfen eher longitudinalen Charakter haben. Im Gegensatz dazu konnten in Rattenvorhofzellen keine tubulären Membranstrukturen nachgewiesen werden. Da diese Unterschiede zwischen Ratten- und Mäusevorhofzellen den Membrantransport beeinflussen, können die Unterschiede im Amplitudenverhalten bei Vorhof- und Ventrikelzellen z.B. dadurch hervorgerufen werden.

### **5.3.5 Bedeutung der Unterschiede zwischen verschiedenen Kardiomyozytentypen für Arrhythmien in Ventrikeln und Vorhöfen**

Es existieren zahlreiche Belege, dass eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR durch eine Erhöhung der Öffnung der RyR zu spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus einzelnen Clustern von RyR, den sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks führt, die bei zeitlich und lokal gehäuftem Auftreten eine sich selbst verstärkende  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR bewirken, die durch Summation zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle werden kann (Eisner et al., 2007; Bers, 2002; Berridge et al., 2000). Das  $\text{Ca}^{2+}$ , das aus dem SR freigesetzt wird, aktiviert den NCX, der ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gegen 3  $\text{Na}^{+}$ -Ionen aus der Zelle transportiert. Da es sich hier um einen elektrogeneren Transport handelt, ändert sich das Membranpotenzial, so dass bei ausreichend hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport der Schwellenwert für das Membranpotenzial erreicht wird, an dem eine verspätete

Nachdepolarisation (delayed afterdepolarisation, DAD) ausgelöst wird. Sind erregbare Nachbarzellen vorhanden, kann die Erregung auf diese übergreifen, so dass eine ektopische Erregung entsteht, die ggf. Teile des Herzens oder das ganze Herz erfassen kann. Da in dieser Arbeit eine im Vergleich zu den Ventrikelzellen erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR in den Vorhofzellen beobachtet werden konnte, ist es denkbar, dass solche ektopische Erregungen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit in Vorhöfen auftreten als in Ventrikelzellen und zu Vorhofflimmern führen können. Entsteht die ektopische Erregung in den Vorhöfen, verhindern meist die elektrische Isolationsschicht durch Bindegewebe zwischen Vorhöfen und Ventrikeln sowie die Frequenz-Filterfunktion des AV-Knotens, dass sich die Arrhythmien auf den Ventrikel übertragen.

#### **5.4 Endothelin-1**

In Anbetracht diverser Unterschiede von Zellen der beiden Vorhöfe zueinander und zu Ventrikelzellen ist es wahrscheinlich, dass auch im Hinblick auf chronische ET-1-Gaben (während zwei Wochen über eine in die Maus transplantierte osmotische Minipumpe) und akute ET-1-Gaben während der Einzelzelleexperimente unterschiedliche Effekte existieren, da ET-1 mit Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling interagiert, wie ECC und CICR. Diese Effekte könnten in der Expression von Komponenten des Signalwegs oder in der Regulation deren Aktivität begründet sein. Für Vorhof-Kardiomyozyten aus Mäusen konnte in der Literatur gezeigt werden, dass eine akute Zugabe von ET-1 während Einzelzell-Experimenten eine Erhöhung der Amplitude von elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bewirkt (Li et al., 2005; McKenzie et al., 2002). Welche Auswirkungen eine chronische Gabe von ET-1 auf diesen Parameter bei Kardiomyozyten unterschiedlichen Ursprungs hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Experimenten mit Mäusen untersucht, denen subkutan eine mit NaCl- bzw. ET-1-Lösung gefüllte osmotische Minipumpe implantiert wurde.

Bei Vorhofzellen, die Mäusen mit einer NaCl-Kontrollpumpe entnommen wurden, kann eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transientenamplitude bei akuter ET-1-Zugabe beobachtet werden, während dies bei Ventrikelzellen nicht der Fall ist.

