

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

Untersuchungen zur Bedeutung des G_q -Signalweges im Säugerherz durch gezielte Aktivierung mittels DREADD-Strategie

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Theoretischen Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von Elisabeth Kaiser

geboren am 18.01.1985 in Ried im Innkreis

Tag der Promotion: 17. Januar 2022
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. P. Lipp
Prof. Dr. U. Boehm

Für Mark

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Das Herz-Kreislaufsystem	5
3.1.1 Grundlegender Aufbau und Funktion des Herzens	5
3.2 Die elektrische Tätigkeit des Herzens	7
3.2.1 Grundsätzliche Mechanismen	7
3.2.2 Pathologie der elektrischen Herztätigkeit	9
3.3 Das Elektrokardiogramm (EKG)	11
3.3.1 Nomenklatur des elektrischen Herzzyklus	12
3.3.2 Arrhythmien im EKG	15
3.3.3 Unterschiede der elektrischen Aktivität des Herzens zwischen Mensch und Maus	16
3.4 G-Protein vermittelte Signalkaskaden	19
3.4.1 $G_{q/11}$ vermittelte Signalwege	22
3.4.2 DREADDS	24
3.5 Ziele der Arbeit	27
4 Material und Methoden	28
4.1 Tiere	28
4.1.1 Tierhaltung	29
4.1.2 Verwendete Primer für die Genotypisierung	30
4.2 Verwendete Chemikalien	31
4.3 Puffer und Lösungen	35
4.4 Verwendete Messsysteme, Software, Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
4.4.1 Spezielle Messsysteme inklusive Software	39
4.4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	41
4.5 Immunoblotanalyse (Western Blot)	43
4.5.1 Proteinaufschluss	43
4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	43
4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
4.5.4 Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran	44
4.5.5 Immunologische Proteindetektion	45

4.6	Untersuchung der Versuchstiere	45
4.7	EKG- und Blutdruckmessung <i>in-vivo</i>	46
4.7.1	Vor- und Aufbereitung des Radiotelemetrie-Implantates	46
4.7.2	Einsetzen des Radiotelemetrie-Implantates	47
4.7.3	Ansetzen von CNO in isotonischer Kochsalzlösung	49
4.7.4	Messung	50
4.8	CNO-Plasmabestimmung	51
4.9	Isoliertes Herz nach Langendorff	52
4.9.1	Herzentnahme	52
4.9.2	Perfusion am Langendorff/ <i>Working Heart</i> Apparat	52
4.10	Isolierung neonataler, ventrikulärer Kardiomyozyten	55
4.11	Isolierung adulter, ventrikulärer Kardiomyozyten	56
4.12	Optische Messung der Aktionspotentiale	56
4.12.1	Farbstoffbeladung und Fluoreszenzmessung	57
4.12.2	Analyse und Auswertung	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Western Blot Analyse	59
5.1.1	Besonderheit des Proteinnachweises von Dq: Der Zeitfaktor	59
5.1.2	Gewebespezifität des Dq-Expression	60
5.1.3	Vergleich Wildtyp zu Dq-positiven Tieren sowie interindividuelle Schwankungen	62
5.2	Untersuchungen am lebenden Tier	64
5.2.1	Sterberate	64
5.2.2	Auswertung der Telemetriedaten	65
5.3	CNO Plasmakonzentration	72
5.4	Untersuchungen am isolierten Herz	72
5.4.1	Wahl des passenden Perfusionsprotokolles	72
5.4.2	Auswertung der am isolierten Herzen erhobenen Daten	72
5.5	Optische Messung der Aktionspotentiale	75
5.5.1	Aktionspotentialdauer in neonatalen Kardiomyozyten	75
5.5.2	Aktionspotentialdauer in adulten Ventrikelzellen	79
6	Diskussion	81
6.1	Auswahl des Mausmodelles	81
6.2	Verwendung von DREADD-basierter Technologie	82
6.3	Gewebe-spezifische Expression und subzelluläre Lokalisation des Dq Rezeptors	85
6.4	<i>In-vivo</i> Aktivierung von Dq	87
6.4.1	Dq-positive Mäuse haben geringgradig niedrigeres Körpergewicht als Wildtypmäuse	87
6.4.2	<i>In-vivo</i> Dq Aktivierung führt dosisabhängig zum Tod	87

6.4.3	Radiotelemetriesysteme stellen die <i>state-of-the-art</i> Methode zur Erfassung kardiovaskulärer Parameter an wachen Labortieren dar	88
6.4.4	<i>In-vivo</i> Dq Aktivierung induziert aberrante elektrische Aktivität des Herzens	90
6.4.5	Dq Aktivierung beeinträchtigt den systemischen Blutdruck	91
6.5	Störungen der elektrophysiologischen Tätigkeit lassen sich am isolierten Herzen reproduzieren	92
6.5.1	Einfluss der Readaptationphase auf die Stimulierbarkeit der Dq-gekoppelten Antwort des isolierten Herzens	93
6.6	Möglichkeiten der optischen Messung von ventrikulären Aktionspotentialen als Alternative zur Patch Clamp Technik	94
6.7	Mögliche Ursachen der veränderten Elektrophysiologie des Herzens nach Dq Aktivierung	96
6.8	Schlussfolgerung/Ausblick	97
7	Literatur	VIII
8	Lebenslauf	XXII
9	Publikationen	XXIII
10	Danksagung	XXV

Abbildungsverzeichnis

1	Abläufe und Ereignisse des Herzzyklus	6
2	Das Herz als Dipol	12
3	Entstehung der einzelnen Wellen und Zacken des EKGs	14
4	Nomenklatur und wichtige Parameter eines EKGs	15
5	Vergleich humanes Herz - Nagerherz	17
6	Aktionspotential ventrikulärer Zellen und die zugrunde liegenden Ionenströme bei Mensch und Maus	18
7	Vergleich des EKGs von Mensch und Maus	19
8	G-Protein Aktivierung	20
9	G-Protein und β -Arrestin vermittelte Signalwege für die Kontraktilität des Herzens	22
10	Struktur und Eigenschaften gängiger DREADDs	26
11	Implantation des Transmitters	48
12	Schematischer Aufbau des Langendorff Messplatzes	53
13	Proteinlokalisierung und mRNA Expression	59
14	Abhängigkeit der Proteindetektion von der Lagerung	60
15	Nachweis der Spezifität des MCK-Promotors	61
16	Ventrikelzellextrakte verschiedener Tiere (vergleichend)	62
17	Ventrikelmembranfraktionen verschiedener Tiere (vergleichend)	63
18	Körpergewicht vor Implantation des Transmitters	64
19	Überlebenszeitanalyse	65
20	Herzrate <i>in-vivo</i> vor und nach Intervention	66
21	Vergleich repräsentativer EKG-Spuren vor und nach 0,9% NaCl/CNO	67
22	Repräsentativer Verlauf des EKGs in CNO behandelten Dq-positiven Mäusen	67
23	Zeitliches Auftreten von Arrhythmien	68
24	Statistische Auswertung der Telemetriedaten	69
25	EKG-Zyklen in isolierten Herzen	73
26	Statistische Auswertung der Experimente am isolierten Herzen	74
27	Kultivierung neonataler Herzzellen	75
28	Aufzeichnung eines typischen Aktionspotentiales einer neonatalen Ventrikelzelle	76
29	Aktionspotentialdauer in neonatalen Kardiomyozyten	78
30	Verlauf der Aktionspotentiale von adulten Ventrikelzellen	79
31	Aktionspotentialdauer in adulten Kardiomyozyten	80
32	<i>Patch Clamp</i> : APD adulter Kardiomyozyten	96

Tabellenverzeichnis

3	Stichprobenzahlen der Telemetriedaten	71
4	APD in isolierten neonatalen Ventrikelzellen	77
5	APD in isolierten adulten Ventrikelzellen	80

Querformatstabellen

1	Verwendete Chemikalien	32
2	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	42

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD30	Aktionspotentialdauer 30%
APD70	Aktionspotentialdauer 70%
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Block	atrioventrikulärer Block
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
bpm	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
CAMKII	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphat</i>)
Cx43	Connexin 43
CNO	Clozapin-N-Oxid
DAG	Diacylglycerin
DIV	Zellkulturtag (<i>days in vitro</i>)
Di-8-ANEPPS	Di-8-Butylamino-Naphtyl-Ethylen-Pyridium-Propyl-Sulfonat
DREADD	<i>designer receptor exclusiveley activated by designer drugs</i>
Dq	synonym für r/hM3Dq (siehe dort)
EKG	Elektrokardiogramm
EPAC	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i> oder <i>et alie</i>)

F	Fluoreszenzintensität
G	Gauge
g	Gramm oder Maß für die Erdbeschleunigung ($1\text{ g} = 9,80665\text{ m/s}^2$)
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein-coupled receptor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
Hz	Hertz
H ₂ O	(Reinst-) Wasser
ICU	<i>imaging control unit</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Ktr.	Kontrolle
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck (<i>mean arterial pressure</i>)
MCK	<i>muscle creatine kinase</i>
mf	Membranfraktion
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule ($1\text{ mm Hg} = 133,322\text{ Pascal}$)
min	Minuten
mM	millimolar
n	Stichprobe
n.a.	nicht angegeben
ns.	nicht signifikant
Obj	Objektiv
PKA	Proteinkinase A

RyR	Ryanodinrezeptor
r/hM3Dq	in der Arbeit verwendeter DREADD (<i>rat/human M3 muscarinic DREADD receptor coupled to G_q</i>)
s	Sekunden
s.c.	<i>subcutan</i>
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
ze	Zellextrakt
zf	Zytosolische Fraktion
0,9% NaCl	Isotonische Kochsalzlösung

1 Zusammenfassung

Das Herz ist der Motor des menschlichen Lebens - sistiert der Herzschlag, ist der Untergang aller anderen Organe und letztendlich der Tod eine Frage weniger Augenblicke. Eine Vielzahl an Mechanismen beeinflussen Herzentwicklung, Struktur und zu jeder Zeit die lebenswichtige Funktion, indem etwa die elektrische Impulsgenerierung und die Weiterleitung dieses Reizes modifiziert werden. Diese können adaptiv an veränderte Bedingungen sein, aber auch pathologischen Charakter haben. Viele dieser Mechanismen werden durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt, die wiederum kaskadenartig zahlreiche Vorgänge in der Zelle auslösen können. Dabei ist die Rolle G_q -Protein gekoppelter Rezeptoren bei der Modulation der elektrischen Tätigkeit des Herzens noch nicht vollständig geklärt, obwohl einige Vertreter dieser Rezeptorenfamilie, wie Endothelin-1- und Angiotensin-II-Rezeptoren, in Kardiomyozyten von Säugern vorkommen. Die Erforschung dieser heterogenen Rezeptorenfamilie wird durch diverse Faktoren erschwert. Beispielhaft sind dies die Unspezifität ihrer Agonisten, ihr Vorkommen in zahlreichen Zelltypen und die Tatsache, dass die durch die G_q -Protein-Untereinheiten ausgelösten Signalwege mit anderen Signalwegen interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich die Bedeutung von G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren im Herzen insbesondere für kurzfristige Modulationen, wie elektrischer Aktivität und Blutdruck, untersucht. Zur Erforschung stand mir ein neues Mausmodell zur Verfügung. Diese Tiere exprimieren einen sogenannten DREADD (*designer receptor exclusively activated by designer drugs*). Dieser Designerrezeptor, ein durch Punktmutationen modifizierter muskarinischer M3-Rezeptor, koppelt ausschließlich an G_q -Proteine und kann nur durch den künstlichen Agonisten Clozapin-N-Oxid aktiviert werden. Dadurch konnte ich den Fokus auf den fraglichen Signalweg legen und die typischen Hindernisse bei der Erforschung G-Protein koppelnder Signalwege weitgehend umgehen. Die erfolgreiche Expression des Designerrezeptors Dq ausschließlich in der Plasmamembran quergestreifter Muskelzellen transgener, Dq-positiver Tiere konnte ich im Western Blot nachweisen. Diese spezifische Expression wird vom *muscle creatine kinase*-Promotor kontrolliert.

Anschließend untersuchte ich die Folgen einer Aktivierung des Designerrezeptors für das wache, frei bewegliche Tier. Dazu setzte ich sowohl transgenen Mäusen, als auch aus der selben Inzuchtlinie stammenden Wildtypieren einen Radiotelemetriesender ein. Dieser Sender erlaubt nach Implantation die simultane Aufzeichnung des Elektrokardiogramms und des systemischen Blutdrucks, ohne die Tiere dafür fixieren oder betäuben zu müssen. Die Kontrollinjektion von steriler Kochsalzlösung zeigte zwischen Wildtyp und Dq exprimierenden Mäusen ein unverändertes Elektrokardiogramm bei physiologischem Sinusrhythmus ohne Blutdruckunterschiede. Sobald ich allerdings denselben Tieren den Liganden des Designerrezeptors, Clozapin-N-Oxid, injizierte, kam es innerhalb kürzester Zeit und abhängig von der Dosis zum Tod der transgenen Mäuse. Bei einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht lag die Sterblichkeitsrate nach fünf Stunden bei 100%. Die transgenen Tiere entwickelten anfangs leichte, später schwere Störungen der kardialen Reizweiterleitung, die sich im Elektrokardiogramm als Atrioventrikularblöcke ersten

bis zweiten Grades, verbreiterte QRS-Komplexe, Verlängerung des QTc-Intervalles bis hin zur Ventrikulären Tachykardie unmittelbar vor dem Herztod zeigten. Auch der mittlere arterielle Blutdruck war, verglichen mit der Kochsalzkontrolle, unter Clozapin-N-Oxid erhöht. Dagegen blieben die Wildtypmäuse von Clozapin-N-Oxid unbeeinflusst. Abgesehen von einer kurzfristigen, durch den Fixations- bzw. Injektionsstress bedingten Sinustachykardie und Hypertonie, die gleichermaßen nach Injektion steriler Kochsalzlösung auftrat, waren alle untersuchten Parameter unauffällig.

Im nächsten Schritt wiederholte ich die Messung des Elektrokardiogramms am isolierten Herzen, um die Folgen der Rezeptor-Aktivierung unter Ausschluss systemischer Effekte zu untersuchen. Dazu habe ich Herzen an einem modifizierten Langendorff-Apparat retrograd perfundiert und die elektrische, spontane Tätigkeit mit Hilfe zweier am Herzen angelegter Elektroden aufgezeichnet. Abermals führte die Aktivierung des endogenen G_q -Signalweges mittels Designerrezeptor zu schweren Dysrhythmien. Durch dieses Experiment konnte ich zeigen, dass die *in-vivo* beobachteten Störungen der Elektrophysiologie auch ihren Ursprung im Herzen hatten und weitgehend frei von systemischen Effekten oder der Aktivierung des Rezeptors in der ebenfalls quergestreiften Skelettmuskulatur waren.

In finalen Untersuchungen im Rahmen meiner Arbeit testete ich Bedingungen, um Aktionspotentiale muriner Kardiomyozyten mittels eines spannungssensitiven, ratiometrischen Farbstoffes (di-8-ANNEPS) zu messen. Die optische Messung ermöglicht dabei eine schnelle und kontaktlose Aufzeichnung der Spannungsänderung isolierter Zellen. Hierfür habe ich ein bereits für neonatale Rattenkardiomyozyten etabliertes Isolations- und Messprotokoll adaptiert, da die Zellen von adulten und neonatalen Mäusen unter Messbedingungen fragiler waren.

Zusammenfassend stellte sich durch diese Arbeit heraus, dass eine durch Clozapin-N-Oxid vermittelte Aktivierung des G_q -Protein koppelnden Designerrezeptors die Elektrophysiologie des Herzens, insbesondere die Reizweiterleitung, stark beeinträchtigt. Diese Ergebnisse unterstreichen die bisher unbekannt Rolle G_q -Protein vermittelter Signalwege für die Generierung und Ausbreitung des Aktionspotentials über den Herzmuskel und damit der Initiierung des Herzschlages.

2 Summary

Investigations of the impact of the G_q signaling pathway in the mammalian heart by targeted activation using DREADD strategy

The heart is the motor of human life - if the heartbeat stops, the cessation of all other organs and ultimately death is a matter of a few moments. A large number of mechanisms influence heart development, structure and its vital functions at all times, for example by modulating the electrical impulse generation and its transmission. These can be adaptive as a response to physiological stimuli, but can also have a pathological character. Many of these mechanisms are mediated by G-protein coupled receptors, which in turn initiate or inhibit numerous signaling cascades in the cardiac myocyte. The role of G_q protein coupled receptors for the electrical activity of the heart is not yet fully understood, although some representatives of this receptor family, such as endothelin 1 and angiotensin II receptors, occur on mammalian cardiomyocytes. The investigation of this heterogeneous receptor family is hampered by various factors. Examples are the limited specificity of their agonists or antagonists, their expression in numerous cell types and the fact that the signaling pathways evoked by G_q protein interact with other signaling pathways.

In this work I investigated the putative importance of G_q protein coupled receptors in the heart, especially for short-term modulations of its electrical activity and the systemic blood pressure. A novel mouse model was available for these studies. These transgenic animals express a so-called DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drugs). This DREADD, a muscarinic M3 receptor modified by point mutations, couples exclusively to G_q proteins and can only be activated by the artificial agonist clozapine-N-oxide but not anymore by natural agonists. This specific stimulation of G_q -dependent signaling overcomes the typical obstacles in the investigation of G-protein-coupled signaling pathways. I demonstrated the expression of the DREADD Dq exclusively on the plasma membrane of striated muscle cells of transgenic animals in western blots. This specific expression was caused by the fact that the expression of Dq was controlled by the muscle creatine kinase promoter.

Using this mouse model I examined the consequences of activating the designer receptor on the awake, freely moving animal. For this, I implanted radio telemetry transmitters in both, transgenic mice and wild type animals from the same inbred line. This allows the simultaneous recording of the electrocardiogram and the systemic blood pressure without having to fix or anaesthetise the animals for the acute experiment. The control injection of sterile saline solution showed unchanged electrocardiograms between wild type and transgenic mice with physiological sinus rhythm and an unmodified blood pressure. However, as soon as I injected the same animals with the ligand of Dq, clozapine-N-oxide, the transgenic mice died within a few hours in a dose-dependent manner. At a dose of 10 mg/kg body weight, the mortality rate was 100% after five hours. All these animals initially developed mild, later severe disturbances of cardiac impulse generation and propagation, which I identified as first to second

degree atrioventricular blocks, broadening of the QRS complex, QTc interval prolongation up to ventricular tachycardia immediately before cardiac death. Simultaneously, the mean arterial pressure was elevated compared to saline control. In contrast, wild type mice remained unaffected by clozapine-N-oxide. With the exception of short-term sinus tachycardia and hypertension caused by fixation and injection stress, which occurred equally after injection of sterile saline, all parameters studied were unchanged.

In the next step, I repeated the measurement of the electrocardiogram on the isolated heart to investigate the consequences of receptor activation excluding all systemic effects. I retrogradely perfused the heart mounted to a modified Langendorff apparatus and recorded the electrical, spontaneous activity using two electrodes attached to the heart. Again, the stimulation of the endogenous G_q signaling pathway by activation of Dq led to severe dysrhythmic periods. This experiment demonstrated that the electrophysiological disorders observed *in-vivo* indeed originated in the heart.

Finally, I tested conditions to measure action potentials of murine cardiomyocytes using the voltage sensitive ratiometric dye di-8-ANNEPS. Optical measurements allow fast and contactless recording of voltage changes of isolated cells. For this purpose I adapted an isolation and measurement protocol already established for neonatal rat cardiomyocytes, since those of adult and neonatal mice were more fragile under measurement conditions.

In summary, this work showed that activation of the G_q signaling pathway through stimulation of a G_q -coupled design receptor strongly impairs the electrophysiology of the heart, in particular the impulse generation and propagation, both in the living animal and in the isolated organ. These results therefore reveal a previously unknown role of G_q protein mediated signaling pathways for the generation and spread of the action potential in the heart muscle and thus the initiation of the heartbeat.

3 Einleitung

3.1 Das Herz-Kreislaufsystem

Die Hauptfunktion des Herz-Kreislaufsystems liegt im Transport. Essentielle Substanzen wie Sauerstoff, lebenswichtige Nährstoffe und Botenstoffe werden an jede Zelle im Säugerorganismus heran getragen, Kohlendioxid und Stoffwechselendprodukte von der Peripherie an Lunge, Leber, Nieren und Darm zum Ort ihrer endgültigen Ausscheidung. Das Herz fungiert als Motor, das Blut als Transportvehikel, die Blutgefäße als Straßen des Lebens. Stünde das System still, käme es binnen kürzester Zeit zu drastischen Folgen: nach etwa 30 Sekunden folgt der Verlust des Bewusstseins und innerhalb weniger Minuten werden lebenswichtige Organe, so etwa das Gehirn, irreversibel geschädigt. Doch für Dysfunktionen im Säugerorganismus braucht es keinen totalen Ausfall der Herz-Kreislauffunktion. Selbst minimale Einbußen können dazu führen, dass die Blutversorgung sensibler oder metabolisch sehr aktiver Gewebe nicht mehr ausreichend ist. Diesen Zustand nennt man Ischämie. Dauert die Ischämie an, kommt es zum nekrotischen Zelluntergang. Gerade in teilungsarmen Geweben (Gehirn, Niere und dem Herz selbst) ist dieser Schaden dann irreparabel [26]. Herz-Kreislaufferkrankungen, seien sie nun primärer oder sekundärer Natur, stehen daher auf der Liste der Todesursachen in Deutschland an vorderster Stelle (www.destatis.de). Deswegen ist es essentiell, die Mechanismen der Funktion des Herzens sowie die Möglichkeiten der Beeinflussung zu verstehen. Die stetige Erforschung der grundlegenden Einrichtungen des Herz-Kreislaufsystems erschließt mögliche neue Ziele, um Erkrankungen effizienter, spezifischer auf das einzelne Individuum und sicherer zu verhindern oder zu therapieren.