Ein Beleg, der für die im Vergleich zu den Ventrikelzellen sichtbare Reaktion der Vorhofzellen auf ET-1 spricht, ist die Beobachtung, dass IP<sub>3</sub>-Rezeptoren zwar gegenüber RyR in beiden Zelltypen unterrepräsentiert sind, jedoch Vorhof-Kardiomyozyten im Verhältnis zu RyR mehr IP<sub>3</sub>-Rezeptoren enthalten als Ventrikel-Kardiomyozyten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ET-1 über den IP<sub>3</sub>-Signalweg zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Amplitude bei elektrisch ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-Signalen und somit zur Unterstützung der Kontraktionskraft in Vorhof-Kardiomyozyten von verschiedenen Tierspezies, u.a. Mäusen, führt, während dies bei Ventrikel-Kardiomyozyten noch nicht geklärt ist. In Ventrikelzellen hat die Mehrheit der Studien ergeben, dass der vorherrschende Effekt der Aktivierung von IP<sub>3</sub>R die Stimulation von Arrhythmien ist (Kockskämper et al., 2008; Li et al., 2005). Higazi und Kollegen haben gezeigt, dass ET-1 auf Ventrikelzellen von Ratten einen hypertropen Effekt hat, der abhängig von IP<sub>3</sub>-induzierter Calcium-Freisetzung war, jedoch nicht abhängig vom ECC war. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Frequenz von spontanen Ca<sup>2+</sup>-Transienten signifikant erhöht war, jedoch nicht abhängig von IP<sub>3</sub>-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung war. Dies kann bedeuten, dass Effekte von ET-1 auf die Eigenschaften und die Physiologie von Kardiomyozyten nicht unbedingt von einer Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Transienten-Amplitude begleitet werden müssen (Higazi et al., 2009).

Bei der Untersuchung der Mäuse, denen eine ET-1-Pumpe implantiert wurden, ist nur bei Zellen des rechten Vorhofs eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Transientenamplitude bei akuter ET-1-Zugabe zu beobachten.

Da die Grundcharakterisierung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bei Kardiomyozyten verschiedenen Ursprungs bei einigen Parametern Unterschiede zwischen Zellen aus den rechten und linken Vorhöfen aufgezeigt hat, ist es durchaus möglich, dass die chronische ET-1-Gabe nur auf die Zellen eines Vorhofs Auswirkungen zeigt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass eine chronische ET-1-Gabe die Wirkung der akuten ET-1-Gabe im rechten Vorhof aufhebt, könnte eine vorhofspezifische Desensibilisierung von Komponenten des ET-1-/IP<sub>3</sub>-Signalweges sein oder eine Herabregulierung der Transkription dieser Komponenten.

An dieser Stelle wäre es wünschenswert gewesen, die ET-1-Plasmakonzentrationen ermitteln zu können, jedoch war dies mit den vom AnalySELabor

verwendeten Tests nicht möglich. So hätte eine Aussage darüber getroffen werden können, ob die subkutane Infusion überhaupt Auswirkungen auf die Konzentration von ET-1 im Blut der Mäuse hat. Es kann z.B. nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass eine exogene Zugabe von ET-1 zur Folge hat, dass ein Degradationsmechanismus aktiviert wird, so dass Abbau des ET-1 vor der Möglichkeit der kardialen Wirkung eintritt, oder dass kein Übertritt ins Blut stattfindet. Aufgrund eines signifikanten Unterschiedes bei der Reaktion auf akutes ET-1 in Zellen des linken Vorhofs zwischen Mäusen mit NaCl- und ET-1-Pumpe kann jedoch davon ausgegangen werden, dass chronisch subkutan verabreichtes ET-1 seine Wirkung entfalten kann.