3.1.1 Grundlegender Aufbau und Funktion des Herzens

Am Herzen unterscheidet man die Vorhöfe (Atrien) von den Hauptkammern (Ventrikel). Zwischen Vorhof und Kammer liegen jeweils Herzklappen, die sogenannten Segelklappen oder Atrioventrikularklappen (AV-Klappen). Sie öffnen sich in der Entspannungsphase des Herzens, sobald der Druck in den Ventrikeln unter den der Atrien fällt. Blut kann nun in die Ventrikel einströmen. Sobald der Druck in der Anspannungsphase des Herzens wieder größer wird, schließen sich die Segelklappen und verhindern ein Zurückströmen des Blutes. Zeitgleich öffnen sich die Taschenklappen des Herzens, wegen ihres halbmondförmigen Aussehens auch Semilunarklappen genannt. Sie markieren als Pulmonalklappe den Übergang vom rechten Ventrikel in den Lungenstamm (*Truncus pulmonalis*) bzw. als Aortenklappe jenen vom linken Ventrikel in die Hauptschlagader (Aorta). Das Blut wird zum Teil aus den Ventrikeln ausgeworfen. Die Blutmenge, die jede Herzkammer bei der Kontraktion auswirft, bezeichnet man als Schlagvolumen. Fällt der Druck in der Entspannungsphase des Herzens unter den peripheren Blutdruck, schließen sich Taschenklappen und gewährleisten ebenfalls den gerichteten Blutfluss, ähnlich einem Einbahnstraßensystem. Die Phase der Erschlaffung und des Bluteinstroms in die Ventrikel nennt man (ventrikuläre) Diastole, die Anspannungs- und Blutauswurfphase (ventrikuläre)

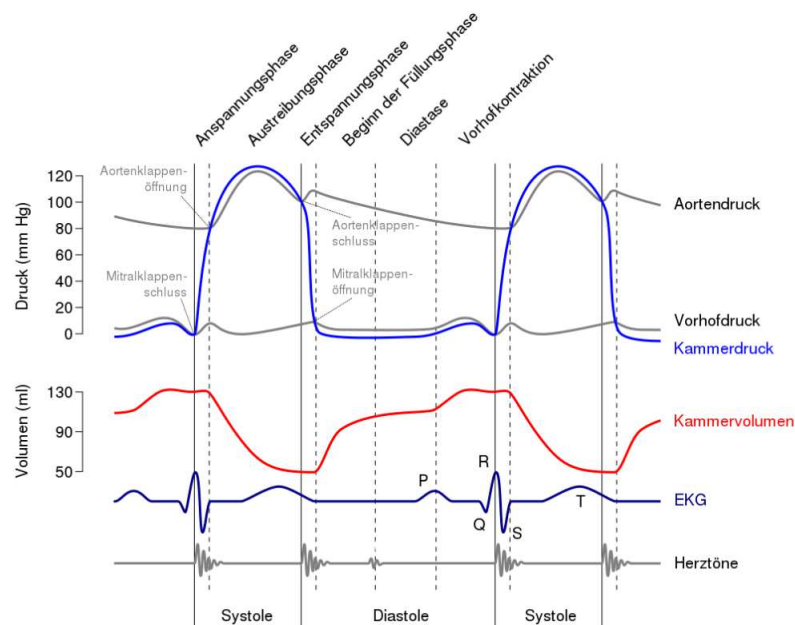


Abbildung 1: Abläufe und Ereignisse während des menschlichen Herzzyklus/Herzschlages und die damit verbundene Terminologie anhand des Wiggersdiagramm; Abbildung von Dr. Daniel Chang aus <https://commons.wikimedia.org> und modifiziert)

Systole. Die Abläufe während eines Herzschlages, und wie Herzklappen, die Spur im Elektrokardiogramm, Druckverhältnisse, Blutvolumina und Herztöne sich während Systole und Diastole verändern, kann Abbildung 1 entnommen werden: Das so genannte Wiggers-Diagramm zeigt, dass, induziert durch die eigene elektrische Tätigkeit (siehe Abschnitt 3.2.1), Vorhöfe und Hauptkammern aufeinander abgestimmt kontrahieren und wie sich dabei die Drücke und Volumina in den einzelnen Kompartimenten ändern, wann in diesem Zusammenspiel Herzklappenlappen öffnen oder schließen und dadurch Herztöne erzeugen.

Funktionell kann man das Herz in zwei Pumpen unterteilen, die jeweils einen Kreislauf bedienen: die rechte Herzhälfte befördert sauerstoffarmes Blut in die Lunge. Dort wird Kohlendioxid abgegeben und das Blut mit Sauerstoff angereichert und in die linke Herzhälfte weitergepumpt. Die linke Herzhälfte befördert das Blut dann in die Peripherie, um alle Organe (und sich selbst über die Herzkranzgefäße) mit Blut zu versorgen. Die beiden Kreisläufe sind also in Serie geschaltet, und die Pumpleistung erfolgt in beiden Hälften bei jedem Herzschlag physiologischerweise synchron, die Schlagvolumina beider Kammern sind dabei gleich groß. Zuerst kontrahieren die Vorhöfe und mit Zeitverzögerung die Hauptkammern (siehe Druckspuren in Abbildung 1). Dadurch unterstützen die Vorhöfe die Füllung der Hauptkammern, während diese in der ventrikulären Diastole selbst noch keinen Druck aufbauen.

3.2 Die elektrische Tätigkeit des Herzens

3.2.1 Grundsätzliche Mechanismen

Die unter Abschnitt 3.1 beschriebene mechanische Abfolge ist maßgeblich für eine effiziente Versorgung des Körpers durch das Herz. Hinter dieser fein abgestimmten Pumpfunktion steckt die elektrische Tätigkeit des Herzens, beziehungsweise die Art der Ausbreitung des Aktionspotentials (AP), jenes elektrischen Signales, das sich über den Herzmuskel ausbreitet und die Kontraktion initiiert.

Die Grundlage dafür bildet die besondere subzelluläre und zelluläre Architektur des Herzens: Herzzellen sind über sogenannte Glanzstreifen (*Disci intercalares*) miteinander verbunden, und verzweigen sich dabei auch. In diesen Glanzstreifen befinden sich Zell-Zell-Kanäle, die *gap junctions*. Über diese Zell-Zell-Kanäle können Ionenströme von einer Zelle in die nächste gelangen, und damit elektrische Ladungen. Obwohl morphologisch voneinander getrennt, stellen die Zellen eine leitende Einheit dar. Wenn nun eine Zelle depolarisiert und ein Aktionspotential entsteht, kann dieses sich über die Gesamtheit der elektrisch kommunizierenden Nachbarzellen ausbreiten [73]. So kann das Herz synchron kontrahieren, als wäre es eine einzige große Zelle - als sogenanntes funktionelles Synzytium.

Prinzipiell kann wegen dieser Eigenschaft jede Herzzelle einen Herzschlag auslösen, sofern sie nur ein Aktionspotential generiert. Im gesunden Herzen geschieht dies aber durch spezialisierte Zellen, die Schrittmacherzellen. Ihr Membranpotential depolarisiert spontan bis zum Erreichen eines Schwellenwertes, was das Aktionspotential nach dem „alles-oder-nichts“-Prinzip auslöst. Die am schnellsten depolarisierende Zelle bestimmt dabei das Tempo. Physiologischerweise sind diese Zellen im Sinusknoten lokalisiert, eine Region zwischen Hohlvene und rechtem Vorhof [86, 133, 106, 111].

Nachdem das AP im Sinusknoten ausgelöst wurde, breitet es sich über den rechten und linken Vorhof aus, und sie kontrahieren. Nun tritt eine Besonderheit im funktionellen Synzytium auf: die einzig leitende Verbindung zwischen Atrien und Ventrikel bilden spezialisierte Zellen des Reizleitungssystems, ansonsten sind sie bindegewebig voneinander getrennt. Der Übergang von den Vorhöfen kann nur über den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) geschehen, und von dort aus wird das Aktionspotential über das His'sche Bündel weiter geleitet. Der Weg führt von dort über die Tawara-Schenkel an die Purkinje-Fasern, wo das AP zuerst an den inneren Schichten in das Arbeitsmyokard übertritt. Die Ventrikel kontrahieren in der Folge [115, 51].

Eine weitere Besonderheit des AV-Knotens liegt in seiner verlangsamten Reizweiterleitungszeit. Ohne diese Verzögerung wäre die Zeit zwischen Kontraktion von Vorhöfen und jener der Ventrikel zu kurz, was die unterstützende Füllfunktion der Vorhöfe stören würde. Im hinteren Teil des His'schen Bündels, der Tawara-Schenkel und der Purkinjefasern ist die Reizleitungsgeschwindigkeit wesentlich höher. Damit wird die fast synchrone Kontraktion über die Gesamtheit der Ventrikel gewährleistet [3]. Die Zellen des Reizbildungs- und -leitungssystems, vom Sinusknoten bis zu den Purkinjefasern, sind dabei entwicklungsbiologisch gesehen spezialisierte

Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) [125].

Die Eigenschaften des Aktionspotentials von Herzzellen werden von einer Vielzahl spannungs-, zeit- und ionengesteuerter Ionenkanäle sowie von Ionenaustauschern und Transportproteinen bestimmt [26]. Die Ausstattung unterscheidet sich dabei zwischen den einzelnen Zellsubtypen. Die Zellen des menschlichen Ventrikelmyokardes zum Beispiel haben ein stabiles Ruhemembranpotential von -80 mV. Die Na^+/K^+ ATPase tauscht Natrium- gegen Kaliumionen an der Zellmembran aus, sodass ein chemisches Gefälle für die beiden Ionen entsteht (Na^+ ↑ im extrazellulären Raum, K^+ ↑ im Zellinneren (Zytosol)). Die Membran ist dabei durch Kaliumkanäle durchlässig für die positiven Kaliumionen, sie folgen ihrem chemischen Gradienten aus der Zelle heraus, wodurch das negative Ruhemembranpotential erhalten wird [59]. Wird die Zelle durch die Reizweitergabe benachbarter Zellen auf ein Schwellenwertpotential von -65 mV depolarisiert, öffnen sich schnell öffnende, schnell schließende, spannungsgesteuerte Natriumkanäle, wodurch es zu einem kurzen, raschen Na^+ -Einstrom kommt. Die Herzmuskelzelle depolarisiert. Durch die Depolarisation werden Kaliumkanäle geschlossen und langsam öffnende, langsam schließende spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (L-Typ-Kalziumkanäle) geöffnet. Die Repolarisation verzögert sich, da weniger K^+ aus der Zelle gelangt, während Ca^{2+} über das Sarkolemm (Muskelzellmembran) ins Zytosol strömt. Kalziumionen sind im Zytosol viel niedriger konzentriert als im Extrazellularraum (etwa im Verhältnis 1:10000) und folgen ihrem chemischen Gradienten. Kalzium im Zytosol bindet an seine Bindungsstellen an den Ryanodinrezeptoren (RyR) im Sarkoplasmatischen Retikulum und aktiviert diese [12]. Die RyR fungieren selbst als Kalziumkanäle, das Sarkoplasmatische Retikulum wird in der Folge durchlässig für sarkoplasmatische Kalziumionen. Bei sehr hohen Kalziumkonzentrationen im Zytosol werden die RyR wieder deaktiviert [40, 137]. So wird die zytosolische Kalziumkonzentration fein gesteuert, die Repolarisation bis zur Bildung eines Plateaus verzögert und außerdem Kalzium als Mediator der eigentlichen Muskelkontraktion zur Verfügung gestellt. Die Höhe des zytosolischen Kalziums bestimmt außerdem die Kraft der Kontraktion. Mit Schließung der Kalziumkanäle und der sukzessiven Entfernung von Kalziumionen aus dem Zytosol wird nicht nur die weitere Repolarisation (die Herstellung des negativen Ruhemembranpotentials) fortgesetzt sondern auch die Kontraktion reduziert, die Muskelzelle entspannt sich. Die spannungsgesteuerten Natriumkanäle bleiben bis dorthin inaktiviert, sodass kein neues AP ausgelöst werden kann, solange die Kontraktion nicht (fast) beendet ist. Das ermöglicht es dem Herz, relaxieren zu können, die Muskelzelle ist refraktär (unempfindlich).

Die Aktionspotentiale der Vorhöfe sind kürzer, da ihre Kalziumkanäle weniger lang offen sind. In Schrittmacherzellen ist die Aktivität der stabilisierenden Kaliumkanäle zur Erhaltung des Ruhemembranpotentials im Vergleich zum Arbeitsmyokard geringer. Die Zellen des Sinusknoten depolarisieren stattdessen durch den Schrittmacherstrom I_f (*funny current*), an dem diverse Isoformen des Ionenkanals HCN (*hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated gene family*) beteiligt sind [96, 22]. An der finalen Auslösung des Aktionspotentials über den Schrittmacherstrom dürften zum einen spannungsgesteuerte (durch Hyperpolarisation aktivierte) Kanäle beteiligt sein, zum anderen aber auch ein spontaner diastolischer Kalziumanstieg in den Schrittmacherzellen.

macherzellen [81, 69]. Letzteres führt zu einem kalziumabhängigen Netto-Einwärtsstrom (etwa über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher), der die Zellmembran hin zum Schwellenwert depolarisiert, ein AP wird ausgelöst [58]. Der Anstieg ist dabei wesentlich langsamer, der zeitliche Verlauf des AP hat eine abgerundete Form. Auch im AV-Knoten und darunter liegenden Strukturen gibt es diese Schrittmacheraktivität. Der Schwellenwert wird aber wesentlich später erreicht. Im Normalzustand wird das von Sinusknotenzellen ausgelöste AP über die Vorhöfe den AV-Knoten erreichen, ehe er selbst eines generiert. Nur wenn der Sinusknoten ausfällt, springt der AV-Knoten mit verminderter Frequenz ein. Der AV-Knoten ist auch länger refraktär als atriale Zellen. Diese Eigenschaft bewahrt bei Vorhofflattern oder -flimmern (siehe unten) den Ventrikel vor Übertragung dieser ungeordneten elektrischen Impulse. Außerdem kann das AP nicht zurück in die Vorhöfe gelangen, wenn die Hauptkammern später vollständig erregt sind und die Vorhöfe bereits wieder erregbar wären [26].

Durch die spontane Depolarisation der Schrittmacherzellen kann das Herz autark schlagen, eine Initiierung über neuronale Mechanismen oder Botenstoffe ist nicht nötig. Sie können aber durch Rezeptorwechselwirkung die Kraft, Relaxationszeit und Frequenz des Herzschlages sowie Reizleitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit modulieren [26]. So regelt das vegetative Nervensystem über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (siehe Abschnitt 3.4) etwa, wie schnell eine Schrittmacherzelle ihren Schwellenwert erreicht und damit die Herzschlagfrequenz. Ohne diese Modulatoren würde das Herz ausschließlich mit seiner intrinsischen Schlagfrequenz schlagen. Die sympathische Innervierung sorgt im Sinusknoten für eine schnellere Depolarisation und damit höhere Herzrate, erhöht im AV-Knoten die Reizleitungsgeschwindigkeit und verkürzt die refraktäre Zeit und sorgt in der Arbeitsmuskulatur über eine Erhöhung des Kalziumeinstromes für kräftigere, schnellere und kürzere Herzschläge [152]. Dadurch wird mehr Blut mit höherem Druck pro Zeiteinheit ausgeworfen. Der Parasympathikus hat einen starken Einfluss auf Sinus- und AV-Knoten und einen indirekten Effekt auf das Arbeitsmyokard. Durch Stimulationen des im Herzen vorkommenden muskarinergen Rezeptorsubtyp M_2 -ChR können die Effekte einer vorangegangenen sympathischen Stimulation antagonisiert werden, Herzfrequenz und Schrittmacherstrom werden reduziert, Stärke, Kontraktilität und Dauer der Vorhofkontraktion werden vermindert, die Leitungsgeschwindigkeit wird herabgesetzt [30].

3.2.2 Pathologie der elektrischen Herztätigkeit

Die bis jetzt beschriebenen elektrischen Vorgänge erklären den physiologischen Sinusrhythmus. Sie gewährleisten die Mechanismen, die es dem Herzen erlauben, gerichtet, regelmäßig, effektiv und angepasst an die aktuellen Bedingungen Blut im Kreislaufsystem in Bewegung zu halten. Es kann alle Gewebe und sich selbst ausreichend versorgen. Die Vorhöfe kontrahieren, ehe es die Hauptkammern tun, um diese in ihrer diastolischen Füllungsphase zu unterstützen. Die Hauptkammern kontrahieren danach synchron, um Blut in die beiden Kreisläufe auszuwerfen und entspannen sich genauso synchron, damit wieder Blut in die Kammern einströmen kann. Die Dauer der Diastole gewährleistet eine adäquate Füllzeit. Sind diese Abläufe gestört, ver-

ändert oder unterbrochen, drohen je nach Schwere oder Dauer fatale Konsequenzen für den Organismus, wenn dadurch die Blutversorgung unter ein tolerierbares Maß fällt.

Fällt etwa der Sinusknoten aus, wird der AV-Knoten die Schrittmacherfunktion übernehmen, dies geschieht allerdings in deutlich niedrigerer Herzfrequenz (Bradykardie: griechisch *βραδυκαρδία*, wörtlich „langsameres Herz“).

Eine Dysfunktion des AV-Knotens behindert die Reizweitergabe von den Vorhöfen zu den davon elektrisch isolierten Ventrikeln. Man spricht von atrioventrikulären Blöcken (AV-Blöcken), die in drei Schweregrade eingeteilt werden können (vgl. zum Folgenden Erdmann 1996, S. 87ff):

- Der AV-Block I. Grades beschreibt den Zustand eines abnorm langen Zeitintervalls zwischen Vorhof- und Ventrikelkontraktion. Dieses Phänomen kann beobachtet werden, wenn die Weiterleitung des Aktionspotentials durch den AV-Knoten deutlich langsamer ist.
- Bei einem AV-Block II. Grades wird nicht jede Vorhoferregung an die Kammern weitergeleitet. Während die Vorhöfe wie vom Sinusknoten initiiert kontrahieren, bleiben die Ventrikel in Ruhe. Unter parasympathischen Einflüssen wird der AV-Block ausgeprägter, da im AV-Knoten die Refraktärzeit des vorangegangenen AP mit höherer Wahrscheinlichkeit noch aufrecht ist, wenn eine neue Erregung auf ihn trifft.
- Ein AV-Block III. Grades ist dadurch gekennzeichnet, dass gar kein Vorhofpotential weitergeleitet wird. Vorhöfe und Kammern schlagen unabhängig voneinander: Erstere im vom Sinusknoten vorgegebenen Takt. Letztere schlagen im Eigenrhythmus, ausgelöst z.B. von Schrittmacherzellen des Reizleitungssystems, welche langsamer das Schwellenwertpotential erreichen als jene des Sinusknotens.

Bekannte Ursachen für die Auslösung eines AV-Blockes sind Infektionen, Traumata (auch iatrogen, z.B. bei der chirurgischen Versorgung eines Ventrikel-Septum-Defektes), Toxine, ischämische Zustände, angeborene Defekte oder krankhafte Vermehrung bindegewebiger Strukturen [57].

Als Tachyarrhythmien werden Zustände beschrieben, in denen zusätzliche oder zu häufige Herzaktionen den Sinusrhythmus unterbrechen (vgl. zum Folgenden Pang & Green, 2017). Vereinzelt auftretende zusätzliche AP treten als sogenannte Extrasystolen in Erscheinung. Treten sie gehäuft auf, spricht man von einer Tachykardie (griechisch *ταχυκαρδία*, wörtlich „schnelles Herz“). Diese abnorme Schrittmacheraktivität kann vom Sinusknoten ausgehen (Sinustachykardie), von den Vorhöfen (atriale bzw. Vorhoftachykardie), aus dem nachfolgenden Reizleitungssystem (junktionale Tachykardie) oder von einer Region des Ventrikels (Ventrikuläre bzw. Kammertachykardie). Ektopische Zentren liegen außerhalb des Sinusknotens und fungieren pathologischweise als Schrittmacher. Auch hier gilt, dass Traumata, Toxine, Infektionen, Elektrolytimbalancen oder Ischämie bzw. Infarkt auslösend für die pathologischen Zustände sein können. Bei ventrikulären Arrhythmien können mitunter die Vorhöfe, bedingt durch die Eigenschaften des AV-Knotens, unbeeinflusst im Sinusrhythmus weiterschlagen.

Tachyarrythmien führen dazu, dass zwischen zwei Herzschlägen die Ventrikel weniger stark gefüllt werden können, da auch die Diastole verkürzt ist. Zudem wird das Herz selbst in der Diastole über die Herzkranzgefäße mit Blut versorgt. Eine Tachyarrhythmie kann daher dazu führen, dass bei größerer Herzarbeit eine insuffizientere Versorgung stattfindet [124].

Wenn jede noch so kleine Region der Herzwand asynchron kontrahiert und relaxiert, ist keine gerichtete Kontraktion mehr möglich, der Blutausswurf sistiert. Diesen Zustand beschreibt man als Kammerflimmern und führt ohne sofortige Intervention zum akuten Herztod. Als sofortige Therapiemaßnahme muss die Synchronität von De- und Repolarisation wieder hergestellt werden. Dazu werden alle Herzzellen mit Hilfe eines Defibrillators durch einen starken Stromstoß depolarisiert. Damit sollen auch jene Zellen erfasst werden, die eben noch refraktär waren. Sollte die auslösende Ursache beseitigt sein, würde im Anschluss wieder ein normaler Sinusrhythmus ablaufen können, ansonsten würde Kammerflimmern erneut auftreten [57]. Vorhofflimmern im Gegensatz dazu hat eine deutlich bessere Prognose. Die bereits erwähnte lange Refraktärheit des AV-Knotens schützt vor einem Übergreifen des Flimmerns auf die Kammern, dennoch kann anhaltendes Vorhofflimmern mit Komplikationen wie Herzversagen oder Schlaganfall verbunden sein [15].