### **5.5 Einfluss des TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup>-Knockout auf die Amplitudenhöhe von elektrisch induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten**

TRPC-Kanäle stehen im Verdacht, an der Entwicklung von Herzkrankheiten, wie z.B. Hypertrophie, beteiligt zu sein und eine wichtige Rolle im Ca<sup>2+</sup>-Haushalt zu spielen (Seth et al., 2009; Nishida et al., 2008; Ohba et al., 2007; Seth et al., 2004). Für die beiden Mitglieder TRPC1 und TRPC4 liegen Hinweise vor, in die Entstehung von Hypertrophie involviert zu sein (Wu et al., 2010; Seth et al., 2009; Ohba et al., 2007). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Fehlen der TRPC1- und TRPC4-Kanäle Auswirkungen auf das Ca<sup>2+</sup>-Signaling bei elektrischer Stimulation mit und ohne akute  $\beta$ -adrenerge Stimulation hat. Diese Beobachtungen wurden bei Zellen von Mäusen durchgeführt, bei denen eine hypertrophe Antwort durch chronische Gabe von Isoproterenol induziert wurde, und bei einer Kontrollgruppe, die eine chronische Gabe einer 0,9%igen NaCl-Lösung erhielt.

$\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol bewirkt eine Erhöhung der SR-Beladung. Durch die Phosphorylierung von Phospholamban kommt es zu einer Disinhibition der SERCA, was zur Erhöhung der SR-Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme und Erhöhung der SR-Beladung führt (Eisner et al., 2009; Pogwizd et al., 2002). Diese Zunahme der luminalen [Ca<sup>2+</sup>] im SR bewirkt eine Erhöhung der Amplitude von Ca<sup>2+</sup>-Transienten. Physiologisch trägt dies zum positiv inotropen Effekt der SERCA-Stimulation während  $\beta$ -adrenerger Stimulation oder erhöhter Herzrate bei (Eisner et al., 2009).

In der Serie von Experimenten, in denen keine akute  $\beta$ -adrenerge Stimulation während der Einzelzellmessungen ausgelöst wurde, hatte ein gleichzeitiger Knockout der TRPC1- und TRPC4-Kanäle keine Auswirkung auf die Amplitude von elektrisch ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Die Anwesenheit bzw. das Zusammenspiel von TRPC1- und TRPC4-Kanälen scheint demnach keine tragende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung unter normalen Gleichgewichtsbedingungen zu spielen. Ebenfalls ohne Bedeutung für die Transientenamplituden war hier, ob die Tiere eine chronische Gabe Isoproterenol oder NaCl-Lösung erhielten. Die Induktion einer hypertrophen Antwort scheint demnach keine Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung zu haben.

In den Experimenten, in denen die Kardiomyozyten durch Isoproterenolgabe während der Einzelzellmessungen akut  $\beta$ -adrenerg stimuliert wurden, war ein signifikanter Einfluss der chronischen Isoproterenolgabe zu beobachten, nicht aber der Abwesenheit der TRPC1- und TRPC4-Kanäle durch den TRPC1C4-Doppel-Knockout. Die durch Isoproterenol ausgelöste Zunahme der Amplitude der elektrisch induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten war in Zellen aus Tieren mit einer Isoproterenol-Pumpe signifikant geringer als in Zellen aus Tieren mit einer NaCl-Pumpe, unabhängig davon, ob es sich um wt- oder TRPC1/C4<sup>-/-</sup>-Mäuse handelte. Die Anwesenheit bzw. das Zusammenspiel von TRPC1- und TRPC4-Kanälen spielt demnach vermutlich auch keine bedeutende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung unter Gleichgewichtsbedingungen bei erhöhter Herzaktivität durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation.