3.3 Das Elektrokardiogramm (EKG)

Das Elektrokardiogramm (EKG) ist in der Klinischen Medizin und in der Forschung ein unverzichtbares Werkzeug, um elektrische Dysfunktionen des Herzens zu detektieren (vgl. zum Folgenden Cunningham *et Klein* 2013, S. 188ff). Im Prinzip stellt es einen fortlaufenden Graphen dar, der von einem Voltmeter generiert wurde und die gemessene Spannungsdifferenz als Funktion der Zeit aufträgt. Wie in 3.2.1 erwähnt, stellt das Herz funktionell eine große Zelle dar, da alle Herzzellen leitend miteinander verbunden sind. Ein Aktionspotential beginnt an einem Ende und breitet sich über das gesamte Herz aus, und zu gewissen Zeitpunkten sind die Herzzellen einer Seite bereits depolarisiert (an der Zellaußenseite negativ geladen), während die anderen noch ihr Ruhemembranpotential halten (an der Zellaußenseite positiv geladen), ehe die Erregung sie erreicht. Man kann sich das Herz also wie einen großen Dipol vorstellen: Zwei unterschiedliche Ladungen, räumlich getrennt, die ein elektrisches Feld aufbauen. Platziert man nun Elektroden an den unterschiedlich geladenen Enden des Dipols, wird das Voltmeter einen Spannungsunterschied von einer Elektrode im Vergleich zur anderen Elektrode anzeigen. Abbildung 2 zeigt das Prinzip stark vereinfacht während eines Herzzyklus. Solange alle Zellen des Herzens gleich geladen sind und ihr Ruhemembranpotential innehalten, wird kein Spannungsunterschied gemessen (Abbildung 2a). Breitet sich ein Aktionspotential nahe Elektrode A aus, werden die benachbarten Zellen zuerst depolarisieren. Auf der Zellaußenseite wird dort die Spannung negativer. Elektrode B hingegen liegt näher an jenen Zellen, die noch nicht vom Aktionspotential erfasst wurden. Das Voltmeter wird daher gegen Elektrode B einen negativen Spannungsunterschied detektieren (Abbildung 2b). Wenn quasi alle Zellen depolarisiert sind, wird wiederum kein Spannungsunterschied zwischen den beiden Elektroden bestehen

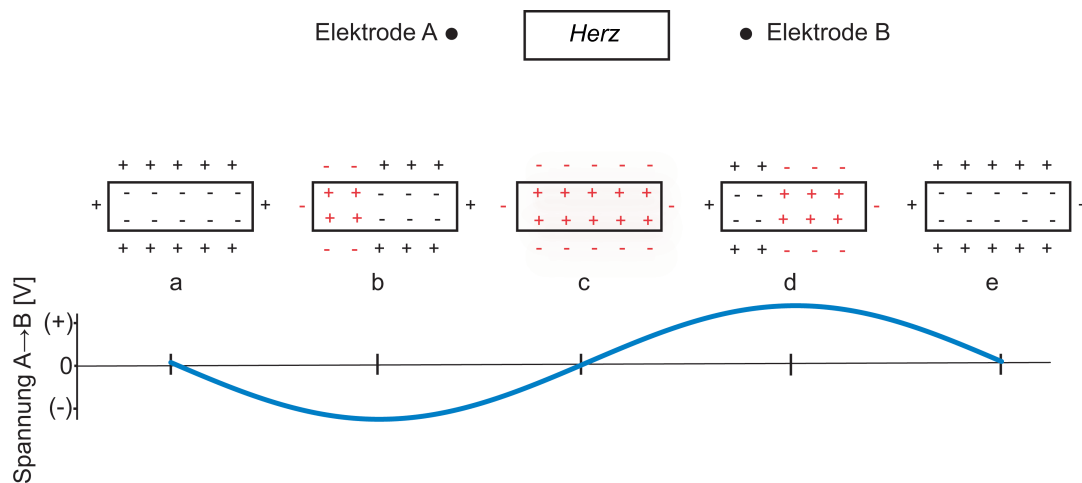


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Herzes während seiner elektrischen Tätigkeit als Dipol. Platziert man den Enden des Dipols je eine Elektrode und misst die Spannungsdifferenz, so kann man diese als Funktion der Zeit graphisch darstellen. (a) Alle Zellen halten ihr Ruhemembranpotential; (b) beginnende Depolarisation der Muskelmassen; (c) komplette Depolarisation; (d) beginnende Repolarisation; (e) Rückkehr zum Ruhemembranpotential. Modifiziert nach Cunningham, James G. und Klein, Bradley G.; 2013 [26]

(Abbildung 2c). Wenn nun die ersten benachbarten Zellen beginnen, zu repolarisieren, wird auch die Zellaußenseite wieder positiv gegen die Zellinnenseite sein. Solange ein Überschuss an positiven Ladungen näher zu einer Elektrode sind, wird zwischen diesen ein erneuter Spannungsunterschied entstehen. In Abbildung 2d ist Elektrode A positiv gegen Elektrode B. Wenn alle Zellen wieder zum Ruhemembranpotential zurück gekehrt sind, verschwindet auch der Ladungsunterschied wieder gegen 0 (Abbildung 2e) [26].

3.3.1 Nomenklatur des elektrischen Herzzyklus

Zur Aufzeichnung des EKG werden unterschiedliche Ableitungssysteme genutzt, die durch unterschiedliche Elektrodenplatzierungen an der Körperoberfläche gekennzeichnet sind. Um Vergleichbarkeit und fachlichen Austausch zu ermöglichen, ist es wichtig, festzuhalten, welche Ableitung betrachtet wird und ob man den Spannungsunterschied von Elektrode A zu Elektrode B oder umgekehrt betrachtet (in Abbildung 2 wäre es, hätte man B gegen A betrachtet, erst zu einem positiven Ausschlag und dann zum negativen gekommen). Für die weitere Nomenklatur und Ausführung wird die bipolare Ableitung II nach Einthoven herangezogen (siehe auch Abbildung 7). Hier wird die Spannungsdifferenz zwischen dem linken Bein („positive“ Elektrode) und dem rechten Arm („negative“ Elektrode) gemessen. Anhand Abbildung 3 sollen die charakteristischen Ausschläge im EKG in Form von Zacken und Wellen erläutert werden. Sie spiegeln die atriale und ventrikuläre Depolarisation sowie die Repolarisation der Ventrikel wider.

Wird zu Beginn des Herzzyklus im Sinusknoten ein Aktionspotential generiert, wird dieses Ereignis im Oberflächen-EKG nicht sichtbar sein. Die Zellmasse ist zu klein, um sie auf diese Weise zu detektieren. Erst wenn die Vorhöfe erregt werden, wird dieses Ereignis im EKG

sichtbar: Das Aktionspotential erreicht erst die benachbarten Zellen des rechten Vorhofs und breitet sich weiter über beide Vorhöfe aus. Im EKG wird zwischen den Elektroden am linken Bein eine positive Spannung im Vergleich zum rechten Arm gemessen: die sogenannte P-Welle entsteht (Abbildung 3a,b). Dabei repräsentiert die erste Hälfte der Welle hauptsächlich die Depolarisation des rechten und die zweite Hälfte die des linken Atriums. Während der Vorhofdepolarisation wird auch der AV-Knoten erreicht. Allerdings ist hier, wie oben beschrieben, die Reizleitungsgeschwindigkeit reduziert. Während die Vorhöfe vollkommen erregt sind, wird das Aktionspotential nur langsam durch den AV-Knoten und das angrenzende His'sche Bündel weiter geleitet. In dieser Zeit wird im EKG kein Ausschlag sichtbar sein und der Graph bleibt auf der Basislinie. Auch hier gilt, dass die Menge an Zellen, die gerade eine Spannungänderung erfahren, zu gering für eine Detektion ist. Wenn nun im Septum zwischen den Hauptkammern die ventrikuläre Depolarisation beginnt, kann man in Ableitung II zumeist einen kurzen, negativen Ausschlag beobachten, der als Q-Zacke bezeichnet wird (Abbildung 3c). Sie markiert den Beginn der Erregung der Hauptkammern. Wenn in den sehr schnell leitenden Zellen der Tawara-Schenkel die Erregung über die Herzspitze und die Purkinjefasern auf die endokardnahen (innen liegenden) Bereiche des Arbeitsmyokards übergreift, wird die Depolarisation rasch von Zelle zu Zelle bis an die *epikardnahen* (außen liegenden) Bereiche weiter getragen und bilden massenhaft kleine Dipole von innen nach außen. Im EKG macht sich das als große, positive Zacke, die R-Zacke, bemerkbar (Abbildung 3d). Dadurch, dass die Herzachse im Körper physiologischerweise nach links gerichtet ist und die Muskelmasse des linken Ventrikels zudem größer als jede des rechten ist, wird der Nettodipol deswegen nach links und *kaudal* (fußwärts, schwanzwärts) gerichtet sein. Die linke Beinelektrode zeichnet daher eine positivere Spannung gegen jene am rechten Arm auf. Der Graph im EKG erreicht dann noch einmal die Basislinie und wird kurz negativ (S-Zacke, Abbildung 3e). Zu diesem Zeitpunkt werden Regionen an der Herzbasis depolarisiert. Die ventrikuläre Depolarisation wird also durch Q-, R- und S-Zacke wieder gegeben. Sind die Kammern vollkommen depolarisiert, wird abermals kein Spannungsunterschied gemessen. Erst die einsetzende ventrikuläre Repolarisation erzeugt wieder einen Ausschlag in Form der T-Welle. Sie beginnt in perikardnahen Regionen und bildet somit Dipole gegen die endokardnahen Muskelwandbereiche. Als netto elektrischer Effekt ist die T-Welle in Ableitung II - mit speziesspezifischen Besonderheiten - zumeist positiv (Abbildung 3f) [26]. Beim Menschen wird mitunter auch eine U-Welle beobachtet, ein positiver, flacher Ausschlag nach der T-Welle. J. Willis Hurst [62] hat eingehend beschrieben, wie Willem Einthoven im auslaufenden 19. Jahrhundert die bis heute gültige Benennung der EKG-Ausschläge festgelegt hat, und wie diese entstehen.

Man kann also den dominanten Wellen und Zacken im EKG ein spezifisches, elektrisches Ereignis zuordnen und dementsprechend ihre Größe, ihr zeitliches Auftreten und die Verhältnisse untereinander bestimmen. Neben der Amplitude und Dauer der einzelnen EKG-Ausschläge werden ebenfalls folgende Parameter bestimmt (siehe Abbildung 4):

RR-Intervall: Es entspricht dem Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden R-Zacken. Ihr Kehrwert ergibt die ventrikuläre Herzrate.

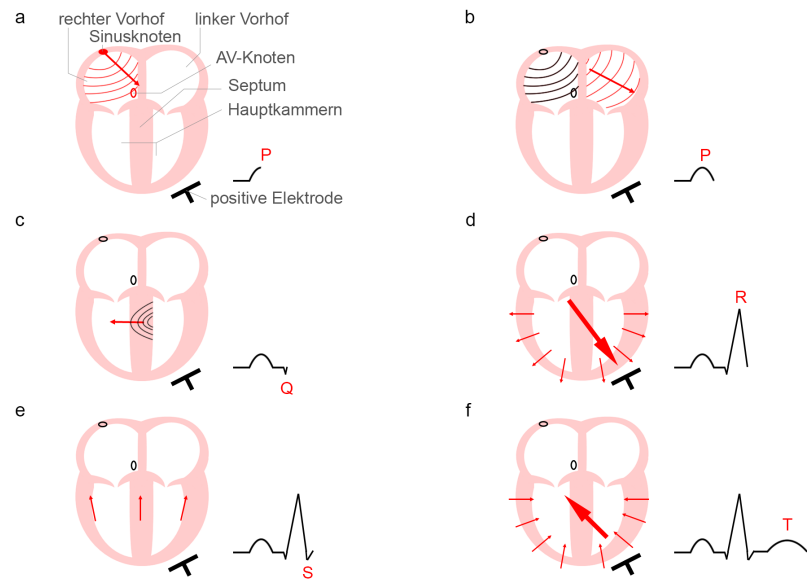


Abbildung 3: Erregungsausbreitung im Herzen und ihr Zusammenhang mit der Entstehung der charakteristischen Wellen und Zacken im EKG. (a,b) P-Welle: Vorhofdepolarisation; (c-e) Ventrikeldepolarisation; (c) Q-Zacke; (d) R-Zacke; (e) S-Zacke; (f) Ventrikelrepolarisation: T-Welle. Modifiziert nach Baatz, Gabriele; 2002 [5].

PP-Intervall: Das PP-Intervall beschreibt folgerichtig den Abstand zwischen zwei P-Wellen und spiegelt im Kehrwert die Rate der Vorhofkontraktionen wider, was vor allem bei AV-Blöcken höherer Grade von Bedeutung ist.

PQ-Intervall (beim Fehlen einer deutlichen Q-Zacke auch PR-Intervall): Die Dauer vom Beginn der P-Welle bis zum Beginn des QRS-Komplexes. Das PQ-Intervall entspricht damit der Zeitdauer, die von der Auslösung des Aktionspotentials im Sinusknoten bis zum Übergreifen auf die Ventrikel verstreicht. Sie beinhaltet also die Ausbreitung über die Vorhöfe, den AV-Knoten und die nachgeschalteten Strukturen des Reizleitungssystemes. Schwankungen sind dabei zumeist auf eine veränderte Überleitungszeit im AV-Knoten zurückzuführen. Beim Menschen ist das PQ-Intervall typischerweise 0,13 - 0,20 Sekunden lang [43].

QRS-Komplex (Dauer): Die aufsummierte Dauer von Q-, R- und S-Zacke zusammen detektiert, wie lange es braucht, bis das Arbeitsmyokard der Ventrikel vollständig erregt ist, beginnend vom Übergreifen des Aktionspotentials auf die ersten Zellen. Der QRS-Komplex beim Menschen sollte nicht länger als 0,12 Sekunden dauern [43]. Daneben wird auch die Form des QRS-Komplexes unter Berücksichtigung der Elektrodenableitung beurteilt.

ST-Strecke: Sie beschreibt die Zeitspanne, in welcher das gesamte Arbeitsmyokard erregt ist. Sie sollte physiologischerweise auf einer Ebene auf einer Höhe mit der Basislinie verlaufen.

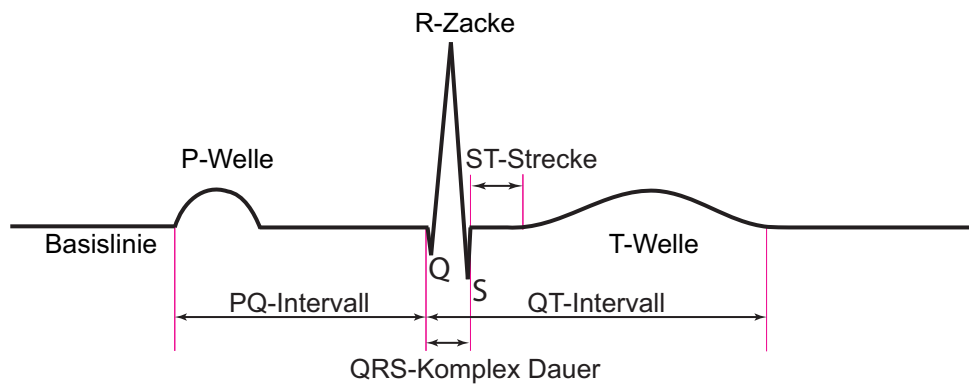


Abbildung 4: Nomenklatur und wichtige Parameter eines EKGs.

QTc-Intervall: Um den Zeitraum von beginnender Depolarisation bis abgeschlossener Repolarisation der Ventrikel fest zu stellen, wird die Länge von Beginn der Q-Zacke bis Ende der T-Welle gemessen. Das QT-Intervall wird in der Regel bei sinkender Herzrate länger. Deswegen wird es für eine Interpretation frequenzkorrigiert. Die Formel nach Bazett [9] wird dafür in der Humanmedizin heran gezogen:

$$QT_c = \frac{QT [ms]}{\sqrt{RR [s]}}$$

3.3.2 Arrhythmien im EKG

Kommt es zu Veränderungen im EKG, also der gemessenen Spannung zwischen zwei ums Herz platzierten Elektroden, kann man, sofern man Mess- oder Bewegungsartefakte ausgeschlossen hat, Hinweise auf strukturelle oder elektrische Veränderungen im Herzen gewinnen.

Ein einfach nachzuvollziehendes Beispiel stellen AV-Blöcke dar: Der AV-Block ersten Grades zeigt sich durch ein verlängertes PQ-Intervall bei normal geformten P-Wellen und QRS-Komplexen. Beim AV-Block II. Grades wird definitionsgemäß nicht jedes Aktionspotential von den Vorhöfen auf die Ventrikel übergeleitet. Dementsprechend erkennt man dieses Phänomen an normal geformten P-Wellen, die allerdings gelegentlich nicht von einem QRS-Komplex gefolgt werden. Der AV-Block III. Grades zeigt typischerweise die Dissoziation der elektrischen Erregung in Vorhof und Ventrikel: Das PP-Intervall ist kürzer als das RR-Intervall, und die normal geformten, regelmäßig auftretenden P-Wellen zeigen keinen zeitlichen Zusammenhang mit den QRS-Komplexen. P-Wellen können aber von QRS-Komplexen überdeckt sein. Je nachdem, wo im Reizleitungssystem die Schrittmacherfunktion übernommen wurde, sind auch die QRS-Komplexe deformiert: Das Aktionspotential breitet sich auf den Ventrikel von anderer Stelle aus, abweichend von der Route einer größtmöglich synchronen Erregung aller Ventrikelzellen.

Eine Rechtsherzhypertrophie bedeutet eine Zunahme der Muskelmasse des rechten Ventrikels. Die Dominanz des linken Ventrikels verliert sich, der QRS-Komplex bekommt eine insgesamt „negativere Form“ in der zweiten Ableitung.

In einem ischämischen oder infarziertem Gebiet können die dortigen Zellen ihr negatives Ruhemembranpotential nicht aufrechterhalten, weswegen es zu einer Spannungsdifferenz zwischen normalen Arealen und den ischämischen Ventrikelzellen zwischen den Kontraktionen kommt. Im EKG erkennt man dieses Phänomen als ST-Senkung oder Hebung. Streng genommen handelt es sich dabei aber um eine TP-Segment-Veränderung, da ein Dipol zwischen den ischämischen Ventrikelzellen und den gesunden Ventrikelzellen mit normalen Ruhemembranpotential entsteht. In Relation zu den restlichen Bereichen des EKGs entsteht der Eindruck einer ST-Senkung/-Hebung [26].

Während supraventrikuläre Extrasystolen normal aussehende QRS-Komplexe haben, die verfrüht und ohne vorhergegangene P-Welle ablaufen, sieht man bei ventrikulären Extrasystolen bizarr geformte Ausschläge. Sie sind breiter als normale QRS-Komplexe, da sie sich nicht über das schnell leitende Reizleitungssystem gleichmäßig über den Herzmuskel ausbreiten. Bei einer ventrikulären Tachykardie werden normale Abfolgen von P-QRT-T abgelöst von einer schnellen Abfolge abnormal geformter ventrikulärer Komplexe, die eine Detektion von P-Wellen unmöglich macht.

Verbreiterte QRS-Komplexe können aufgrund einer verzögerten Ausbreitung des Aktionspotentials entstehen, was das Risiko für Kammerflimmern erhöht [29]. Eine Hypertrophie, also eine Vergrößerung des Herzens, kann aber genauso zu einer langen QRS-Komplex-Dauer führen, selbst bei verkürzter Reizleitungsgeschwindigkeit, wie eine Untersuchung an Kaninchenzellen zeigte [166].

Zusammenfassend hilft das EKG, Abweichungen in der Herzanatomie oder seiner Funktion, Störungen in der Reizleitung und Rhythmizität, ischämische Schäden, Elektrolytimbalancen und Nährstoffmängel sowie den möglichen Einfluss von Medikamenten und Toxinen auf das Herz zu erkennen [36].

3.3.3 Unterschiede der elektrischen Aktivität des Herzens zwischen Mensch und Maus

Kardiologische Forschung an Mäusen (*Mus musculus*) bietet die Vorteile geringer Kosten, geringerer interindividuelle Unterschiede, der hohen Verfügbarkeit genetisch veränderter Modelle und der Anwendbarkeit einer Vielzahl von hochentwickelten Methoden. Dies gilt durch Transmittertechnik auch für die Untersuchung von Elektrophysiologie und Herzarrhythmien an frei laufenden Mäusen. Das Säugerherz ist in den grundlegenden elektrophysiologischen und biophysikalischen Prinzipien gleichartig, es bestehen aber Unterschiede in anatomischen Gegebenheiten, Kanalsubtypen und deren Verteilung sowie der zellulären Regulation des Ionenhaushaltes [36, 17]. Da Mäuse und Ratten Vierbeiner sind, ruht das Herz, im Gegensatz zum Menschen, nicht auf dem Zwerchfell und hat folglich während des Herzschlages eine größere Bewegungsfreiheit [36]. Desweiteren ist es im Vergleich zum menschlichen Herzen eher ellipsoid geformt und die Vorhöfe sind in Relation zu den Hauptkammern kleiner [162]. Die

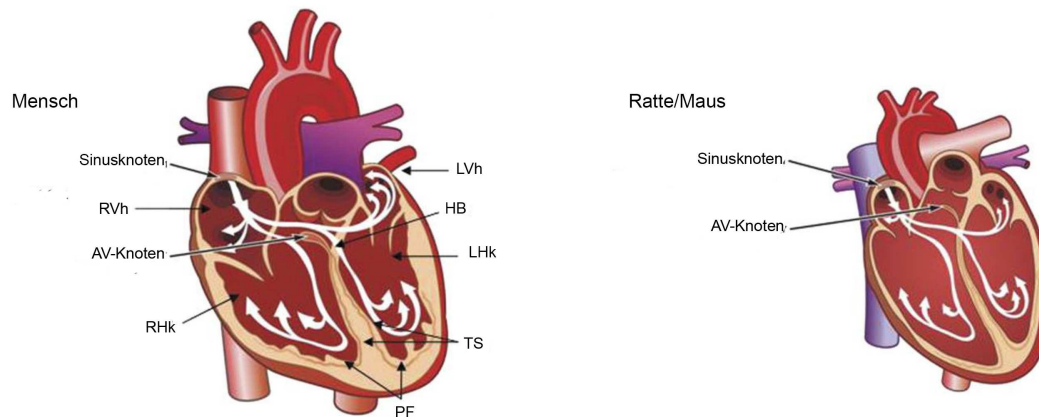


Abbildung 5: Vergleich humanes Herz (links) und Nagerherz (rechts). Die weißen Pfeile zeigen den Weg des Aktionspotentials. Man beachte, dass trotz unterschiedlicher anatomischer Gegebenheiten die Ausbreitungsrichtung sehr ähnlich ist. RVh: rechter Vorhof; LVh: linker Vorhof; RHk: rechte Hauptkammer; LHK: linke Hauptkammer; HB: His'sches Bündel; TS: Tawara-Schenkel; PF: Purkinjefasern. Modifiziert nach Farraj, Aimen K. *et al.*; 2011 [36]

Purkinjefasern sind bei kleineren Säugern dichter gepackt [140]. Bei der Maus sind die Herzkranzgefäße in der Muskulatur eingebettet und liegen nicht wie beim Menschen subepikardial. Die Zeit, in der die kontraktile Elemente (Myosin und Aktin) der Herzzellen interagieren, ist bei Labornagern kürzer als beim Menschen. Das bedeutet zwar, dass weniger Kraft entwickelt werden kann, aber auch, dass dadurch höhere Herzraten und eine schnellere Verkürzung erzielt werden [53].

Abbildung 5 vergleicht schematisch die anatomischen und elektrophysiologischen Gegebenheiten des Herzens von Mensch und Labornager.

Neben der 5-10 mal höheren Herzrate haben adulte Mäuse eine deutlich kürzere ventrikuläre Aktionspotentialdauer als der Mensch: Die unterschiedlichen Expressionslevel mancher repolarisierender Kaliumkanäle bedingen eine unterschiedliche Form des Aktionspotentials [116, 114]. Bei Mäusen steigt die Dichte der für den transienten Kaliumstrom zuständigen Kaliumkanäle auf dem Sarkolemm mit verringerter Inaktivierungskinetik mit wachsendem Alter an. Folglich bestimmt bei diesen Säugern der I_{to} maßgeblich die dreieckige Form mit fehlender Plateauphase des Aktionspotentials [159] (siehe Abbildung 5). Dafür haben langsam aktivierende (I_{Ks}) und schnell aktivierende (I_{Kr}) *delayed rectifier* Kaliumströme bei Mäusen keine Bedeutung [169]. Beim Menschen hingegen haben sie elektrophysiologisches Schwergewicht hinsichtlich der Repolarisationsphase des ventrikulären Aktionspotentials und klinische Bedeutung beim Long-QT-Syndrom [89, 14]. Der langsam inaktivierende *delayed rectifier* Strom ($I_{K,slow}$) konnte beim Menschen nicht festgestellt werden, bei Mäusen beteiligt er sich an der Initiierung der Repolarisation [90]. Eine Aufschlüsselung der detektierten Ionenströme im Aktionspotential von Mensch und Maus ist Abbildung 6 zu entnehmen.

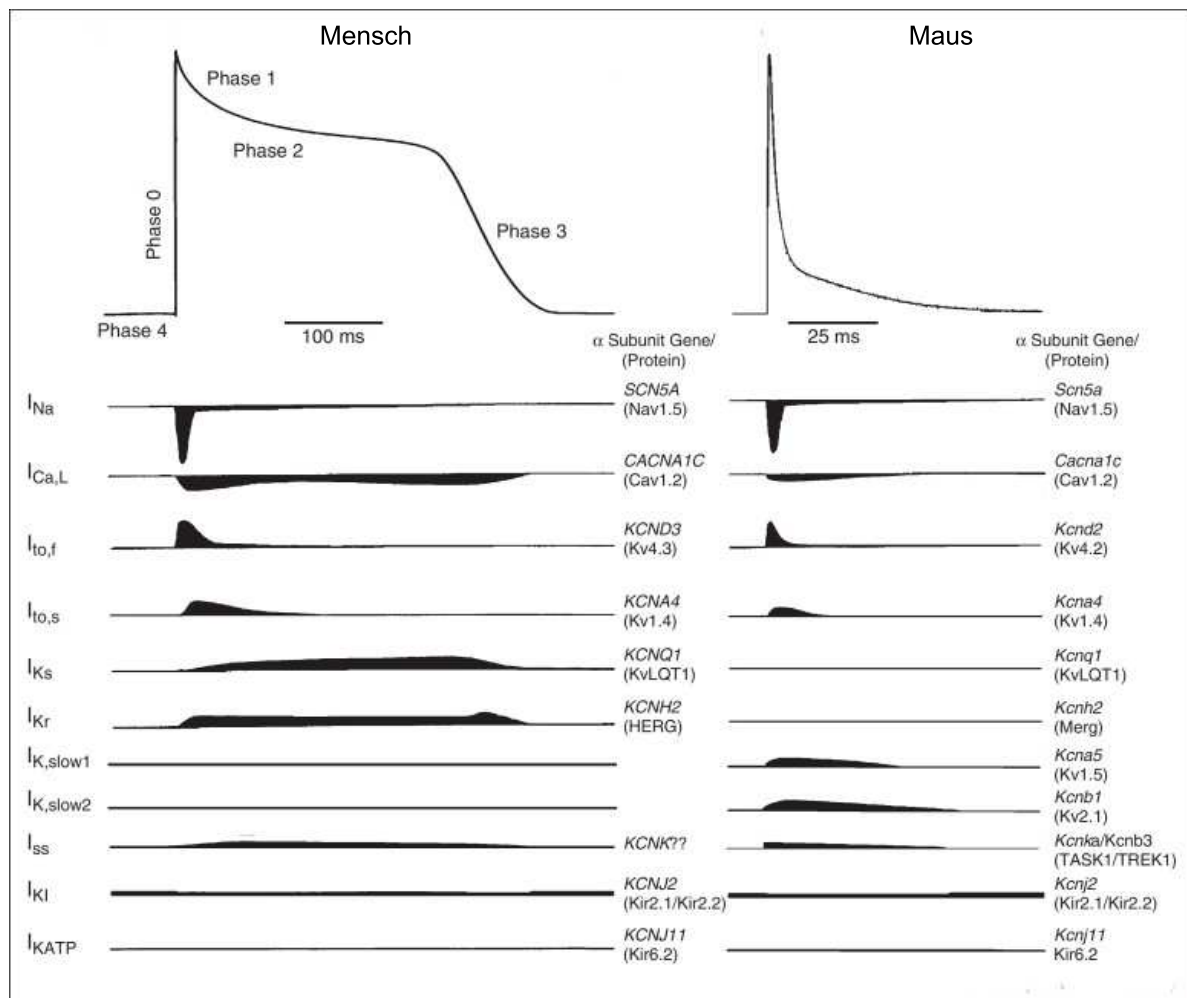


Abbildung 6: Aktionspotential ventrikulärer Zellen bei Mensch (links) und adulter Maus (rechts). Unterhalb der schematischen Abbildungen eines speziestypischen Aktionspotentials sind im zeitlichen Zusammenhang die daran beteiligten Ionenkanäle (Nomenklatur bei Mensch/Maus jeweils rechts) bzw. deren Ströme (ganz links) dargestellt. I_{Na} : Natriumstrom; $I_{Ca,L}$: L-Typ Kalziumstrom; $I_{to,f}$: schneller, transients Kaliumauswärtsstrom; $I_{to,s}$: langsamer, transients Kaliumauswärtsstrom; I_{Ks} : langsam aktivierender *delayed rectifier* Kaliumstrom; I_{Kr} : schnell aktivierender *delayed rectifier* Kaliumstrom; $I_{K,slow1,2}$: langsam inaktivierender *delayed rectifier* Kaliumstrom, I_{SS} : *steady state* Strom; I_{KI} : Kaliumeinwärtsstrom; I_{KATP} : ATP-sensitiver Kaliumstrom. Modifiziert nach Nerbonne, Jeanne M; 2014 [114]

Im EKG von Mäusen ergeben sich, abgesehen von den kürzeren RR- und PP-Intervallen, einige Besonderheiten [44]: Die P-Welle von Mäusen wird manchmal von einer kleinen, negativen Ausschlag gefolgt, deren Ursprung noch unbekannt ist. Diskutiert wird ein Zusammenhang mit minimalen Änderungen in der Elektrodenpositionierung [18]. Als Konsequenz des verkürzten Aktionspotentials ergeben sich vor allem bei der Ventrikelerde- und -repolarisation augenscheinliche Unterschiede zum menschlichen EKG. Eine Q-Zacke kann nicht immer festgestellt werden [36]. Zwischen QRS-Komplex und T-Welle kann keine ST-Strecke festgestellt werden, die isoelektrische Linie wird stattdessen gekreuzt und es kommt zur Aufzeichnung einer J-Zacke oder -Welle, eine positive Auslenkung des EKGs in Ableitung II [142, 49]. Das Ende des QRS-Komplexes wird dabei zumeist mit dem Kreuzungspunkt nach der S-Zacke nach dem isoelektrischen Punkt definiert. Legt man den zeitlichen Verlauf des Mäuse-Aktionspotentials einer ventrikulären Zelle über den QRS-Komplex, der von den Ventrikeln generiert wurde, wird

man sehen, dass späte Elemente des QRS-Komplexes mit der Repolarisation zusammen fallen müssen. Es kommt also zur Rückgenerierung des Ruhemembranpotentials, ehe alle Regionen des Herzens depolarisiert wurden [94, 16]. Daher kann aus dem EKG von Mäusen die reine Aktivierungszeit der Ventrikel nicht streng aus dem QRS-Komplex abgelesen werden. Außerdem kann es, wenn die frühe Phase der Repolarisation verlängert ist, zu einer Destruktion des QRS-Komplexes kommen, da die de- und repolarisierenden Vektoren zu diesem Zeitpunkt einander entgegengesetzt sind [16]. Die J-Welle hingegen repräsentiert rein repolarisierende Ereignisse [16]. Die T-Welle ist aufgrund des fehlenden Plateaus sehr flach und in Ableitung II zumeist negativ. Die Festlegung ihres Ende bereitet aufgrund ihres sehr flachen, fast tangentialen Auslaufens zur isoelektrischen Linie meist Schwierigkeiten. Obwohl die J-Welle die deutlichere Marke der Repolarisation im Mäuseherz darstellt und mit 90% Vollendung korreliert, ist es doch wie beim Menschen die T-Welle, die ihr Ende markiert [87, 142].

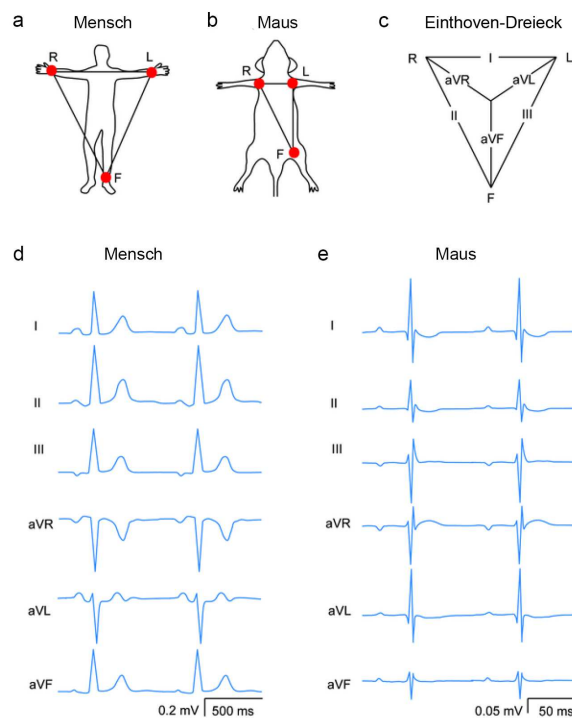


Abbildung 7: Vergleich des EKGs von Mensch und erwachsener Maus. Schematische Darstellung der Elektrodenpositionierung bei Mensch (a) und Maus (b), wobei die Elektroden als R für rechter Arm, L für linker Arm und F für linker Fuß bezeichnet werden. (c) Klassisches Einthoven-Dreieck. (D,E) Standard-EKG-Ableitungen I, II, III, aVR, aVL und aVF bei Mensch (d) und Maus (e). Modifiziert nach Boukens, Bastian J *et al.*; 2014 [18]

3.4 G-Protein vermittelte Signalkaskaden

Wie in Abschnitt 3.2.1 erwähnt, kann das Herz autark einen Herzschlag initiieren. Ändert sich das enddiastolische Volumen durch veränderte Bedingungen im Organismus an, kann das Herz autoregulativ seine Pumpeigenschaften daran anpassen. Dennoch beeinflussen extrinsische Faktoren die Herzfunktion, beginnend von kurzfristigen Anpassungen bis hin zu

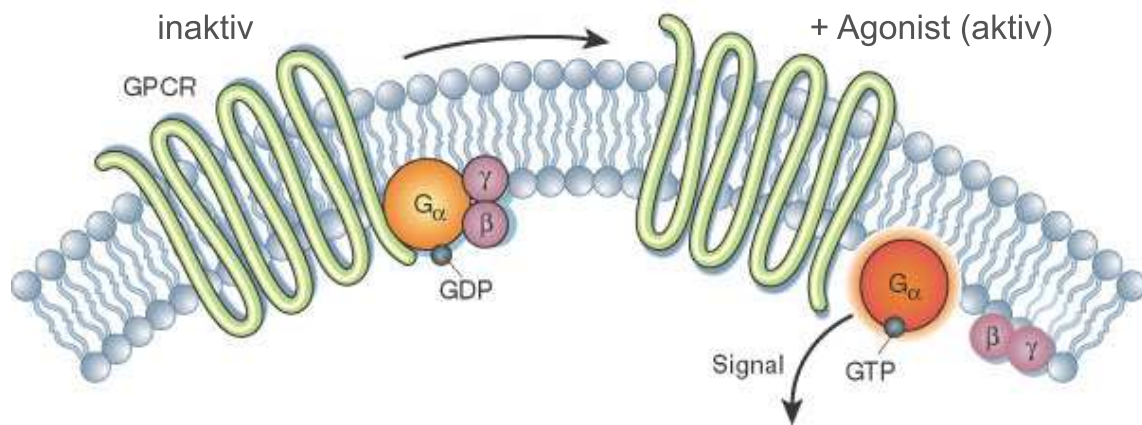


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung von G-Proteinen. Im inaktiven Zustand (links) liegen die drei Untereinheiten als Trimer gekoppelt an ihren GPCR (in grün mit 7 Transmembran-Domänen in der Plasmamembran), an der α -Untereinheit bindet GDP. Bindet ein Agonist an den GPCR, initiiert dieser die Signalkaskade (rechts). An der α -Untereinheit wird GDP gegen GTP ausgetauscht, der Komplex dissoziiert. Modifiziert nach Li, Joshua *et al.*; 2002 [91]

Umstrukturierungen im intra- und extrazellulären Bereich. Ein erheblicher Teil dieser Vorgänge wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptor*, GPCR) in der Zellmembran der Herzmuskelzelle vermittelt [150]. Medikamente, die adrenerge und Angiotensin induzierte GPCR-Signalwege beeinflussen, machen den Großteil der Verschreibungen für Herz-Kreislauf-Erkrankungen aus [132, 20]. GPCRs sind eine sehr heterogene und große Gruppe von Membranrezeptoren, deren Mitglieder aus einem einzigen, gefalteten Polypeptid bestehen und Transmembranprotein-Domänen im intra- und extrazellulären Bereich haben. Insgesamt sieben Segmente spannen sich dabei als Transmembran-Abschnitte durch die Zellmembran. Auf extrazellulärer Seite befindet sich eine Bindungsstelle für externe Signalmoleküle. Bindet ein Agonist daran, kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors. Namensgebend interagieren die Rezeptoren auf ihrer zytosolischen Seite mit G-Proteinen (Guaninnucleotid-bindende Proteine). Diese Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, sind also heterotrimär: eine α -, eine β - und eine γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bindet entweder Guanosindiphosphat (inaktiver Status, GDP) oder Guanosintriphosphat (aktiver Status, GTP). Wenn an der α -Untereinheit GDP gebunden ist, befindet sich das G-Protein in seinem inaktiven Zustand. In Anwesenheit eines spezifischen Liganden initiiert der Rezeptor den Austausch von GDP zu GTP. Daraufhin dissoziiert der Komplex in die α -Untereinheit mit dem gebundenen GDP und ein Dimer aus β - und γ -Untereinheit. In dieser Form interagieren die aktivierten Untereinheiten mit anderen Proteinen. Die Interaktion kann sowohl hemmend wie auch stimulierend sein. Viele der Zielproteine sind selbst Enzyme, die *second messenger* produzieren, oder Ionenkanäle, die Ionen wie Kalzium in der Zelle als *second messenger* einströmen lassen. Wird GTP zu GDP hydrolysiert, bilden die Untereinheiten wieder einen inaktiven heterotrimären Komplex und koppeln an den GPCR. Dabei ist es die α -Untereinheit selbst, die durch GTPase-Aktivität die Hydrolyse katalysiert [163]. Abbildung 8 zeigt schematisch die Initiierung der G-Protein vermittelten Signalkaskade.

Im menschlichen Genom sind mehr als 1000 GPCRs kodiert [163], viele von Ihnen kommen

ubiquitär vor. Etwas weniger als die Hälfte davon binden als nichtsensorische Rezeptoren an Hormone, Neurotransmitter oder Botenstoffe, und oftmals sind die physiologischen Liganden unbekannt [163]. Anhand von strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten der $G\alpha$ -Untereinheit, die letzten Endes die grundsätzlichen Eigenschaften des G-Proteins definieren, werden diese in 4 Familien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$. Dabei sind die GPCRs mitunter in der Lage, mehr als einen G-Protein Subtyp zu aktivieren. Bindet also ein Ligand an einen GPCR, können mehrere Signalkaskaden aktiviert werden. Die jeweils aktivierte G-Protein-Untereinheit definiert dabei die biologisch-zelluläre Antwort [163]. Douglas D. Tilly hat 2011 einen detaillierten Überblick über kardiale G-Proteine und den damaligen Wissensstand zu ihren Rezeptoren, Effektoren, weiteren Mediatoren und ihrer Wirkung auf das Herz veröffentlicht [150]. Im Folgenden sollen die wichtigsten von ihnen vorgestellt werden.

$G\alpha_s$ -Proteine aktivieren die Adenylylcyclase. Diese bildet aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das seinerseits Proteinkinasen vom Typ A (PKA) aktiviert. Im Herzen etwa führt die Aktivierung von β_1 -Adrenorezeptoren zu einem Anstieg von cAMP. Die PKA sorgt über die Phosphorylierung ihrer Substrate wie RyR, Phospholamban, L-Typ Kalziumkanäle, kardiales Troponin I und das kardiale Myosin-*binding-protein* C für einen positiv inotropen und lusitropen Effekt, also einer gesteigerten Kontraktionsfähigkeit und effizientere Entspannung [150]. Dabei kommt es via RyR und L-Typ Kalziumkanäle zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums, die Hemmung von Phospholamban führt zu einer gesteigerten Tätigkeit der Kalziumpumpe SERCA und die Phosphorylierung von Troponin I und kardialem Myosin-*binding-protein* C führt zu verminderter Affinität der Myofilamente zu Kalzium - das Herz relaxiert schneller. cAMP führt außerdem zu einer Aktivierung von EPAC (*exchange protein activated by cAMP*), welches seinerseits die Effekte verstärkt [138]. Auch die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CAMKII), die Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) und die Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ) sind in die Prozesse involviert. Die Bildung von cAMP sorgt außerdem für positiv chronotrope (frequenzsteigernde) Effekte, indem letztendlich am Membranpotential beteiligte Ionenkanäle beeinflusst werden. β -Arrestine dienen als Gerüstproteine (*scaffold*) für EPAC und CAMKII, bringen diese nahe an den aktivierten β_1 -Adrenorezeptor und damit an die Adenylylcyclase, die für die CAMKII Bildung essentiell ist [98]. EPAC und damit indirekt der Anstieg von cAMP sind außerdem an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligt [109].

Die Familie der $G\alpha_{i/o}$ -Proteine, insbesondere $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, vermitteln die Hemmung der Adenylylcyclase. Der Parasympathikus entfaltet etwa über muskarinerge M_2 Acetylcholinrezeptoren seine Wirkung. Als Folge kommt es zu Inhibierung der Adenylylcyclase, von cAMP und der PKA [163, 150].

AKAPs (*a kinase anchoring protein*) regulieren die G_s - und G_i -Protein medierten Signalwege auf Höhe der Adenylylcyclase und der cAMP Phosphodiesterase (PDE) [50].

Nach G_i -Protein Aktivierung konnte gezeigt werden, dass die $\beta\gamma$ -Untereinheit indirekt die G_s -cAMP - PKA Signalkaskade einschränkt [68]. Auch eine direkt negativ inotrope Wirkung der $\beta\gamma$ -Untereinheit wird diskutiert, indem L-Typ Kalziumkanäle inhibiert werden [155]. Außerdem sind G_i - und $\beta\gamma$ -medierte Signalwege bei der Entstehung von Herzhypertrophien und

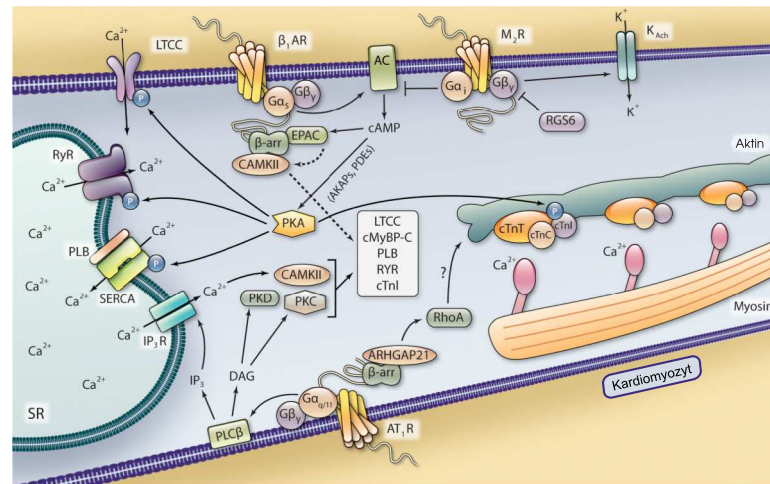


Abbildung 9: Einfluss von G-Protein und β -Arrestin vermittelter Signalwege auf die Kontraktibilität einer Herzmuskelzelle. Verwendete Abkürzungen: AC: Adenylylcyclase; AKAP: *a kinase anchoring protein*; ARHGAP21: Rho-GTPase aktivierendes Protein, AT₁R: Angiotensin II Rezeptor Typ 1; CAMKII: Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cMyBP: kardiales Myosin-binding-protein C; cTnI: kardiales Troponin I; cTnC: Kardiales Troponin C; cTnT: kardiales Troponin T; DAG: Diacylglycerine; EPAC: *exchange protein activated by cAMP*; IP₃: Inositoltriphosphat; IP₃R: Inositoltriphosphatrezeptor; K_{Ach}: GPCR-abhängiger *inward rectifier* Kaliumkanal; LTCC: L-Typ Kalziumkanal; M₂R: muscarinerge Acetylcholinrezeptor 2; PDE: Phosphodiesterase; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C, PKD: Proteinkinase D; PLB: Phospholamban; PLC β : Phospholipase C β ; RGS6: *regulator of G protein 6*; RhoA: RhoA GTPase; RyR: Ryanodinrezeptor; SERCA: Ca²⁺ ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; β_1 AR: β_1 Adrenorezeptor; β arr: β Arrestin. Modifiziert nach Tilley, Douglas G; 2011 [150]

Arrhythmien beteiligt [131]. Nach Ischämie-Reperfusion-Stress spielt G_i hingegen eine kardioprotektive Rolle [28].

Die Aktivierung von Proteinen der G_{12/13} Familie führt zur Initiierung einer Signalkaskade über die Familie der RhoGEF-Proteine, der GTPase RhoA und der folgenden Interaktion mit zahlreichen Zielen [105]. Bekannt ist eine Beteiligung G_{12/13}-initiiertes Signalwege bei Hypertrophie und Fibrosierung des Herzens [100, 117, 118, 148].

Die Bedeutung G_{q/11}-Protein vermittelter Signalwege werden im folgenden Unterkapitel 3.4.1 separat besprochen.

Eine schematische Darstellung der G-Protein und β -Arrestin medierte Signalkaskaden in Bezug auf die Herzkontraktibilität ist in Abbildung 9 dargestellt.

3.4.1 G_{q/11} vermittelte Signalwege

Neben den G_{12/13} vermittelten Signalwegen sind es vor allem jene der G_{q/11} Subfamilie, deren Bedeutung in den verschiedenen Herzzelltypen in vielen Bereichen weiterer Erforschung bedürfen. Die cDNA muriner G α_q und G α_{11} -Proteinuntereinheiten sind größtenteils identisch [145]. Dabei ergibt sich zwischen den von den beiden Proteinkomplexen initiierten Signalwegen eine gewisse Redundanz [122]. Sie werden in allen Säugerzellen [163] und somit auch in Herzzel-

len exprimiert. Rezeptoren, die mit $G_{q/11}$ interagieren können, sind z. B. der α_1 -adrenerge Rezeptor, der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor und der Endothelin Typ A Rezeptor.