Die verringerte Amplitudenzunahme bei Mäusen mit einer Isoproterenolpumpe unter akuter Isoproterenolgabe könnte aus einer Desensibilisierung des Isoproterenol-Signalwegs durch die chronische Isoproterenolgabe resultieren. Diese Desensibilisierung könnte durch verschiedene Mechanismen wirken. Denkbar ist z.B. eine Herabregulierung von Komponenten des Signalweges aufgrund verringerter Transkription und/oder Translation oder Hemmung ihrer Aktivität; ebenso könnte durch die chronische Isoproterenolgabe der Abbauweg für Isoproterenol stärker aktiviert worden sein. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der verringerten Amplitudenzunahme sind Effekte durch die induzierte Hypertrophie-Antwort; es könnten hier Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling ausgelöst worden sein, die einer Amplitudenzunahme durch akutes Isoproterenol teilweise entgegenwirken.

Unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Prof. Peter Lipp an der Universität des Saarlandes zeigen, dass die basale zytosolische  $[Ca^{2+}]$  und die SR-Beladung mit  $Ca^{2+}$  in Ventrikelzellen von TRPC1/C4<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant verringert sind. Außerdem konnte in konfokalmikroskopischen Einzelzell-Experimenten gezeigt werden, dass das Fehlen von TRPC1- und TRPC4-Kanälen verschiedene Eigenschaften von spontanen  $Ca^{2+}$ -Sparks verändert. Dies konnte sowohl bei Vorhof- als auch bei Ventrikelzellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPC1 und TRPC4 zur Aufrechterhaltung der basalen zytosolischen  $[Ca^{2+}]$  beitragen, vermutlich über eine Änderung des Membranpotenzials und dadurch über eine Erhöhung der Triebkraft für einen  $Ca^{2+}$ -Eintritt (Hammer, 2009), und keine der Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Transienten involvieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Cingolani HE, Perez NG (2005) Endothelin-1 stimulates the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger reverse mode through intracellular Na<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup><sub>i</sub>)-dependent and Na<sup>+</sup><sub>i</sub>-independent pathways. *Hypertension*, 45:288-293
2. Allesie M, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*, 54: 230-246
3. Berkova Z, Morris AP, Estes MK (2003) Cytoplasmic calcium measurement in rotavirus enterotoxin-enhanced green fluorescent protein (NSP4-EGFP) expressing cells loaded with Fura-2. *Cell Calcium*, 34: 55-68
4. Berlin JR, Konishi M (1993) Ca<sup>2+</sup> transients in cardiac myocytes measured with high and low affinity Ca<sup>2+</sup> indicators. *Biophys J*, 65(4): 1632-1647
5. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of Calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1): 11-21
6. Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Second ed., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
7. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415: 198-205
8. Bers DM (2008) Calcium cycling and signalling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70: 23-49
9. Bolsover S, Ibrahim O, O'Luanaigh N, Williams H, Cockcroft S (2001) Use of fluorescent Ca<sup>2+</sup> dyes with green fluorescent protein and its variants: problems and solutions. *Biochem. J*, 356: 345-352

10. Bootman MD, Harzheim D, Smyrniak I, Conway SJ, Roderick HL (2007) Temporal changes in atrial EC-Coupling during prolonged stimulation with Endothelin-1. *Cell Calcium*, 42: 489-501
11. Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garciaarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camilionde Hurtado MC, Aiello EA (2006) The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension*, 47: 727-734
12. Dobrev D, Ravens U (2003) Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*, 98: 137-148
13. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U (2005) The G protein-gated potassium current I(K, Ach) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 112: 3697-3706
14. Eisner DA, Kashimura T, Venetucci LA, Trafford AW (2009) From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias. *Circ J*, 73: 1561-1567
15. Erkasap N (2007) SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new? *Anadolu Kardiyol Derg*, 7 Suppl. 1: 43-36
16. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260 (6): 3440-3450
17. Hammer K (2009) High resolution 3D-Imaging of the physiology and morphology of isolated adult cardiac myocytes from rat. Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität des Saarlandes, Deutschland, Homburg/Saar
18. Harhammer R, Nürnberg B, Harteneck C, Leopoldt D, Exner T, Schultz G (1996) Distinct biochemical properties of the native members of the G12 G-protein subfamily. *Biochem. J*, 319: 165-171

19. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC (2006) Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J*, 27: 949-953
20. Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM, Talasila A, Corps EM, Ritter O, McDonald F, Mikoshiba K, Bootman MD, Roderick HL (2009) Endothelin-1-stimulated InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Molecular Cell*, 33: 472-482
21. Ho KM, Lewis JP (2010) Prevention of atrial fibrillation in cardiac surgery: Time to consider a multimodality pharmacological approach. *Cardiovasc Ther*, 28: 59-65
22. Hoff J (2000) Methods of blood collection in the Mouse. *Lab Animal*, 29 (10): 47-53
23. Invitrogen/Molecular Probes: The Handbook – A guide to fluorescent probes and labeling technologies; [www.probes.com](http://www.probes.com)
24. Kockskämper J, Zima AV, Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD (2008) Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 45: 128-147
25. Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM (1997) Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res*, 80(1): 69-75
26. Li X, Zima AV, Sheikh F, Blatter LA, Chen J (2005) Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> signalling in atrial myocytes of Inositol-1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)-receptor type 2-deficient mice. *Circ Res*, 96: 1274-1281
27. Lian X, Xie H, Zhu PH, Hu J, Zhao Q, Wang CS, Yang C (2009) Enhanced Activity of Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptors in Atrial Myocytes of Atrial Fibrillation Patients. *Cardiology*, 114: 180-191

28. Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, Bootman MD (2000) Functional InsP<sub>3</sub> receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current Biology*, 10: 939-94
29. Mackenzie L, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P (2001) Predetermined recruitment of calcium release sites underlies excitation-contraction coupling in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 530 (3): 417-429
30. Mackenzie L, Bootman MD, Laine M, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Li WH, Lipp P (2002) The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca<sup>2+</sup> signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 541 (2): 395-409
31. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ (1992) Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*, 85: 1374-1379
32. Muschol M, Dasgupta BR, Salzberg BM (1999) Caffeine interaction with fluorescent calcium indicator dyes. *Biophys J*, 77: 577-586
33. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*, 415: 219-225
34. Neuberger HR, Schotten U, Verheule S, Eijsbouts S, Blaauw Y, van Hunnik A, Allessie M (2005) Development of a substrate of atrial fibrillation during chronic atrioventricular block in the goat. *Circulation*, 111: 30-37
35. Neves SR, Prahlad T, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science*, 296: 1636-1639
36. Nishida M, Kurose H (2008) Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 378 (4): 395-406

37. Ohba T, Wantabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, Kuromitsu S, Mori Y, Ono K, Iijima T, Ito H (2007) Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42 (3): 498-507
38. O'Neill SC, Donoso P, Eisner DA (1990) The role of  $[Ca^{2+}]$  sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Caffeine]_i$ . *J Physiol*, 425, 55-70
39. Petr MJ, Wurster RD (1997) Determination of in situ dissociation constant for Fura-2 and quantitation of background fluorescence in astrocyte cell line U373-MG. *Cell Calcium*, 21(3): 233-240
40. Pogwizd SM, Bers DM (2002) Calcium cycling in heart failure: The arrhythmia connection. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13: 88-91
41. Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G (1997) Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 18: 254-258
42. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68: 619-647
43. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450: 383-387
44. Rang PH, Dale MM, Ritter JM (2003) *Pharmacology*. Fifth ed., Churchill Livingstone
45. Schotten U, Neuberger HR, Allessie MA (2003) The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. *Prog Biophys Mol Biol*, 82: 151-162

46. Seth M, Sumbilla C, Mullen SP, Lewis D, Klein MG, Hussain A, Soboloff J, Gill DL, Inesi G (2004) Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (47): 16683-16688
  
47. Seth M, Zhang ZS, Mao L, Graham V, Burch J, Stiber J, Tsiokas L, Winn M, Abramowitz J, Rockman HA, Birnbaumer L, Rosenberg P (2009) TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ Res*, 105 (10): 1023-1030
  