$G\alpha_q$ -Proteine aktivieren die Phospholipase C β (PLC β). Diese spaltet aus den Membranphospholipiden PIP $_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerine (DAG). IP $_3$ bindet an seinen Rezeptor am Sarkoplasmatischen Retikulum, was zum Ausstrom von Kalzium führt. Des Weiteren werden die Proteinkinasen C (PKC) in mehreren Isoformen, D (PKD) und CAMKII mobilisiert [32]. Diese Kinasen modulieren ähnliche Targets wie die cAMP aktivierte PKA, so etwa die L-Typ Kalziumkanäle, Phospholamban und RyR. Folglich beteiligen sich einige der G_q initiierten Signalwege an Inotropie und Chronotropie des Herzens. Da es aber vielfach zu Interaktionen mit G_s -Protein initiierten Wegen kommt [34, 8, 21], ist die genaue Gewichtung als auch die genauen Signalwege immer noch ein offener Punkt der aktuellen Forschung. Die Interaktion der Vielzahl an aktivierten Signalwegen ist hoch komplex. So initiiert zum Beispiel die PKC β II die Phosphorylierung des kardialen Troponin I, um die Kalziumsensitivität der Myofilamenten zu erhöhen [157]. Weitere Studien an Kardiomyozyten aus pathologisch dilatierten Herzen zeigten, dass PKC α und ϵ die Kalziumsensitivität senken [76]. Wahrscheinlich sind es derart komplex verwobene Mechanismen, die es $G_{q/11}$ mediierten Signalwegen erlauben, die Kontraktilität des Herzens sehr fein zu regulieren [150].

Mehrfach konnte eine mögliche Beteiligung $G_{q/11}$ vermittelte Signalwege an der Entstehung von Hypertrophien gezeigt werden. Generell kann die Hypertrophie des Herzens ein normaler, adaptiver Prozess an gesteigerte Arbeit sein, oder aber sich pathologisch bis hin zum Herzversagen entwickeln [32]. So wurde festgestellt, dass eine Überexpression von $G\alpha_q$ im Mäusemodell zu Herzversagen führt [27]. Währenddessen kommt es im Knockoutmodell, also wenn die Expression von $G\alpha_{q/11}$ ausgeschaltet wird, zu einer Unterdrückung der Hypertrophie, wenn diese durch Nachlasterhöhung als Folge einer Aortenverengung künstlich provoziert wird [1, 164, 32]. Es sind außerdem mehrere hundert Gene bekannt, deren Transkription $G_{q/11}$ vermittelt reguliert werden. Die Botenstoffe Angiotensin II und Endothelin-1, die am Herzen G_q koppelnde Rezeptoren besitzen, führten in Zellkulturexperimenten zur Zunahme von $G_{q/11}$ abhängigen Transkripten, welche mit Hypertrophie im Zusammenhang stehen [25, 85]. Des Weiteren sind eine Reihe weiterer Mechanismen der Signalkaskade bekannt, die z. B. über diverse PKC-Isoformen, PLCs, MAPKs (Mitogen aktivierte Proteinkinasen, die an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod beteiligt sind) eine wachstumsfördernde Wirkung entfalten [33, 41, 95, 74, 65].

In $G_{q/11}$ Doppelknockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass diese Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrolle weniger altersbedingte Fibrosierung des extrazellulären Raumes aufweisen. Die Transkription gewisser matrizellulärer Gene war in diesen Tieren herunterreguliert [167].

Noch weitaus mehr Forschungsbedarf hat die mögliche Bedeutung $G_{q/11}$ vermittelter Signalwege für elektrophysiologische Mechanismen am Herzen. Pahlavan und Kollegen konnten an stimulierten ventrikulären Zellen zeigen, dass die An- oder Abwesenheit von endogenem G_q und/oder G_{11} unterschiedliche Effekte auf Kaliumströme und Aktionspotential hatte und schlu-

gen daher eine physiologische Rolle von $G_{q/11}$ an der basalen Zellhomöostase vor [123]. Des Weiteren wurde im selben Tiermodell festgestellt, dass im Doppelknockout die Herzrate niedriger und zeitgleich das relative Schlagvolumen höher war [167].

Das globale Zusammenspiel der $G_{q/11}$ Signalkaskade von subzellulärer Ebene bis hin zum Organismus bleibt hinsichtlich der elektrischen Herzzellaktivität aber weiterhin größtenteils unklar. Mehrere Faktoren erschweren es, die spezielle Bedeutung von direkter G_q -Protein vermittelter Wirkung *in-situ* und *in-vivo* zu untersuchen:

- G_q -Proteine und deren heterogene Rezeptoren kommen nicht nur auf Herzzellen, sondern praktisch auf jedem Zelltyp vor. Das Vorkommen z. B. auf der glatten Muskulatur der Herzkranzgefäße limitiert zahlreiche Methoden zur Untersuchung der herzzellspezifischen Folgen einer G_q -Protein Aktivierung.
- Die im Säugerorganismus bekannten Liganden bzw. Agonisten der Rezeptoren binden nicht exklusiv an G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren. Stimulation mit einem solchen Agonisten würde daher auch andere Rezeptoren aktivieren.
- Die endogenen Rezeptoren selbst bzw. die nachgeschalteten Effektoren können multiple Signalwege beeinflussen. Es kommt daher zu molekularen Wechselwirkungen, insbesondere mit G_s -vermittelten Signalkaskaden.

3.4.2 DREADDS

Eine Möglichkeit, diese Problematik zu überwinden, bestünde darin, einen Rezeptor zur Verfügung zu haben, dessen Ligand keine Affinität zu weiteren Rezeptoren besitzt. Optimalerweise würde der Ligand auch nicht basal im Organismus vorliegen, sondern kann gezielt an den Rezeptor herangetragen werden. Außerdem sollte der Rezeptor nur auf Zellen von Interesse exprimiert werden und spezifisch an G_q -Proteine koppeln.

Diese Eigenschaften vereinen sogenannte DREADDs. DREADD steht für *designer receptor exclusively activated by designer drugs*, also Designerrezeptoren, die nur durch Designersubstanzen aktiviert werden können. Es handelt sich dabei um aus endogenen Vorgängern durch direkte Mutagenese veränderte Rezeptoren (*designer receptor*), die dadurch ihre Affinität zu ihrem natürlichen Agonisten verloren haben. Sie lassen sich aber durch pharmakologisch inerte Moleküle (*designer drugs*) aktivieren [23]. In den frühen 90er Jahren wurden Versuche mit diversen Komponenten an modifizierten β_2 -Adrenorezeptoren (Austausch von Asp¹¹³ gegen Ser) durchgeführt. Diverse Ketone und Katecholester waren in der Lage, den modifizierten Rezeptor zu aktivieren, nicht aber einen natürlichen β -Adrenorezeptor [144]. Allerdings war damals die Affinität zum Liganden noch nicht zufriedenstellend und die Pharmakokinetik der getesteten Komponenten war zu unberechenbar für eine Anwendung am Gesamtorganismus [23]. Coward und Kollegen konnten 1998 einen auf κ -Opioidrezeptoren basierenden Rezeptor vorstellen und betitulierte ihn als RASSL (*receptor solely activated by a synthetic ligand*) [24]. Dieser RASSL hatte eine hohe Affinität zu seinen synthetischen Liganden wie Spiradoline

und konnte daher in transgenen Mäusen zu Forschungszwecken an G_i -Protein gekoppelten Signalwegen verwendet werden [127, 110]. Spiradoline ist aber auch Agonist natürlicher κ -Opioidrezeptoren, was das Einsatzgebiet für *in-vivo* Studien einschränkt. 2007 konnte die Gruppe um Bryan L. Roth dann erstmals Rezeptoren vorstellen, die auf muskarinischen Acetylcholinrezeptoren basieren und durch wenige Punktmutationen so modifiziert wurden, dass sie mit hoher Affinität im nanomolaren Bereich den künstlichen Agonisten Clozapin-N-Oxid (CNO) binden, aber ihre Affinität zum natürlichen Liganden Acetylcholin verloren haben. Sie veröffentlichten diese Rezeptorengruppe als DREADDs [4]. Der humane M3 muskarinische Rezeptor wurde in Hefekulturen durch Y3.33C (=Y149C) und A5.46G (=A239G) verändert, was dem Austausch eines Tyrosins gegen Cystein in der dritten und dem eines Alanins gegen ein Glycin in der fünften Transmembranhelix entspricht. Dadurch entstand ein spezifisch G_q -Protein koppelnder Rezeptor, der *in-vivo* als auch *in-vitro* neben seinen endogenen Pendanten bestehen konnte. Weder wurde der Designerrezeptor von den natürlichen Agonisten angesprochen, noch zeigten natürliche Rezeptoren Affinität zu CNO. Des Weiteren kommt es nach Stimulierung der neuen hM3Dq (*human M3 muscarinic DREADD receptor coupled to G_q*) mit CNO zu keiner Erhöhung von cAMP, also einer Eliminierung der Wechselwirkung mit G_s -Protein vermittelten Signalwegen [48]. Da die mutierten Proteinsequenzen innerhalb der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren hoch konserviert sind, konnten auf diesen Weg auch G_s - und G_i -Protein koppelnde DREADDs generiert werden (M3D_s und M4D_i [160]). Neuere Generationen erlauben durch zusätzliche Punktmutationen auch eine Abgrenzung und gezielte Aktivierung reiner G_q - oder β -Arrestin vermittelter Signalwege [113, 60]. Eine strukturelle und funktionelle Schemadarstellung findet sich in Abbildung 10 (entnommen aus Wess 2016 [160] und modifiziert).

DREADDs können in genetisch modifizierten Organismen im gewünschten Zielgewebe exprimiert werden. Dazu kann man die genetische Information etwa über Injektion viraler Vektoren einbringen. Dabei kann man sich entweder eines einen FLEX-(*flip-excision*)-*switch* Ansatz oder zelltypspezifischen Promotoren in den Viren bedienen [13, 156, 45, 108, 35]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Generierung transgener Mäuselinien. Hier wird ebenfalls auf zelltypspezifische Promotoren gesetzt. Durch Mikroinjektion in Eizellen wird das Genkonstrukt mitsamt der Information für DREADD und Promotor in befruchtete Eizellen von Mäusen eingeschleust. Dabei kann die Fremd-DNA in den nachfolgenden Zellteilungen durch Rekombination stabil ins Erbgut eingebaut werden, der Ort des Einbaus ist dabei zufällig. Daneben besteht die Möglichkeit, über ein Cre/loxP-Rekombinationssystem in genetisch modifizierten Mäusen die Expression eines DREADDs erst durch Gabe des Rekombinase-Aktivators Tamoxifen zu ermöglichen [172, 173, 158]. Die Cre-Rekombinase kann man wiederum durch zelltypspezifische Promotoren auf einen gewünschten Zelltyp limitieren. Diese Methode erlaubt es, relativ schnell ein Modell zu etablieren und den Zelltyp von Interesse zu untersuchen. Detaillierte Einblicke über die zur Verfügung stehenden Strategien, DREADDs an spezifischer Stelle im tierischen Organismus einzubringen, finden sich in Urban *et al.* 2015 [153] und Zhu *et al.* 2016 [173]. Diese chemogenetischen Werkzeuge haben sich in den letzten Jahren seit Veröffentlichung

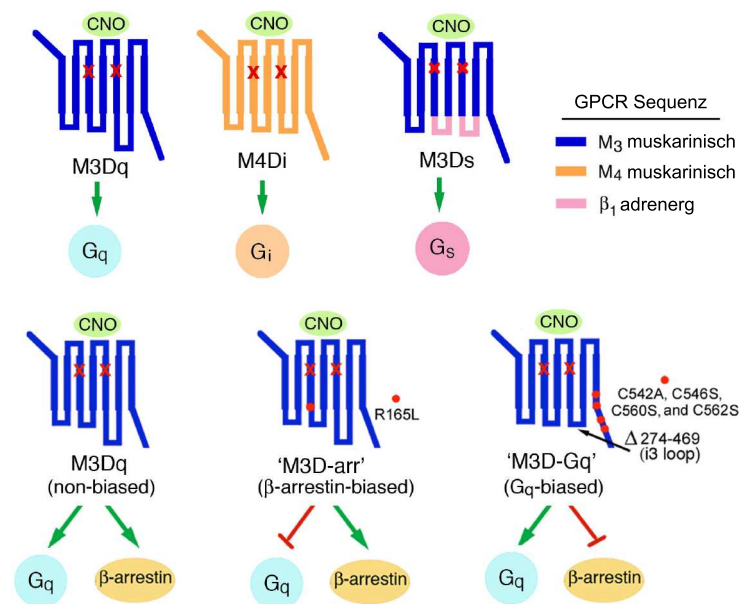


Abbildung 10: Struktur und Eigenschaften gängiger DREADDs. Alle *human muscarinic* DREADDs basieren auf muskarinische Acetylcholinrezeptoren und weisen zwei Punktmutationen (Y3.33C und A5.46G, markiert durch rote Kreuze) auf. G_q-Protein koppelnde DREADDs basieren auf muskarinischen M3 Rezeptoren (M3Dq, oben links), G_i-Protein koppelnde auf muskarinischen M4 Rezeptoren (M4Di, oben Mitte). G_s-Protein koppelnde Rezeptoren wurden durch den Austausch der intrazellulären Schleifen 2 und 3 des Ratten-M3-Rezeptors gegen die entsprechenden Schleifen eines Truthuhn-β₁-adrenergen Rezeptors erhalten (oben rechts). Neuere Generationen des M3Dq erlauben die wechselweise spezifische Aktivierung von G_q und/oder β-Arrestin (untere Reihe). Modifiziert nach Wess, Jürgen; 2016 [160]

vor allem bei der Erforschung neurologisch aktiven Gewebes eine wachsende Beliebtheit erfahren [129]. Daneben konnte mit Hilfe von DREADDs etwa in der Onkologie [170] Diabetologie [48, 174], Nephrologie [102] und Hepathologie [92] neue Erkenntnisse gewonnen werden. Prinzipiell wird ihr enormes Potential in nichtneurologischen Geweben noch nicht ausgenutzt. Dabei sind, wie eingangs erwähnt, G-Protein vermittelte Signalwege in jeder Zellart von Bedeutung, insbesondere im Herzen. Besonders spezifisch von G_q Proteinen medierte Signalkaskaden sind hinsichtlich akuter und elektrophysiologischer Wirkung unzureichend erforscht.

3.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung G_q -Protein vermittelter Signalwege im Säugerherzen mit Hilfe einer neuen transgenen Mauslinie. Diese Mauslinie exprimiert einen $M3D_q$ -DREADD (kurz: Dq) ausschließlich in quergestreifter Muskulatur (Herz- und Skelettmuskelzellen). Anders als bei natürlichen Analoga soll folglich eine gezielte Aktivierung der Signalkaskade im Herzen möglich sein und würde damit einen wesentlichen Vorteil in der Erforschung bringen.

Parallel sollte einerseits die Eignung der Mauslinie als Modell für die kardiologische Grundlagenforschung und andererseits am lebenden, wachen Tier, am isoliert und autark schlagendem Herzen und an Einzelzellisolaten die Auswirkungen des aktivierten G_q -Signalweges auf elektrophysiologische und -pathologische Vorgängen untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit soll daher folgende Fragestellungen beantworten:

- Wird Dq gewebespezifisch exprimiert? Ist Dq wie seine natürlichen Analoga korrekt an der Zellmembran von Herzmuskelzellen lokalisiert?
- Wie verändert eine gezielte Aktivierung von Dq die elektrische Funktion des Herzens im Tiermodell, insbesondere die Erregungsbildung, -weiterleitung und Erregungsrückbildung?
- Können am lebenden Organismus beobachtete Folgen der Rezeptor-Aktivierung am isolierten Herzen und daher unter Ausschluss systemischer Effekte reproduziert werden?
- Ist die Wirkung des synthetischen Dq-Liganden CNO spezifisch und dosisabhängig?
- Eignet sich eine optische Messung mittels spannungssensitiven, ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff (di-8-ANNEPS), um die Veränderung der Aktionspotentialdauer in isolierten neonatalen und adulten Herzzellen nach CNO-Gabe zu bestimmen?

4 Material und Methoden

4.1 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendete transgene Mauslinie MCK-Dq wurde freundlicherweise von Ph.D. Jürgen Wess, National Institutes of Health, US-Bethesda zur Verfügung gestellt. Die kodierende DNA enthielt einen modifizierten Hybrid des Ratten- und Menschen-M3-Rezeptor mit Y149C und A239G Punktmutationen (r/hM3Dq, folgend mit Dq bezeichnet). N-terminal lag ein Hämagglutinin(HA)-Tag vor, welcher für die Genotypisierungs- und Proteinnachweissstrategie genutzt wurde. Im folgenden ist die cDNA des Rezeptors samt HA-Tag (Fettschrift) abgebildet.

```

ATGTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCCACCTTGCACAGTAACAGTAC
AACCTCGCCTTTGTTTCCCAACATCAGCTCTTCCTGGGTGCACAGTCCCT
CGGAGGCAGGGCTGCCCTTGGGGACAGTCACTCAGTTGGGCAGCTACAAC
ATGTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCCACCTTGCACAGTAACAGTAC
AACCTCGCCTTTGTTTCCCAACATCAGCTCTTCCTGGGTGCACAGTCCCT
CGGAGGCAGGGCTGCCCTTGGGGACAGTCACTCAGTTGGGCAGCTACAAC
ATTTACAAGAACTGGGAATTTCTCCTCAAACGACACCTCCAGCGACCC
TCTCGGGGGTCACACCATCTGGCAAGTGGTCTTCATTGCCTTCTTAACTG
GCTTCCTGGCATTGGTGACCATCATCGGCAACATCCTGGTAATTGTGTCA
TTTAAGGTCAACAAGCAGCTGAAGACGGTCAACAATACTTCTCCTTAAG
CCTGGCCTGTGCCGATCTGATTATCGGGGTCAATTCATGAATCTGTTTA
CGACCTACATCATCATGAATCGATGGGCCTTAGGGAACTTGGCCTGTGAC
CTCTGGCTTGCCATTGACTGCGTAGCCAGCAATGCCTCTGTTATGAATCT
TCTGGTCATCAGCTTTGACAGATACTTTTCCATCACGAGGCCGCTCACGT
ACCGAGCCAAACGAACAACAAGAGAGCCGGTGTGATGATCGGTCTGGCT
TGGGTCATCTCCTTTGTCCTTTGGGCTCCTGCCATCTTGTTCTGGCAATA
CTTTGTTGGAAAGAGAACTGTGCCTCCGGGAGAGTGCTTCATTAGTTCC
TCAGTGAGCCCACCATTACTTTTGGCACAGCCATCGCTGGTTTTTATATG
CCTGTCACCATTATGACTATTTTATACTGGAGGATCTATAAGGAACTGA
AAAGCGTACCAAAGAGCTTGCTGGCCTGCAAGCCTCTGGGACAGAGGCAG
AGACAGAAAACCTTTGTCCACCCACGGGCAGTTCTCGAAGCTGCAGCAGT
TACGAACTTCAACAGCAAAGCATGAAACGCTCCAACAGGAGGAAGTATGG
CCGCTGCCACTTCTGGTTTACAACCAAGAGCTGGAAACCCAGCTCCGAGC
AGATGGACCAAGACCACAGCAGCAGTGACAGTTGGAACAACAATGATGCT

```

GCTGCCTCCCTGGAGAACTCCGCCTCCTCCGACGAGGAGGACATTGGCTC
 CGAGACGAGAGCCATCTACTCCATCGTGCTCAAGCTTCCGGGTCACAGCA
 CCATCCTCAACTCCACCAAGTTACCCTCATCGGACAACCTGCAGGTGTCC
 AACGAGGACCTGGGGACTGTGGATGTGGAGAGAAATGCTCACAAGCTTCA
 GGCCCAGAAGAGCATGGGTGATGGTGACAACCTGTCAGAAGGATTTACCA
 AGCTTCCCATCCAGTTAGAGTCTGCCGTGGACACAGGCAAGACCTCTGAC
 ACCAACTCCTCGGCAGACAAGACCACGGCTACTCTACCTCTGTCCTTCAA
 GGAGGCCACGCTGGCTAAGAGGTTTGCTCTCAAGACCAGAAGTCAGATCA
 CCAAGCGGAAGAGGATGTCGCTCATCAAGGAGAAGAAGGCCGCCAGACG
 CTCAGTGCCATCTTGCTAGCCTTCATCATCACGTGGACCCCCTACAACAT
 CATGGTCCTGGTGAACACCTTCTGTGACAGCTGCATACCCAAAACCTATT
 GGAATCTGGGCTACTGGCTGTGCTATATCAACAGCACCGTGAACCTGTG
 TGCTATGCCCTGTGCAACAAAACATTGAGAACCACCTTCAAGACGCTCCT
 CTTGTGCCAGTGTGACAAAAGGAAGAGGCGCAAACAGCAGTACCAGCAGA
 GACAGTCGGTCATTTTTTCACAAGCGAGTGCCGGAGCAGGCCTTGTAG

Um eine Expression allein in quergestreifter Muskulatur (wie der Herzmuskulatur) zu erreichen, wird diese durch den MCK (*muscle creatine kinase*)-Promotor kontrolliert.

Die transgenen Tiere hatten als genetischen Hintergrund den Stamm C57Bl/6 und wurden abermals mit C57Bl/6 Mäusen verpaart. Da in klassisch transgen erzeugten Tieren die Fremd-DNA Intregation zufällig geschieht, wurden keine homozygoten Tiere erzeugt. Als Kontrolltiere dienten die aus den selben Verpaarungen hervorgegangenen, nicht transgenen Mäuse. Sie werden fortlaufen als Wildtyp (WT) bezeichnet.

Alle Tierversuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes beantragt und vom Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes unter der Nummer 41/2012 genehmigt.

4.1.1 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in den Tierställen der Universität des Saarlandes, Campus Homburg unter standardisierten Bedingungen gehalten. Diese beinhalten einen 12 Stunden Tag/12 Stunden Nachtzyklus (Tagzyklus beginnend um 7 Uhr MEZ), bei Raumtemperatur von 20-24 °C und 45-65% Luftfeuchtigkeit. Als Einstreu wurde Lignocell[®] FS 14 (Altromin Spezialfutter GmbH Co. KG, D-Lage) verwendet. Futter (Standard-Haltungsdiät für Maus und Ratte, Altromin Spezialfutter GmbH Co. KG, D-Lage, bzw. ssniff Spezialdiäten GmbH, D-Soest) und Wasser standen während Haltung und Experimenten *ad libitum* zur Verfügung. Alle Tiere wurden täglich in Augenschein genommen, um auf etwaige Änderungen von Gesundheitsstatus und Tierwohl tierschutzgerecht reagieren zu können. Es fand kein spezielles Training der Mäuse statt, um sie an Fixierung und ähnliche Interaktionen zu gewöhnen.