48. Shih HT (1994) Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J*, 21(1): 30-41
  
49. Tallini YN, Ohkura M, Choi B, Ji G, Imot K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin H, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Naki J, Kotlikoff MI (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal  $\text{Ca}^{2+}$  indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 4753-4758
  
50. Trafford AW, Díaz ME, Negretti N, Eisner DA (1997) Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  current and decreased  $\text{Ca}^{2+}$  efflux restore Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content after depletion. *Circ Res* 81: 477-484
  
51. Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F (2005) Modulation of sarco(endo)plasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 2 (SERCA2) activity: Cell biological implications. *Cell Calcium*, 38: 391-302
  
52. Walden AP, Dibb KM, Trafford AW (2009) Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 46: 463-473
  
53. Wang J, Schwinger RH, Frank K, Muller-Ehmsen J, Martin-Vasallo P, Pressley TA, Xiang A, Erdmann E, McDonough AA (1996) Regional expression of sodium

- pump subunits isoforms and  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the human heart. *J Clin Invest*, 98: 1650-1658
54. Wantabe H, Murakami M, Ohba T, Ono K, Ito H (2009) The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ J*, 73 (3): 419-427
55. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991) Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The Framingham study. *Stroke*, 22: 983-988
56. Wu X, Eder P, Chang B, Molkenin (2010) TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(15): 7000-7005

## 7 Publikationen

Kaestner, L., Tabellion, W., Weiss, E., Bernhardt, I., Lipp, P. (2006). Calcium imaging of individual erythrocytes: problems and approaches. *Cell Calcium* 39 (1), 13-9

Kaestner, L., Tabellion, W., Lipp, P., Bernhardt, I. (2004). Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: An indicator for a blood clot formation process. *Thrombosis and Haemostasis* 92, 1269-1272

Kaestner, L., Tabellion, W., Weiss, E., Lipp, P., Bernhardt, I. (2004). Signal molecules trigger calcium influxes into human erythrocytes. *EJCB* 83 Suppl. 54, 29

Kaestner, L., Tabellion, W., Weiss, E., Lipp, P., Bernhardt, I. (2004). Signal molecules trigger calcium influxes into human erythrocytes. *Pflügers Arch.* 447, 126

Bernhardt, I., Weiss, E., Tabellion, W., Kaestner, L. (2004). Molecular, membrane and cellular aspects of the function of biosystems (in Russian), international conference of biophysics, congress contributions, volume 1, pages 299-301, Minsk, 2004 (ISBN: 985-457-262-5)

## 8 Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, bedanke ich mich herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Peter Lipp für die Überlassung meines Promotionsthemas. Ebenfalls danke ich ihm und meinem Betreuer Dr. Lars Kästner herzlich für die Betreuung und die anregenden Diskussionen zu meiner Arbeit, die sehr bereichernd für mich waren.

Ich danke vielmals Anne Vecerdea aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Lipp für die unermüdliche Unterstützung bei der Isolation der Maus-Kardiomyozyten.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Marc Freichel für die Bereitstellung der TRPC1<sup>-/-</sup>C4<sup>-/-</sup>-Mäuse und Prof. Dr. Michael Kotlikoff für die Überlassung des GCaMP2-Mausstammes.

Herzlichsten Dank sage ich auch meinem Mann, Dr. Marc Bossmann, der mir stets ein wertvoller Diskussionspartner ist und mir jederzeit zur Seite steht, und meinen Eltern, Isolde und Hans Günter Tabellion, die immer für mich da sind und mich bei allen Zielen unterstützen.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die Aufnahme in die Promotionsförderung und für die ideelle sowie finanzielle Förderung.

Außerdem danke ich dem Graduiertenkollegs 1326 „Calcium Signalling and Cellular Nanodomains“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Universität des Saarlandes für die Unterstützung meiner Arbeit.