4.1.2 Verwendete Primer für die Genotypisierung

Die für die Genotypisierung verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden, wie die Mauslinie, von Ph.D. Jürgen Wess, National Institutes of Health, Bethesda (USA) zur Verfügung gestellt und sind nachfolgend genannt. Frau Tanja Kuhn, Frau Dr. Monika Barth-Schäuble und Frau Dr. Sandra Ruppenthal führten routinemäßig die Genotypisierung mittels PCR-Analyse durch. Verwendete Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung:

5'-CCGACTACGCCACCTT-3'

3'-CAGTTTCTTGTGAAATGTTGTAGCTGC-5'

4.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezug/Hersteller
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	n.a.	GE Healthcare Europe GmbH, D-Freiburg
Clozapin-N-Oxid (CNO)	34233-69-7	Jürgen Wess über NIH, US-Bethesda
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	7558-79-4	Grüssing GmbH, D-Filsum
DL-Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Ethanol vergällt	64-17-5	UdS - Zentrales Chemikalienlager, D-Saarbrücken
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	67-42-5	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs
Extrazelluläre Matrix (EZM) Gel / EHS Matrix	n.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Fötale Bovines Serum (FBS)	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Glukose (D(+)-Glukose)	50-99-7	Applichem GmbH, D-Darmstadt
Glyzerin	56-81-5	Carl Roth, D-Karlsruhe
Glyzin	56-40-6	Carl Roth, D-Karlsruhe
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	7365-45-9	Merck KGaA, D-Darmstadt
Insulin vom Rinderpankreas ≥ 25 USP	11070-73-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Kaliumchlorid (KCl)	7447-40-7	Merck KGaA, D-Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	7778-77-0	Merck KGaA, D-Darmstadt
Kalziumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10035-04-8	Fluka Chemie GmbH, CH-Buchs
Kanamycin A (Pulver, <i>BioReagent</i>)	25389-94-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Magermilchpulver	n.a.	TSI GmbH & Co.KG, D-Zeven
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	7786-30-3	Merck KGaA, D-Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	7487-88-9	Merck KGaA, D-Darmstadt

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezug/Hersteller
Methanol	67-56-1	UdS - Zentrales Chemikalienlager, D-Saarbrücken
Natriumchlorid (NaCl)	7647-14-5	VWR International GmbH, D-Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	ICN Biomedicals Inc., US-Aurora
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	144-55-8	UdS - Zentrales Chemikalienlager, D-Saarbrücken
Natriumhydroxid (NaOH)	1310-73-2	Grüssing GmbH, D-Filsum
Natriumpyruvat	113-24-6	Alfa Aesar Johnson Matthey GmbH, D-Karlsruhe
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	10102-18-8	VWR International GmbH, D-Darmstadt
Natriumzitat	6132-04-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4x)	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20x)	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10x)	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kDa	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
PBS Tabletten (Phosphatgepufferte Salzlösung)	n.a.	VWR International GmbH, D-Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	n.a.	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Pluronic [®] F-127 (20% Lösung in DMSO)	n.a.	Life Technologies Europe BV, NL-Bleiswijk
Ponceau S	6226-79-5	Carl Roth, D-Karlsruhe
Reporter Lysis 5x Buffer	n.a.	Promega GmbH, D-Mannheim
Quick Start [™] Bradford 1x Dye Reagent	n.a.	Biorad Laboratories Inc., US-Hercules
Salzsäure 37% (HCl)	7647-01-0	VWR International GmbH, D-Darmstadt
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	1185-53-1	Promega GmbH, D-Mannheim
Trizma [®] Base	77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Tween [®] 20	9005-64-5	VWR International GmbH, D-Darmstadt

Enzyme	CAS-Nummer	Bezug/Hersteller
Collagenase Typ II (CLS-2, Worthington)	n.a.	Cellsystems GmbH, D-Troisdorf
cOmplete™ Proteaseinhibitorcocktail	n.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Desoxyribonuklease I, Typ 2 vom Rinderpankreas	9003-98-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Liberase™ TM Research Grade	n.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
Pankreatin vom Schweinepankreas	8049-47-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
apo-Transferrin human T2036	11096-37-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Zellmedien	Besondere Zusätze	Bezug/Hersteller
<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM)	L-Glutamin, HEPES, nicht essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Antikörper	Biologischer Ursprung	Klon	Verdünnung	Bezug/Hersteller
Anti-HA High Affinity	Ratte	3F10 monoklonal	1:1000	Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim
GAPDH Antikörper	Ziege	L-18 polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnologie, Inc., D-Heidelberg
Anti-Ratte IgG-HRP	Ziege	n.a.	1:5000	Santa Cruz Biotechnologie, Inc., D-Heidelberg
Anti-Ziege IgG HRP	Esel	n.a.	1:10000	abcam, UK-Cambridge

Arzneimittel und Medizinprodukte	Wirkstoff bzw. Hauptkomponente	Konzentration	Bezug/Hersteller
Baytril® Injektionslösung für Tiere	Enrofloxacin	2,5% (w/v)	Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen
Braunol 7,5% Povidon-Iod (w/w)	Povidon-Iod	7,5% (w/w)	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	5% (w/w)	Bayer AG, D-Leverkusen
Forene®	Isofluran	100% (v/v)	Abbvie Deutschland GmbH & Co KG, D-Wiesbaden
Heparin Natrium 25000 I.E./5ml	Heparin	5000 I.E./ml	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Isotonische Kochsalzlösung	NaCl	0,9% (w/v)	B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen
Rimadyl® Injektionslösung für Hunde und Katzen	Carprofen	5% (w/v)	Pfizer Deutschland GmbH, D-Berlin
Rompun® Injektionslösung für Tiere	Xylazin	2% (w/v)	Bayer AG, D-Leverkusen
Ursotamin® Injektionslösung vet.	Ketamin	10% (w/v)	Serumwerk Bernburg AG, D-Bernburg

Spannungssensitive Farbstoffe	CAS-Nummer	Bezug/Hersteller
Di-8-ANEPPS	157134-53-7	Thermo Fischer Scientific, US-Waltham

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Zellmedien, Antikörper, Arzneimittel/Medizinprodukte und Farbstoffe

4.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen sind, wenn nicht anders angegeben, in H₂O gelöst

Analgetische Injektionslösung

50 µl Rimadyl® Injektionslösung (50 mg/ml Carprofen)

ad 1000 µl Isotonische Kochsalzlösung

Antibiotisch wirksame Injektionslösung

75 µl Baytril® Injektionslösung (25 mg/ml Enrofloxacin)

ad 1000 µl Isotonische Kochsalzlösung

Blockierlösung

5% (w/v) Magermilchpulver

in PBS-T

DNase Lösung

15 mg Deoxyribonuklease I, Typ 2 vom Rinderpankreas

ad 5 ml 10 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7,35) +
5 ml Glycerin, aliquotiert bei -20 °C lagern

Extraktionspuffer für Membranaufreinigung

14,3% (v/v) 7x Complete Proteinase Inhibitor Cocktail (1 Tablette pro ml)

20% (v/v) 5x Reporter Lysis Buffer

Enzypuffer für die Isolierung neonataler Kardiomyozyten

0,6 mg Pankreatin

0,4 mg Collagenase Typ II

ad 1000 µl Isolationspuffer für die Isolierung neonataler Kardiomyozyten

Hanks Salzlösung (Hank´s Balanced Salt Solution, HBSS), modifiziert

120 mM NaCl

5 mM KCl

1,9 mM KH₂PO₄

1,1 mM Na₂HPO₄

4,2 mM NaHCO₃

20 mM HEPES

5,5 mM Glukose

1 mM MgCl₂

1,8 mM CaCl₂

0,25 mM Natriumpyruvat

pH 7,35

Injektionsnarkose

85 µl Ursotamin® (100 mg/ml Ketamin)

75 µl Rompun® (20 mg/ml Xylazin)

ad 1000 µl 0,9% (w/v) NaCl Lösung

Insulin-Transferrin-Selenit (ITS) Stammlösung

25 mg Insulin vom Rinderpankreas

25 mg apo-Transferrin human

50 µl

ad 5 ml H₂O, mit 1 M HCl tropfenweise bis zum Klären versetzen, aliquotiert bei -20 °C lagern

Isolationspuffer für die Isolierung neonataler Kardiomyozyten

116 mM NaCl

20 mM HEPES

0,8 mM Na₂HPO₃

5,6 mM Glukose

5,4 mM KCl

0,8 mM MgSO₄

pH 7,35

Kanamycin A gelöst

1 mg Kanamycin A

ad 20 ml H₂O, aliquotiert bei -20 °C lagern

Liberase Lösung

50 mg Liberase™ TM Research Grade

ad 25 ml H₂O, 750 µl Aliquots bei -20 °C lagern

Lösung A

134 mM NaCl

11 mM Glukose

4 mM KCl

1,2 mM MgCl₂

1,2 mM Na₂HPO₄

10 mM HEPES

pH 7,35

Lösung A+

0,2 mM EGTA

in Lösung A

Lösung A++

0,1% (v/v) DNase Lösung

in Lösung A

Lösung B

0,1% (v/v) DNase Lösung

0,2 mM CaCl₂

in Lösung A

Medium für adulte Kardiomyozyten

98,8% MEM

1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin 100X

0,1% Kanamycin A gelöst

0,1% ITS

Medium für neonatale Kardiomyozyten

89% DMEM

10% FBS

1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin 100X

Natriumzitratlösung

11,7 mg Natriumzitat

ad 1 ml 0,9% (w/v) NaCl Lösung

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

1 Tablette PBS in 100 ml H₂O entspricht: 137 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer,
2,7 mM KCl

SDS-Laufpuffer

40 ml NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer (20x)

ad 800 ml H₂O

Selenit-Stammlösung

6 mg Na₂SeO₃

ad 1 ml H₂O

Stripping Puffer

3,75 g Glyzin

0,25 g SDS

2,5 ml Tween[®]20

ad 250 ml H₂O

pH 2,2

Transferpuffer

25 mM Trizma[®]Base

192 mM Glyzin

10% (v/v) Methanol

Tyrode

135 mM NaCl

5,4 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

2 mM MgCl₂

10 mM Glukose

10 mM HEPES

pH 7,35

Waschpuffer (PBS-T)

0,1% Tween[®]20

in PBS

Verdünnlösung für Antikörper entspricht Blockierlösung

4.4 Verwendete Messsysteme, Software, Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.4.1 Spezielle Messsysteme inklusive Software

Optische Messung der ventrikulären Aktionspotentiale

- *Eclipse T2000-U* Inverses Mikroskop (Nikon Instruments Europe, NL-Amsterdam)
- *Polychrome V* Monochromator (TILL Photonics, D-Gräfeling)
- *Imaging control unit* (ICU) Typ 1103 (TILL Photonics, D-Gräfeling)
- *Orca-Flash 4.0 Digital sCMOS* (*scientific complementary metal-oxide-semiconductor*) Kamera (Hamamatsu Photonics Deutschland, D-Herrsching)
- 40x/1.30 Immersionsölobjektive Plan Fluor (Nikon Instruments Europe, NL-Amsterdam)
- *Optosplit II* Bildteiler (Cairn Research Ltd, UK-Kent)
- Dichroitischer Spiegel für Anregungswellenlänge, zentriert bei 480 nm (Chroma Technology, D-Olching)
- Dichroitischer Spiegel für Emissionswellenlänge, zentriert bei 535 nm (Chroma Technology, D-Olching)
- Filter für Emissionswellenlänge: HQ645/75 und HQ535/50 (Chroma Technology, D-Olching)
- *Myopacer Field Stimulator* Pulsgenerator (IonOptix Corp., US-Westwood)
- Messkammer für Deckgläser (laboreigene Spezialanfertigung)
- Perfusionssystem (laboreigene Spezialanfertigung)
- *Live Aquisition* Software (TILL Photonics, D-Gräfeling)
- *ImageJ* (quelloffen)
- *Matlab* (Mathworks, US-Natick)
- *Graphpad Prism* (Graphpad Prism, Inc., US-La Jolla)

Langendorff und *Working heart* Perfusionssystem

- *Working heart* Perfusionssystem für Mäuse (Radnoti Ltd., IRL-Dublin) inkl. peristaltische Pumpe *easyload Masterflex L/S* und Wasserthermozirkulator *Optima TC120*
- 18 G Kanüle, abgestumpft (laboreigene Spezialanfertigung)
- *Transonic TS410* Durchflussmesser (Transonic Europe B.V., NL-Elsloo)
- *ME1PXN* Flusssonde (Transonic Europe B.V., NL-Elsloo)
- Monophasische Elektrokardiogrammableitungselektroden (Radnoti Ltd., IRL-Dublin)

- *Animal Bio Amp* Differenzialverstärker (AD Instruments, UK-Oxford)
- *IT-18* Mikrothermoelement (AD Instruments, UK-Oxford)
- *T-Type Pod* Thermosignalverstärker (AD Instruments, UK-Oxford)
- Powerlab 8/35 Datenerfassungshardware (AD Instruments, UK-Oxford)
- *LabChart (Pro) 7* (AD Instruments, UK-Oxford)
- *Graphpad Prism* (Graphpad Prism, Inc., US-La Jolla)

DSI Physiotel[®] Implantierbares Maustelemetriensystem

- *HD-X11* Telemetrieimplantat für Blutdruck, Biopotential, Temperatur und Aktivität (Data Sciences International, US-New Brighton)
- *RPC-1* Receiverplatten (Data Sciences International, US-New Brighton)
- *APR-1* (Data Sciences International, US-New Brighton)
- *Data Exchange Matrix* (Data Sciences International, US-New Brighton)
- *Dataquest A.R.T. Silver* (Data Sciences International, US-New Brighton)
- *LabChart (Pro) 7* (AD Instruments, UK-Oxford)
- *Graphpad Prism 6-8* (Graphpad Prism, Inc., US-La Jolla)

4.4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Einfache Standardgerätschaften oder Standardverbrauchsmaterialien bleiben unerwähnt.

Gerät/Verbrauchsmaterial	Modell/Produktname(n)	Bezug/Hersteller
Bis-Tris Plus Gel 12%	Bolt™ 12% Bis-Tris Plus Gel, 10-well	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Chemiluminiszenz-Bildgebungssystem	Fusion-Fx7 advanced	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, D-Eberhardzell
Deckgläser	Menzel, rund für die Mikroskopie Ø 20 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, D-Braunschweig
Federschere	Cohann-Vannas Spring Scissors - 5 mm 15000-2	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Gefäßkanülierungspinzette	S&T TIF02 10	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Gelelektrophoresekammer/-system	XCell Surelock™ Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Homogenisator	Minilys® Arbeitsplatz-Homogenisator	VWR International GmbH, D-Darmstadt
Isofluranverdampfer	Dräger Vapor 19.3	Wilfried Müller GmbH, D-Prittriching
Knüpfpinzette	FD281R	Stoss-Medica Medizintechnik GmbH, D-Saarbrücken
Kühlzentrifuge	NAPCO 2019R	Biostad, CAN-Montreal
Mikroarterienklemme	Biemer Vessel Clip 5,0 mm - 9,0 mm	Bio Services BV, NL-Uden
Nadelhalter	Snowden-Pencer 32-0445-1 Microsurg. 5 1/2" Sm.	Becton Dickinson Rowacarefusionermany GmbH, D-Kelberg
Nahtmaterial Standard	Seide 6/0 100m unsteril	Suprama Feuerstein GmbH, D-Derlin
Nahtmaterial Wundverschluss	Serapren 5/0 DR 12	Seraq-Wiessner GmbH & Co. KG, D-Naila
Nitrozellulosemembran	Whatman® Protran® BA83	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München
pH-Gelelektrode	Sentix® 41	WTW GmbH & Co KG, D-Weilheim
pH-Messgerät	Inolab pH Level 2	WTW GmbH & Co KG, D-Weilheim
Precellys Lysing Kit	Precellys Lysing Kit	Bertin Technologies, F-Montigny-le-Bretonneux

Gerät/Verbrauchsmaterial	Modell/Produktname(n)	Bezug/Hersteller
Rotorblock für die Ultrazentrifuge	TLA 100.3	Beckman Coulter GmbH, D-Krefeld
Schere, fein	Extra Fine Bone Scissors - Straigt 8,5 cm 14084-08	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Spektrophotometer	Lambda Bio+	Perkin Elmer, US-Waltham
Stereomikroskop	OPMI 1	Carl Zeiss AG, D-Oberkochen
Transferkammer	Mini PROTEAN [®] Tetra System	Biorad Laboratories GmbH, D-München
Ultrazentrifuge	Optima [™] -MAX 130000 rpm	Beckman Coulter GmbH, D-Krefeld
Zellkulturinkubator	Heracell [®]	Thermo Fisher Scientific, US-Waltham
Zentrifuge	Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products GmbH, D-Osterode

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.5 Immunoblotanalyse (Western Blot)

4.5.1 Proteinaufschluss

Zehn bis zwölf Wochen alte Mäuse wurden mittels Injektionsnarkose (0,1 ml/10 g KGW i.p.) anästhesiert und nach Verlust des Zehenkneifreflexes dekapitiert. Nach sofortiger Eröffnung des Brustkorbes wurden das Herz mit eiskalter isotonischer Kochsalzlösung durch Injektion in beide Ventrikel gespült. Anschließend wurde das Herz entnommen, an der Aorta an eine stumpfe Kanüle gebunden und mit ca. 5 ml Kochsalzlösung retrograd gespült, um das Gefäßsystem des Herzens möglichst blutfrei zu bekommen. Die Vorhöfe wurden entfernt. Für den Nachweis in der Skelettmuskulatur wurde zusätzlich ein ca. linsengroßes Stück der Oberschenkelmuskulatur entnommen. Um die Expression in anderen Organen ausschließen zu können, wurden außerdem linsengroße Stücke von Gehirn, Lunge, Leber und Niere entnommen. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Alle folgenden Schritte erfolgten bei -4 °C oder auf Eis. Um die Gewebeproben aufzuschließen, wurde für jede Probe etwa 600 µl Extraktionspuffer für Membranaufreinigung in je ein *Precellys Lysing Kit* vorgelegt. Die eigentliche Homogenisierung erfolgte für 30 s auf Stufe 3 im Minilys[®] Homogenisator. Um den Zelldebris abzutrennen, wurden die Proben für 15 Minuten bei 3380 g zentrifugiert und der Überstand entnommen. Mit diesem Zellextrakt konnte entweder sofort mit der Proteinkonzentrationsbestimmung fortgefahren werden, oder es erfolgte je nach Fragestellung ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 60000 g für 75 min, um Membranproteine von löslichen Proteinen zu trennen. Dabei macht man sich den unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten von löslichen und Membranproteinen zu Eigen. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine (zytosolische Proteinfraktion), das Sediment wurde mit etwa 50 - 100 µl Extraktionspuffer für Membranreinigung wieder in Lösung gebracht und enthielt die Membranproteinfraktion. Folglich werden drei Arten von Proben unterschieden: Zellextrakte ohne weitere Aufreinigung (ze), Membranproteinfractionen (mf) und zytosolische Proteinfractionen (zf).

Als Positivkontrolle wurden von Frau Dr. Sandra Ruppenthal mit dem Dq Plasmid Konstrukt transfizierte und bereits lysierte 293A HEK-Zellen zur Verfügung gestellt. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog den Gewebeproben.

4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch nach der Methode von Bradford [19]. Für jede Probe wurde in drei bis vier Photometerküvetten je 1 ml *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent* vorgelegt. 1 µl Eluat wurde mit dem *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent* vermischt. Die optische Dichte wurde bei 595 nm gemessen und mit der Eichkurve verglichen. Der arithmetische Mittelwert wurde zur Feststellung der Proteinkonzentration im Eluat bestimmt. Wurden die Proben nicht sofort weiter verarbeitet, wurden sie mittels flüssigem Stickstoff in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gefroren und bei -80 °C gelagert.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Verwendung mit kommerziell vorgefertigten Bis-Tris Plus Gelen wurden die Proben mit 4x NuPAGE® LDS Sample Buffer und 10x NuPAGE® *Sample Reducing Agent* - zur Denaturierung der Proteine und Reduktion von Disulfidbrücken - mit Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf den gewünschten Proteingehalt bzw. auf die einfache Arbeitskonzentration von Puffer und reduzierendem Agens gebracht. Danach wurden die Proben für 10 min bei 70 °C erhitzt. Durch Erhitzung und das enthaltene Dithiothreitol (DTT) wurden die Proteine denaturiert, Disulfidbindungen aufgebrochen und durch die Wechselwirkung der Alkylketten der Proteine mit dem anionische Detergenz Lithiumdodecylsulfat (LDS) negativ geladen. LDS kann anstatt Natriumdodecylsulfat (SDS) für die SDS-Gelelektrophorese verwendet werden. Die Nomenklatur ändert sich dadurch nicht [136]. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, um Kondensate wieder zu sammeln. Die Bis-Tris Plus Gele 12% wurden in eine mit SDS Laufpuffer befüllte Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Geltaschen mit den Proben in gewünschter Menge - 8-30 µl mit 1-3 µg (für die Positivkontrollen) bzw 10-30 µg Gesamtproteingehalt (für die Gewebeproben) - sowie mit 3 µl PageRulerTM Plus als Marker für den Größenstandard beladen. Die genau verwendete Gesamtproteinmenge wird im Ergebnisteil separat erwähnt. Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte bei 200 V Gleichspannung für etwa 35 min.

4.5.4 Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei wird abermals die negative Ladung durch die Wechselwirkung des Detergenses an die Proteine ausgenutzt, um diese bei Anlegung von Gleichstrom Richtung Anode und damit auf die Nitrocellulosemembran wandern zu lassen. Für den Western Blot wurde, auf Kathodenseite der Blot-Kassette beginnend, ein Sandwich in der Reihenfolge Schwamm - Filterpapier - SDS-Gel - Nitrozellulose - Filterpapier - Schwamm angefertigt. Diese Materialien wurden dabei ständig mit Transferpuffer feucht gehalten. Gel und Nitrozellulosemembran kamen luftblasenfrei aufeinander zu liegen. Für den Transferpuffer wurde ein Methanolgehalt von 10% zur Optimierung der Adsorption der Proteine an die Membran gewählt. Die Kassette wurde in den mit Transferpuffer befüllten Transfertank eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 100 V konstanter Spannung für eine Stunde. Ein Kühlakku wurde in den Transfertank gepackt, um Überhitzung und Proteinschädigung zu vermeiden. Erfolg von Beladung, Auftrennung und Transfer wurden durch eine reversible Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S kontrolliert. Dafür wurden die Membranen aus dem Sandwich entnommen, etwa eine Minute in Ponceau S geschwenkt und anschließend mit Wasser gespült.

4.5.5 Immunologische Proteindetektion

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen mindestens 1,5 Stunden in Blockierlösung geschwenkt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dazu wurden die primären Antikörper 1:1000 in Verdünnlösung für Antikörper gelöst und die Membranen während der Inkubation bewegt. Um Dq zu detektieren, wurde der HA-*Tag* benutzt. Antikörper gegen HA sind kommerziell erhältlich. Der in der Arbeit verwendete Ratten Anti-HA *High Affinity* Antikörper zeigte in Vorversuchen bedingt durch seine hohe Spezifität die beste Eignung für die Anwendung im Western Blot.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen wiederholt mit PBS-T gewaschen und dann mit gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpern beschickt. Im Falle von Anti-HA *High Affinity* war dies ein Anti-Ratte IgG-HRP Antikörper 1:5000 und für den GAPDH Antikörper wurde Anti-Ziege IgG-HRP 1:10000 in Verdünnlösung angewendet. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde.

Die Membranen wurden danach erneut wiederholt mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden sie nach Herstellerangaben mit Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent benetzt. ECL steht für „*Enhanced Chemiluminescence*“ und enthält das Substrat für das an den Sekundärantikörper gekoppelte Reporterenzym. Das Luminiszenzsignal wurde im Bildgebungssystem *Fusion-Fx7 advanced* detektiert und mit *ImageJ* ausgewertet.

Für etwaige Ladekontrollen wurde Ziegen GAPDH Antikörper genommen. Für die Ladekontrolle sollten die zuvor verwendeten Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wurden die Membranen eine Stunde lang bei Raumtemperatur in *Stripping* Puffer inkubiert und vor dem erneuten Blockieren je zweimalig für je 10 Minuten mit frischer PBS und dann mit PBS-T gewaschen. Nach dem Blockierschritt (1,5 Stunden) wurde die Membran mit GAPDH Antikörper (biologischer Ursprung: Ziege) 1:1000 verdünnt inkubiert. Der Sekundärantikörper (Anti-Ziege IgG-HRP) wurde in 1:10000 Verdünnung angewandt. Die Inkubationszeiten, Wasch- und Entwicklungsschritte waren analog zur HA-*Tag* Detektion.

Diese Ladekontrolle wurde nur für Proben aus Zellextrakten ohne Membranaufreinigung genutzt. Da GAPDH als zytosolisches Protein ungeeignet als Ladekontrolle in Proben mit reinen Membranproteinfraktionen ist, wurde in solchen Fällen allein die Ponceau S Färbung herangezogen. Die entsprechende Analyse wurde in *ImageJ* durchgeführt. Dabei wurde zur Quantifizierung bzw. Normierung der Signalstärke der Proteinexpression die Signalintensität von Dq zu GAPDH (bzw. einem in der Ponceau S Färbung klar abgrenzbaren Bereich) in Relation gesetzt.

4.6 Untersuchung der Versuchstiere

Alle Tiere wurden täglich in Augenschein genommen. Vor der Verwendung in den diversen Experimenten wurden sie zudem veterinärmedizinisch auf Gesundheitsstatutus, Verhalten und

Tierwohl inspiziert. Auffällig abweichende Tiere sollten dadurch ausgeschlossen werden können. Von Tiere, die für die *in-vivo* EKG- und Blutdruckmessung verwendet wurden, wurden die Körpergewichte (KGW) vor der Implantation des Transmitters (siehe Abschnitt 4.7) festgehalten. Die Gewichte wurden mit Hilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus Test auf Normalverteilung und folglich mittels zweiseitigem Student-t-Test auf signifikante Unterschiede getestet (*Graphpad Prism*). Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$.

4.7 EKG- und Blutdruckmessung *in-vivo*

Um am Versuchstier und damit nahe am Patienten möglichst unbeeinflusst den kardialen Phänotyp zu bestimmen, stehen Radiotelemetrieimplantate, auch Transmitter genannt, zur Verfügung. Sind diese erst einmal implantiert, können vom Versuchstier ohne weitere Beeinflussung, Fixation oder Anästhesie biometrische Daten gewonnen und drahtlos übermittelt werden, so etwa EKG und Blutdruck.

4.7.1 Vor- und Aufbereitung des Radiotelemetrie-Implantates

Das *HD-X11* Telemetrieimplantat wurde von *Data Sciences (Datasci) International* (USA) für Mäuse entwickelt und eignet sich zur simultanen Aufzeichnung von systemischen Blutdruck, EKG, Aktivität und Körpertemperatur am lebenden, frei laufenden Tier. Der Transmitterkörper hat ein Volumen von etwa 1400 mm^3 , wiegt 2,2 g und kann für Mäuse $\geq 19 \text{ g}$ Körpergewicht (KGW) verwendet werden. Im Transmitterkörper befinden sich neben der Batterie und den elektrischen Modulen ein Temperatursensor. Für die Messung des Blutdruckes ist ein flüssigkeitgefüllter Katheter vorhanden, an dessen offener Spitze sich ein biokompatibles Gel befindet. Da dieses nicht komprimierbar ist, können Druckänderungen gemessen und an die elektrischen Module im Transmitterkörper weiter gegeben werden. Die Transmitter werden vom Hersteller mit überlangen EKG-Elektroden geliefert, damit diese vom Anwender passend zu Tiergröße und Implantationsroute gekürzt werden können. Vor Implantation wurden daher die Elektroden auf ca. 50 mm (Negativelektrode) und 70 mm (Positivelektrode) Länge abgeschnitten. 3-4 mm unterhalb der neuen Elektrodenenden wurde mit einem Skalpell die Kunststoffummantelung kreisförmig umschnitten und die nun lose am Elektrodendraht sitzenden Kunststoffenden 2 mm endwärts gezogen. So konnte eine Schutzkappe gebildet werden, die an dieser Position mit Seidenfaden am Elektrodendraht fixiert wurde und den Organismus vor Schäden durch das spitze Drahtende bewahren sollte. Die nun offen liegende, 2 mm lange Drahtstrecke bildete die Kontaktstelle für die Messung des Spannungsfeldes. Um ein Eindringen von Flüssigkeiten entlang des Elektrodendrahtes zu vermeiden, wurde auch die vor der Kontaktstelle liegende Kunststoff-Ummantelung fest ligiert. Die Telemetrie-Implantate sind mehrfach verwendbar und wurden vor erneuter Implantation durch Reinigung und Desinfektion nach Herstellerangaben aufbereitet. Gegebenenfalls musste auch das Kontaktgel des Blutdruckmesskatheters aufgefüllt und die Schutzkappen erneuert werden, da letztere bei der Explantation meist im Organismus zurück blieben.

4.7.2 Einsetzen des Radiotelemetrie-Implantates

Neun bis dreizehn Wochen alte männliche Mäuse wurden nach Wiegung zur Narkoseeinleitung in eine transparente Box gesetzt (3% Isofluran in Sauerstoff bei einem Gasgemischfluß von drei bis vier Liter pro Minute), bis die Haltungsreflexe erloschen sind. Für den weiteren Verlauf wurde die Isoflurankonzentration auf 1,5-2% (bei einem Gasgemischfluß von 1 Liter pro Minute) gedrosselt, als Beatmungstubus diente eine modifizierte 2 ml Spritze ohne Stempel. Um das Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden diese großzügig mit Bepanthen Augencreme bedeckt. Pro 25 g KGW wurden 0,12 ml antibiotisch wirksame (Enrofloxacin) und 0,1 ml analgetische Injektionslösung (Carprofen) i.p. appliziert. Das Tier wurde in Rückenlage an den Vorderpfoten auf einer Wärmeplatte fixiert. Der Bereich vom Kinnwinkel (*Regio mentalis*) bis zum cranialen Brustbeinbereich (*Regio sternalis*) sowie ein etwa münzgroßes Areal links des Schwertfortsatzes (*Regio costalis - Regio xiphoidea*) wurde enthaart oder geschoren und anschließend mit Polividon-Iod desinfiziert. Zusätzlich wurde der restliche Bereich mit einem OP-Tuch abgedeckt (Abbildung 11a). Mit einer feinen Schere wurde ein longitudinaler (in Längsachse), ca. 1-1,5 cm langer Hautschnitt vom Bereich zwischen den Unterkieferknochen (*Regio intermandibularis*) bis ans kraniale (kopfseitige) Ende des Brustbeines heran (*Regio presternalis*) durchgeführt. Die Submandibulardrüsen wurden vorsichtig mit Hilfe zweier Knüpfpinzetten getrennt und zur Seite geschoben. Mit einer Arterienklemme wurde durch stumpfes Präparieren vom kaudalen (schwanzseitigen) Wundrand aus bis hin zur rechten Flanke eine Unterhauttasche geformt, die groß genug sein musste, dass eine 2 ml Spritze darin Platz hatte. Die Tasche wurde mit ein paar Tropfen angewärmter, isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Die *Arteria carotis communis sinistra* wurde vorsichtig und unter Schonung des Vagusnerves isoliert, sodass ein etwa 5-8 mm langes Stück bis hin zur Aufzweigung in *Arteria carotis interna* und *Arteria carotis externa* (innere und äußere Halsschlagader) freigelegt wurde. An dieser Aufzweigung wurde die linke *Arteria carotis communis* ligiert und die Fadenenden am Beatmungstubus fest geklebt, sodass das Gefäß unter Spannung war. Eine Unterversorgung des Gehirns entsteht dadurch nicht, da die Blutzufuhr über kommunizierende Arterien im Arterienring des Hirnes (*Circulus arteriosus cerebri*) gewährleistet wird [71]. Proximal (zum Rumpf hin) davon wurden zwei weitere Ligaturfäden unter dem Gefäß positioniert und lose verknotet. Die Fadenenden der proximalen Ligatur wurden in eine Arterienklemme geklemmt und unter Zug gehalten. Damit wurde der Blutfluss temporär unterbunden. Ein Fadenende der mittleren Ligatur wurde seitlich auf dem OP-Tisch festgeklebt. Durch diese Hilfestellung kann man später ohne weiteres Hilfspersonal den Blutdruckkatheter in Position halten und die lose Ligatur zu ziehen, was ein Herausdrücken des Katheters aus der Arterie verhindert. Zur Absicherung wurde noch zusätzlich eine Mikroarterienklemme so nahe wie möglich an der proximalen Ligatur befestigt (Abbildung 11b). Mit einer Federschere wurde ein Loch quer zum Gefäßverlauf etwa dort geschnitten, wo die *Arteria carotis communis* proximal ihrer festen Ligatur wieder volle Breite hatte. Dabei sollte der Schnitt nicht mehr als ein Drittel, besser ein Viertel der Gefäßdicke umfassen. Diese Öffnung wurde mit einer spitzen Pinzette offen gehalten, während man mit Hilfe einer speziellen, Katheter schonenden Gefäßkanülierungspinzette

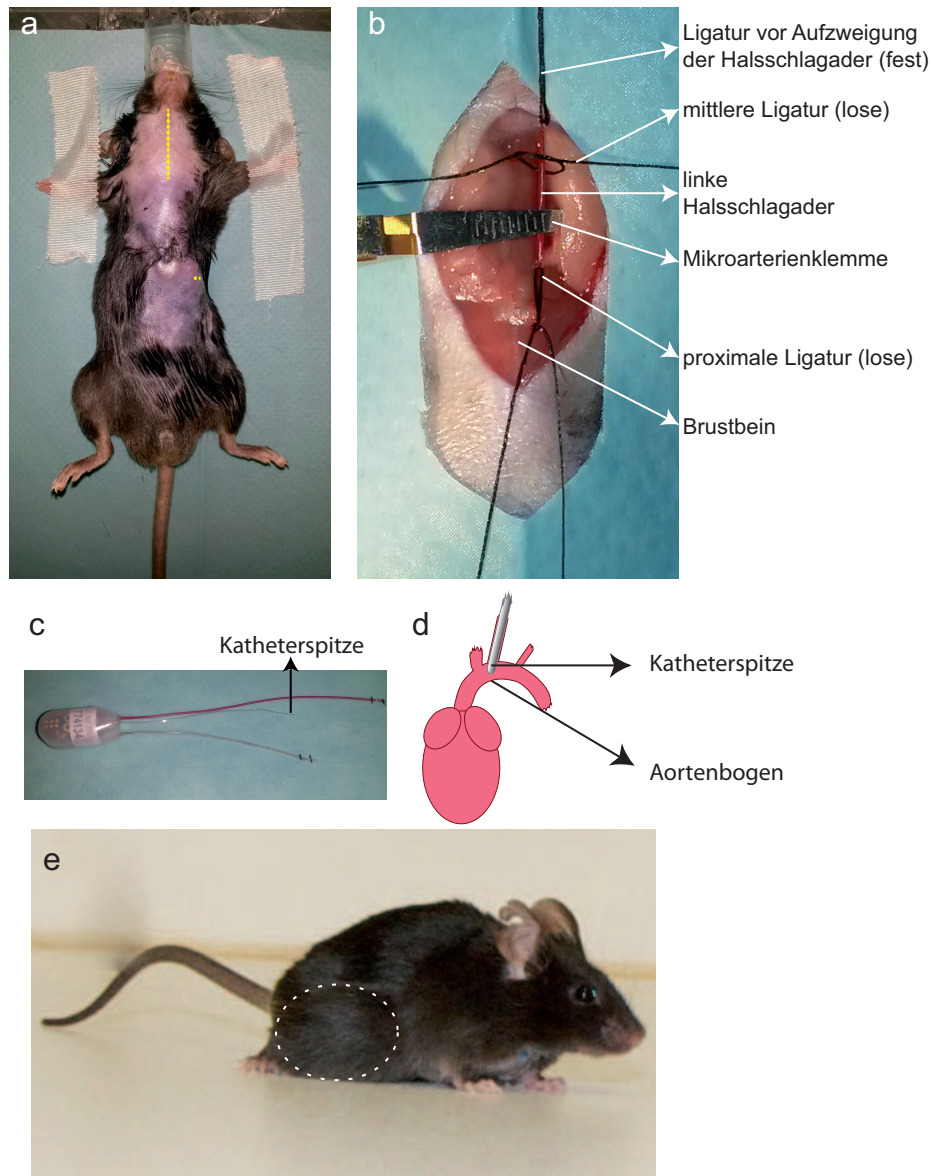


Abbildung 11: Implantation des Transmitters. (a) Vorbereitend wurde die narkotisierte Maus im Hals- und linken Bauchbereich enthaart und die Vorderpfoten fixiert. Die gelb gestrichelten Linien markieren die Hautschnitte für den chirurgischen Zugang: ein längerer vom Kinn bis zum Brustbein, und ein kleinerer Schnitt im linken oberen Quadranten des Bauches. (b) Die linke Halsschlagader (*Arteria carotis communis*) wurde isoliert und für den Vorschub des Blutdruckkatheters vorbereitet. Eine kopfseitige Ligatur vor der Aufzweigung der Halsschlagader wurde sofort fest gezogen und unterbindet den Blutfluss permanent. Am rumpfseitigen Ende des freigelegten Arterienstückes unterbindet eine auf Spannung gehaltene, lose Ligatur den Blutfluss vom Herzen zusätzlich temporär, eine Mikroarterienklemme unterstützt diese Funktion. Eine mittig gelegene dritte Ligatur soll später den Katheter beim Vorschieben davor schützen, durch den Blutdruck aus dem Gefäß zurück gedrückt zu werden. (c) HD-X11 Telemetrieimplantat im Detail: zwischen der positiven (rot) und negativen (farblos) Elektrode befindet sich der Blutdruckkatheter am Transmitterkörper. (d) Finale Lage der Blutdruckkatheterspitze im Aortenbogen (adaptiert nach Huettemann und Bogie; 2009 [61]). (e) Maus nach erfolgter Implantation. Der weiß gestrichelte Kreis markiert die Lage und ungefähre Größe des Transmitterkörpers.

(Abbildung 11c) den Blutdruckkatheter durch diese Öffnung in die Arterie vorschieben konnte. Sobald man auf Höhe der Mikroarterienklemme gelangt war, wurde der Katheter durch sanften Zug an der mittleren Ligatur gesichert und die Klemme entfernt. Dann konnte der Katheter bis zur proximalen Ligatur weiter geschoben werden. Der Zug auf die proximale Ligatur wurde dann gelockert, damit der Katheter die Engstelle passieren und weiter vor geschoben werden konnte, bis die Spitze des Blutdruckkatheters den Aortenbogen erreicht hat (Abbildung 11d). Dies war erfahrungsgemäß bei den verwendeten Mäusen der Fall, wenn die Markierungsnut des Katheters noch 1 mm aus der Öffnung herausragt hat. Alle drei Ligaturen wurden ein weiteres Mal mit Gefäß bzw. Katheter verknötet, um diesen sicher am Platz zu halten. Durch die Elastizität der Gefäße und die Dicke des Katheters konnte der Blutverlust dabei auf ein zu vernachlässigbares Ausmaß reduziert werden.

Die vorgeformte Subkutantase wurde zur Erleichterung des Vorschubes ein weiteres Mal mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet, danach wurde das Gehäuse des Transmitters in diese Tasche geschoben und sein guter Sitz kontrolliert. 10 mm links des Schwertfortsatzes (*Xiphoid*) wurde ein 2-3 mm langer Schnitt in die Bauchhaut gesetzt. Die positive, rote Elektrode wurde an ihrem Ende mit einer Gefäßklemme gefasst. Danach wurde die Klemme subkutan, vom Halshautschnitt kommend, in Richtung des Bauchhautschnittes geführt und die Elektrode beim Rückziehen der Klemme an dieser Stelle belassen. Mit einer Einzelligatur wurde die Positionierung der Elektrode - frei liegende Kontaktstelle 10 mm links des *Xiphoids* - gesichert und der Hautschnitt mit einer liegenden U-Naht verschlossen. Die negative, farblose Elektrode wurde mit ihrem Ende am rechten *Musculus pectoralis* fest genäht. Bei dieser Art der Elektrodenanordnung werden die gemessenen Elektrodenpotenziale gegeneinander verglichen und deren Differenz aufgezeichnet. Man erhält eine bipolare Ableitung, die der Ableitung II nach Einthoven entspricht. Der lose Kabelbereich (von festgenähtem Elektrodenende bis Transmittergehäuse) wurde in die Subkutantase verbracht. Die Halswunde wurde mit 3-5 liegenden U-Nähten verschlossen. Danach wurde jedes Tier unter Beobachtung und unter Bereitstellung einer Wärmequelle zum Aufwachen zurück in einen separaten Käfig gesetzt. Antibiose und Schmerztherapie wurden an den 2 darauf folgenden Tagen fortgeführt. Die Tiere wurden nach Implantation einzeln gehalten, die ersten Messungen fanden frühestens 8 und spätestens 10 Tage nach Implantation statt.

4.7.3 Ansetzen von CNO in isotonischer Kochsalzlösung

CNO wurde in einer Konzentration von 0,25 mg/ml (für die Dosis 1 mg CNO pro kg KGW) bzw. 2,5 mg/ml (für die Dosis 10 mg CNO pro kg KGW) in isotonischer Kochsalzlösung bei 75 °C in abgedunkelten Reaktionsgefäßen für 30 Minuten gelöst. Dadurch ergab sich ein Injektionsvolumen von 0,1 ml/25 g KGW. Sie wurden anschließend aliquotiert bei -20 °C gelagert und erst vor Anwendung wieder auf Raumtemperatur gebracht.

4.7.4 Messung

Alle Konfigurationen und die Steuerung der Messung geschah über die Software *Dataquest A.R.T. Silver*. Sobald über die Software eine Aufzeichnung gestartet wurde, wurden die von den Sensoren des Implantates detektierten Signale digitalisiert und mittels Radiofrequenzübertragung an die *RPC-1* Receiverplatten übermittelt, auf denen die Käfige und somit die Tiere platziert waren. Die Receiverplatten konvertierten die Daten in eine für die Software lesbare Form. Der Umgebungsdruck wird vom *APR-1 (ambient pressure reference monitor)* gemessen. Dadurch können mögliche Schwankungen im Umgebungsdruck gegen das Blutdrucksignal korrigiert werden. Die *Data Exchange Matrix* erkennt jede einzelne Receiverplatte als auch den *APR-1* und dient als Schnittstelle zwischen den Software- und Hardwarekomponenten. *Dataquest A.R.T. Silver* zeichnete die Rohdaten mit einer Frequenz von 500 Hz auf und ermittelte minütlich automatisch den mittleren gemessenen Blutdruck (in mmHg) als auch die Herzrate.

Die Herzrate wurde über die Spitzen der Pulswellen (Blutdruckmessung) ermittelt. War dies nicht möglich (etwa durch ein Blutgerinnsel am Katheter), wurden stattdessen die RR-Intervalle aus dem EKG (Abstand von R-Zacke zu R-Zacke) heran gezogen. Bei sehr kleinen R-Amplituden oder Rauschen im Signal war auch dies nicht möglich, in diesem Fall konnte zu diesem Zeitpunkt keine Herzraten zur statistische Auswertung des betreffenden Tieres stattfinden. Die Analyse der aufgezeichneten Herzströme erfolgte nach Export der Rohdaten mit *LabChart (Pro) 7*. Die Software erkennt jeden einzelnen Herzzyklus automatisch. Um PQ-Intervall, QRS-Komplex-Dauer und QTc-Intervall (*QT corrected*, $QTc = QT / \sqrt{RR/100}$) zu messen, wurden zuerst einminütige Zeitabschnitte von Interesse festgelegt: 10 und 5 Minuten vor Substanzapplikation, minütlich in den ersten 15 Minuten danach und von da an alle 5 Minuten innerhalb der ersten Stunde. Innerhalb dieser Minutensegmente wurden die einzelnen Herzzyklen übereinandergelegt und von Artefakten und Ausreißern bereinigt. Die bereinigten Herzzyklen wurden in 6 aufeinanderfolgende Untersegmente unterteilt und innerhalb dieser aufeinandergelegt, um den Verlauf eines durchschnittlichen Herzzyklus zeichnen zu können. Dort wurden die interessanten Parameter gemessen und festgehalten. Dabei galt:

- PQ-Intervall [s]: zeitliche Dauer vom Beginn der P-Welle (Verlassen der isoelektrischen Linie) bis zum Beginn des QRS-Komplexes (Verlassen der isoelektrischen Linie)
- QRS-Komplex Dauer [s]: Dauer vom Beginn der Q-Zacke, sofern sichtbar (ansonsten R-Zacke) bis zum Beginn des steilen Anstieges nach dem tiefsten Punkt der S-Zacke
- QT [s]: Dauer vom Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle (tangentialer Erreichen der isoelektrischen Linie)

Die Mittelwerte aus den 10-sekündigen Untersegmente ergaben jeweils die Messwerte für jedes Tier und jeden interessanten Zeitpunkt, um PQ-Strecke, QRS-Komplex-Dauer und QT-Strecke (bzw. Qtc-Strecke) über die Zeit und zwischen den Gruppen vergleichen zu können. Für die Kaplan-Meier-Kurve wurde der Todeszeitpunkt beim Auftreten der EKG-Nulllinie festgehalten.

Da erste Vorversuche gezeigt haben, dass bei Dq-positiven Tieren nach Applikation von 10 mg CNO pro kg KGW die gemessene Temperatur abgefallen ist (siehe Abschnitt 5.2), wurden die Messungen bei einer Umgebungstemperatur von 30 °C durchgeführt. Die Aussagekraft des Thermosensors über die Körperkerntemperatur ist, wie später in Abschnitt 6.4.3 erklärt, durch die Implantationsmethode nur bedingt aussagekräftig, dennoch sollten negative Folgen aufgrund möglicher Temperatureinbußen durch die Wärmequelle ausgeglichen werden. Die angebotenen 30 °C entsprechen der für Mäuse thermoneutralen Temperatur [93, 42]. Alle Mäuse wurden zweimalig untersucht: Eine Kontrollmessung mit isotonischer Kochsalzlösung (0,1 ml pro 25g Körpergewicht) ging der Provokationsmessung mit CNO (1 mg/kg KGW bzw. 10 mg/kg KGW gelöst in isotonischer Kochsalzlösung) 24 Stunden voraus. Dadurch ergaben sich 4 Gruppen:

- Wildtypmäuse vor und nach Kontrollinjektion mit isotonischer Kochsalzlösung (WT + NaCl)
- Wildtypmäuse vor und nach Provokationsinjektion mit CNO in isotonischer Kochsalzlösung (WT + CNO)
- Dq-positive, transgene Mäuse vor und nach Kontrollinjektion mit isotonischer Kochsalzlösung (Dq⁺ + NaCl)
- Dq-positive, transgene Mäuse vor und nach Provokationsinjektion mit CNO in isotonischer Kochsalzlösung (Dq⁺ + CNO)

Jede Maus wurde somit einmal in die NaCl und einmal in die CNO Gruppe ihres Genotyps eingeteilt.

Die Messungen fanden jeweils ab der achten Stunde nach Anbruch des Tagzyklus der Mäuse statt. 30 Minuten vor Messbeginn wurde der Magnetschalter im Telemetrieimplantat kontaktlos durch Annäherung eines starken Magneten angeschaltet. Der Software-gesteuerte Start der Messung selbst beeinflusst die Tiere nicht und wurde 15 Minuten vor intraperitonealer Applikation von isotonischer Kochsalzlösung bzw. CNO angesetzt. Zur Applikation wurden die Mäuse kurz in ihren Käfigen fixiert und sofort wieder zurück gesetzt. Die Messung endete nach dem Tod der Tiere bzw. spätestens nach 16 Stunden.

Für die statistische Auswertung von MAP und EKG-Daten wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism 7* und *8* ein multipler t-Test mit Holm-Šidák Korrektur zur Vermeidung einer alpha-Fehler-Kumulation durchgeführt, für die Darstellung der Mortalität (Sterberate) eine Kaplan-Meier-Kurve. Die Fehlerbalken in den Abbildungen entsprechen dem Standardfehler. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$.

4.8 CNO-Plasmabestimmung

Insgesamt fünf 13 Wochen alten, männlichen, Dq-negativen Mäusen wurde intraperitoneal 10 mg CNO pro kg Körpergewicht, gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, appliziert. Zur Feststellung des CNO-Plasmaspiegels wurde 15 Minuten nach Injektion ein finaler Blutentzug

vorgenommen. Dazu wurden am anästhesierten Tier ca. 600-800 µl Blut mittels Herzpunktion mit einer 21 G Kanüle und einer heparinisierten Spritze (50 I.E. Heparin) gewonnen. Die Proben wurden unmittelbar nach Gewinnung bei 1350 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und das Plasma vorsichtig abpipettiert. Um weiteren zeitlichen Verzug und damit eine Metabolisierung zu vermeiden, geschah das Prozedere von CNO-Injektion bis ordnungsgemäßer Lagerung bei -20 °C für jedes Tier einzeln. Die Bestimmung der CNO Konzentration mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wurde von der Pharmacelus GmbH, Saarbrücken, vorgenommen.

4.9 Isoliertes Herz nach Langendorff

4.9.1 Herzentnahme

Ähnlich dem Narkose- und Organentnahmeprotokoll für Herzzellisolierung wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 0,1 ml Narkoselösung plus einem Antikoagulans (Xylazin/Ketamin + 500 I.E. Heparin-Natrium/Maus) anästhesiert. Die Tiere wurden nach Erlöschen des Zehenkneifreflexes durch Dekapitation getötet, die Haut im ventralen Rumpfbereich entfernt und der Brustkorb durch einen Schnitt von der Schaufelknorpelregion (*Regio xiphoidae*) durch das Zwerchfell und den Rippenbogen hin zur Rippenregion (*Regio costalis*) beiderseits eröffnet. Das Einströmen von Luft in den Brustkorb durch das angeschnittene Zwerchfell und Schnittführung verringern das Risiko, ungewollt das Herz zu beschädigen. Anschließend wurden die Rippen parallel zur Wirbelsäule durchtrennt und mit dem Brustbein entfernt. Das so exponierte Herz wurde sanft mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger ein wenig angehoben. Mit einer feinen Schere wurde durch Schnittführung streng entlang der Wirbelsäule, durch Lunge und Mediastinum, das Herz aus dem Brustkorb isoliert und sofort in eiskalte, kalziumfreie Tyrode (135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES; pH 7,35) gelegt. Von Dekapitation bis zu diesem Schritt sollten dabei nicht mehr als 60 Sekunden vergehen. Die dem Herz anhaftenden Organ- und Gewebereste wurden größtmöglich entfernt, der Aortenstumpf wurde vor dem Abgang der großen Arterien eingekürzt. Die Ränder der Aorta wurden mit zwei Knüpfpinzetten gefasst und auf eine modifizierte, stumpfe, mit Querrillen versehene und mit Tyrode gespülte 18 G Kanüle gezogen und dort mittels Seidenfaden ligiert, ohne die Herzkranzgefäßabgänge zu blockieren.

4.9.2 Perfusion am Langendorff/*Working Heart* Apparat

Die Kanüle mitsamt dem Herzen wurde an einen kombinierten Langendorff/*Working Heart* Apparat angeschlossen und das Herz mit oxygenierter, 37 °C warmer Tyrode *retrograd*, also rückläufig, über die Aorta durchströmt (perfundiert). Dadurch schließt sich durch den Perfusionsdruck die Aortenklappe und die nährstoff- und sauerstoffreiche Flüssigkeit kann in die Herzkranzgefäße strömen und die Versorgung des Herzens ermöglichen. Der Druck sollte sich

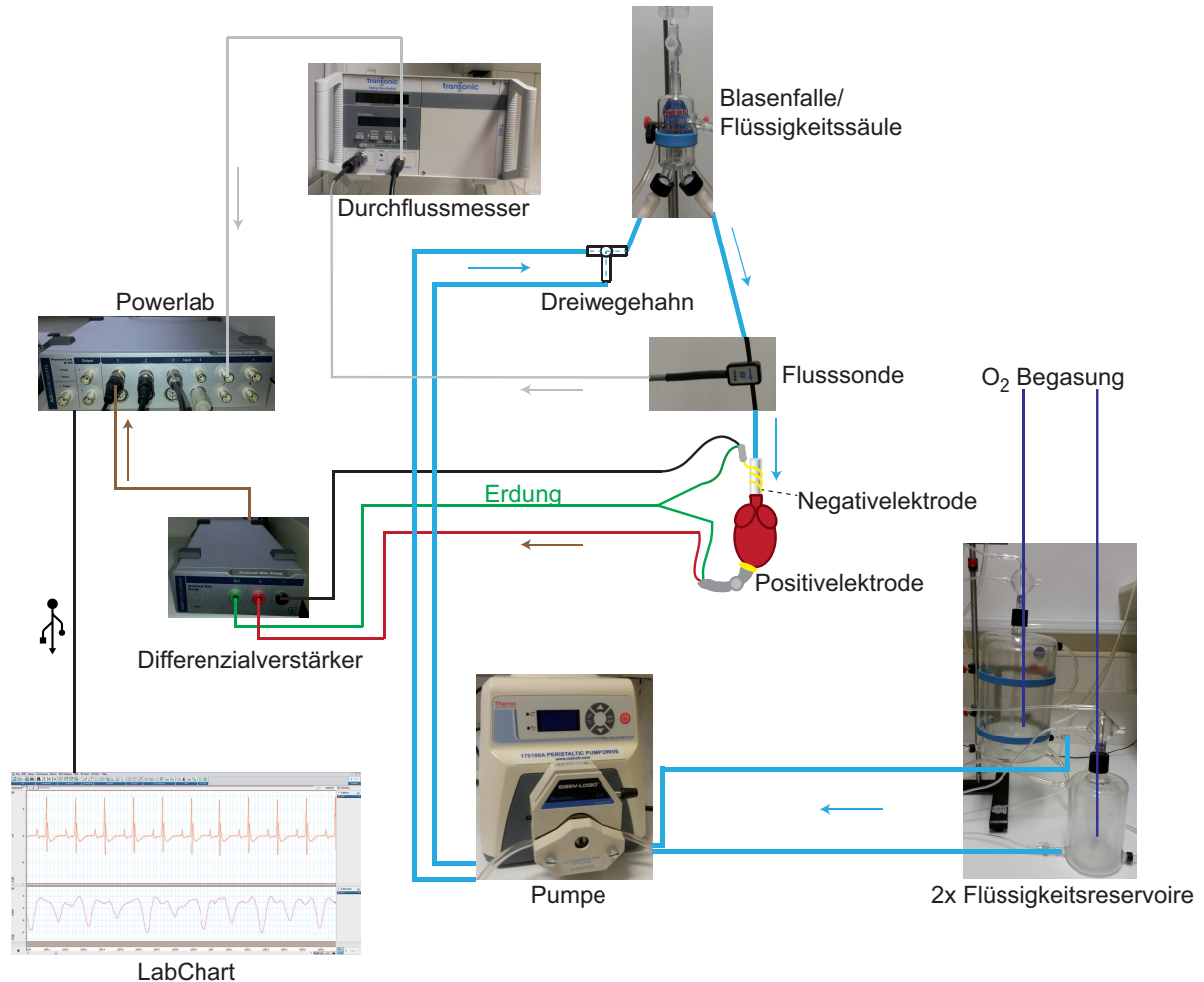


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Langendorff Messplatzes. Zwei Flüssigkeitsreservoir wurden benötigt um entweder mit CNO-freier oder CNO-haltiger Tyrode perfundieren zu können. Via peristaltischer Pumpe wurde die jeweils gewünschte Tyrode in die Blasenfalle befördert. Dieser war ein Dreiwegehahn vorgeschaltet. Die Blasenfalle definierte die Flüssigkeitssäule und damit den Perfusionsdruck, der auf das Herz wirkte. Zwischen Blasenfalle und Herzkannüle befand sich eine Flusssonde. Zur Messung der bipolaren EKG-Ableitung wurde die Spannung zwischen einer aufliegenden Elektrode an der Herzspitze und einer um die Aortenkanüle gewickelten Drahtelektrode gemessen. Powerlab empfing das Durchflusssignal via Durchflussmesser und das EKG Signal nach vorheriger Signalverstärkung mittels Differenzialverstärker. Zur Aufzeichnung und Verarbeitung der Daten wurde *Labchart (Pro) 7* verwendet.

dabei in physiologischen Werten bewegen [84]. Dafür wurde die Tyrode zuerst mit einer peristaltischen Pumpe in eine Blasenfalle gefördert. Der Name erklärt den Sinn: etwaige Luftblasen konnten in dieser wärmeummantelten Kammer an die Oberfläche abperlen und drohten daher nicht weiter bis in die Herzkranzgefäße transportiert zu werden. Gleichzeitig bestimmte die Höhendifferenz dieser Blasenfalle zum Herzen (genauer: zur Verbundstelle Kanüle-Aorta) auch die Höhe der Flüssigkeitssäule, die auf dem Herzen lastet. Der Perfusionsdruck lag dabei bei konstant bei 75 mm Hg. Gegenüber Systemen, in denen nicht der Druck, sondern der Fluss konstant gehalten wird, erlaubt der konstante Perfusionsdruck dem Herzen, über autoregulatorische Mechanismen den Tonus der Koronararterien selbst zu steuern. Damit kann es sich physiologisch an die aktuellen Bedürfnisse anpassen [11].

Die retrograde Perfusionsflussgeschwindigkeit wurde mit einer Flusssonde, die in der Laufstrecke zwischen Blasenfalle und Kanüle angebracht war, ermittelt. Die EKG-Elektroden zur Messung des monophasischen Aktionspotential am isolierten Herzen wurden so angebracht, dass die negative, indifferente Elektrode als Platindraht um die Perfusionskanüle gewickelt wurde und die positive Elektrode als federnde und damit der Kontraktion folgende Platinspitze (Durchmesser 2,5 mm) an der Herzspitze angelegt wurde. Die EKG-Signale wurden mittels eines Differenzialverstärker amplifiziert.

Das isolierte Herz selbst war von einer Glaskammer umschlossen, die ihrerseits mit 37 °C warmen Wasser in einer Doppelwand ummantelt war. Dadurch konnte zusätzlich zur angewärmten Perfusion gewährleistet werden, dass im Herz 37 °C Gewebetemperatur gehalten werden konnte. Alle Signale wurden mit Powerlab als zentrale Datenerfassungshardware eingespielt und mittels *Labchart (Pro) 7* aufgezeichnet. Ein schematischer Aufbau der zentralen Elemente des Versuchsaufbaues findet sich in Abbildung 12.

Es wurden drei verschiedene Wege der CNO Perfusion versucht:

1. 10-15 Minuten Kontrollperfusion mit reiner Tyrode, dann Wechsel zu 7,5 μM CNO in Tyrode.
2. Die unmittelbare Perfusion mit 7,5 μM CNO in Tyrode.
3. 2-5 Minuten lang reine Tyrode, bis alle Messelemente in Position sind und die spontane rhythmische Exzitation des Herzens festgestellt werden konnte, danach Wechsel zu 7,5 μM CNO in Tyrode.

Ausschlusskriterien waren unzureichender Perfusionsfluss, makroskopische Veränderung am Herz und Abweichung vom Sinusrhythmus bei Perfusion mit CNO-freier Tyrode, sofern nicht ausschließlich mit CNO-haltiger Tyrode perfundiert wurde. Das EKG am spontan depolarisierenden, isolierten Herzen wurde maximal 30 Minuten gemessen. Für die Bestimmung der EKG Parameter wurden mit Hilfe von *Labchart (Pro) 7* je vier aufeinanderfolgende Herzstromzyklen gemittelt und für einen Zeitraum von fünf Sekunden gesammelt. Aus den Mittelwerten konnte für einen definierten Zeitpunkt dann die Länge des PQ-Intervalls, der QRS-Komplexdauer und der R-Amplitude gemessen werden. Um den Verlauf der einzelnen Herzstromzyklen über die Zeit

zu veranschaulichen, wurde mittels eines von Dr. Qinghai Tian geschriebenen Algorithmus in *Matlab* gearbeitet.

Die statistische Auswertung wurde dann mittels *Graphpad Prism* unter Anwendung eines multiplen t Testes durchgeführt. Die Fehlerbalken der statistischen Abbildungen entsprechen dem Standardfehler. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$.

4.10 Isolierung neonataler, ventrikulärer Kardiomyozyten

Für die Isolierung von Ventrikelzellen neugeborener Mäuse wurde ein Protokoll für neonatale Rattenventrikelzellen [149] in abgewandelter Form verwendet:

Von neugeborenen Mauswelpen wurde zur Genotypisierung eine Gewebeprobe vom Schwanz gewonnen. Zur späteren Unterscheidung wurden sie an den Pfoten tätowiert. Die Welpen wurden dann binnen 36 Stunden nach Geburt dekapitiert und der Brustkorb vorsichtig geöffnet. Das Herz wurde mit einer Knüpfpinzette gefasst und angehoben und mit einer feinen Schere zwischen Ventrikel und Atrien abgetrennt. Pro Genotyp wurden die Herzen in je einer Petrischale mit eiskalten Isolationspuffer gesammelt. Reste der Atrien, der großen Blutgefäße und anderes, nichtventrikuläres Gewebe wurde unter einem Stereomikroskop entfernt. Danach wurden die Herzen mit einer Federschere in kleine Stücke (ca. 1x1 mm) geschnitten, wobei der Gewebezusammenhang größtenteils erhalten blieb. Dadurch kann später eine gute Spülung mit Enzympuffer und zeitgleich bleibt eine einfache Handhabung gewährleistet. Die Gewebestückchen wurden anschließend, abermals nach Genotyp getrennt, in je ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Enzympuffer transferiert. Die Proben wurde bei 37 °C für 20 Minuten unter sanftem Rütteln inkubiert und der erste Überstand abpipettiert und verworfen. Danach wurde erneut 1 ml frischer Enzympuffer dazu gegeben und für 50 min unter sanften Rütteln inkubiert. Das Gewebe wurde unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 ml Transferpipette dissoziiert und die ausreichende Vereinzelnung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Gegebenenfalls wurde für weitere 10 Minuten inkubiert und dissoziiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 400 g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in fertig angesetztem Medium resuspendiert und in 25 cm² Zellkulturflaschen, getrennt nach Genotyp, gesammelt. Die Zellen wurden im Zellkulturschrank für 2 Stunden (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Durch diesen Schritt kann man Bindegewebszellen (Fibroblasten), die später die primären Herzzellen überwuchern würden, von den „interessanten“ Zellen entfernen, da Bindegewebszellen schneller am Boden der Zellkulturflasche adhären, während die Herzzellen noch frei in der Suspension sind. Diese Zelllösung wurde anschließend abpipettiert, bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium (2-3 ml pro Herz) resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml Zellsuspension auf mit Extrazellulärem Matrix Gel (EZM, 1:20 verdünnt in MEM) beschichteten Deckgläschen verteilt. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 1 und von da an alle zwei Tage. Die Zellen wurden täglich auf Vitalität, Kontraktilität, Bildung von synchronisierenden Herzzellansammlungen sowie unerwünschtem Überwuchern mit Bindegewebszellen kontrolliert.

4.11 Isolierung adulter, ventrikulärer Kardiomyozyten

Die Isolation adulter Kardiomyozyten von Mäusen erfolgte analog früherer Publikationen [123, 120]. Zehn bis zwölf Wochen alte Mäuse wurden mittels Injektionsnarkose (0,1 ml/10 g KGW i.p.) bis zum Verlust des Zehenkneifreflexes anästhesiert und zudem ein Koagulans (0,25 ml Natriumzitratlösung) appliziert. Danach wurden die Tiere dekapitiert und der Brustkorb eröffnet, in die nun frei liegenden Ventrikel wurde jeweils 1 ml eiskalte Lösung A injiziert. So werden nicht nur die Ventrikel vom Blut befreit, sondern auch eine frühzeitige Kühlung und damit Schutz des Organes bei sauerstoffarmen Bedingungen gewährleistet. Danach wurde das Herz zügig, aber vorsichtig durch Durchtrennen des Mediastinums und des Aortenstumpfes auf Höhe des Aortenbogens isoliert und in eine Petrischale mit eiskalter Lösung A überführt. Das Herz wurde von noch anhaftenden Lungenresten, Thymus, Mediastinum und Perikard grob befreit und an ihrem Aortenstumpf an eine stumpfe Perfusionskanüle befestigt. Danach folgte bei Raumtemperatur für einige Minuten eine retrograde Perfusion in einem vereinfachten Langendorff-Apparat mittels Sauerstoff angereicherter Lösung A+. Dieser Schritt dient zum einem zum Freispülen von Blut, zum anderen der „Erholung“ des Herzens. 750 µl Liberase-Lösung wurde mit Lösung A+ auf 12 ml aufgefüllt und auf 37 °C erwärmt sowie mit Sauerstoff begast. Das Herz wurde damit solange perfundiert, bis die extrazelluläre Matrix soweit degradiert wurde, dass später ein Vereinzeln der Zellen möglich war (etwa 8-14 Minuten). Erkennbar war dieser Zeitpunkt an der brüchig werdenden Konsistenz des Gewebes. Danach wurden die Ventrikel abgenommen, gewaschen, in 5-6 noch zusammen hängende Teile geschnitten und in einen Erlenmeyerkolben mit oxygenierter Lösung A++ unter Schütteln bei 37 °C für 5 Minuten belassen. Die Lösung wurde darauf durch 5 ml frische Lösung A++ ersetzt und erneut für 5 Minuten inkubiert. Die Herzzellen wurden mit Hilfe einer gekürzten und abgeflamten Einwegpipette vorsichtig vereinzelt. Nach einer Ruhephase von etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur (bis die Zellen nicht mehr spontan kontrahieren), wurde schrittweise der Kalziumgehalt erhöht. Dafür wurde der Zellsuspension 10x im Abstand von etwa 5 Minuten jeweils 150 µl Lösung B zugesetzt und geschwenkt. Anschließend wird die Lösung mit 12 ml vorgewärmtem Medium für adulte Kardiomyozyten vorsichtig gemischt und auf mit EZM (1:20 verdünnt in MEM) beschichtete Deckgläschen verteilt. Die Zellen konnten bei 37 °C, 5% CO₂ im Zellkulturinkubator für maximal eine Stunde adhären, danach erfolgte ein Mediumwechsel. Von diesem Schritt an konnten die adulten Ventrikelzellen für Experimente (und maximal 5-6 Stunden danach) verwendet werden. Die routinemäßige Isolation adulter, ventrikulärer Kardiomyozyten wurde durchgeführt von Frau Sabrina Hennig.

4.12 Optische Messung der Aktionspotentiale

Um die Aktionspotentiale (AP) von neonatalen und adulten Kardiomyozyten zu messen, wurde ein kontaktfreier Ansatz der optischen Messung mittels eines spannungssensitiven, ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffes gewählt. Di-8-ANEPPS ist so ein niedermolekularer Farbstoff, der zudem spezifisch an die Membranaußenseite einer Zelle bindet und schnell auf eine

Spannungsänderung mit Verschiebung seiner Emissionswellenlänge in niedrigere Wellenlängenbereiche reagiert. Der Versuchsaufbau wurde an frühere Arbeiten an Rattenkardiomyozyten angelegt [149].

4.12.1 Farbstoffbeladung und Fluoreszenzmessung

Es werden nur die finalen Einstellungen beschrieben, die letztendlich auch in den Versuchen angewandt wurden, und die in die Statistiken eingeflossen sind: Di-8-ANEPPS wurde mit Pluronic®F-127 auf eine 2,5 mM Stammlösung verdünnt und bis zum Einsatz in Aliquots bei -20 °C gelagert. CNO wurde in DMSO als 50 mM Stammlösung ebenfalls bei -20 °C vorrätig gehalten. Die HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution) zum Perfundieren enthielt entweder 10 µM CNO in DMSO oder 200 µl DMSO *ad* 1 ml HBSS. Da DMSO als Transport- und Lösungsvehikel für CNO genutzt wurde, stellte die letztgenannte Bedingung die Kontrollbedingung ohne CNO da, die verwendete DMSO-Menge pro Volumseinheit entsprach der eingesetzten Stammlösungsmenge.

Deckgläser mit neonatalen Herzzellen wurden für 15 Minuten mit 5 µM di-8-ANEPPS in HBSS in flüssigkeitsdichten Messkammern bei Raumtemperatur inkubiert, für die fragileren adulten Herzzellen wurden sowohl Inkubationszeit als auch di-8-ANEPPS-Konzentration reduziert (10 Minuten, 1 µM di-8-ANEPPS). Danach wurden die Zellen mit frischer HBSS (+ DMSO bzw. CNO in DMSO) gewaschen. Die Messkammern wurden auf den Tisch des inversen Mikroskopes eingespannt und laufend perfundiert (0,4 ml/min). Die Messtemperatur lag für neonatale Zellen bei 37 °C, während für adulten Zellen Raumtemperatur benutzt wurde, um diese stabil und reproduzierbar messen zu können (siehe Erläuterungen in Abschnitt 5.5). Die Zellen wurden elektrisch stimuliert (1-2 Hz, 5 ms). Jedes Deckgläschen wurde dabei längstens 20 Minuten nach dem Waschschrift verwendet, um mögliche zeitlich abhängige CNO-Effekte zu limitieren. Ein vom Monochromator erzeugter Lichtstrahl (465 +/- 5 nm) wurde von einem auf 480 nm zentrierten dichroitischen Spiegel auf ein 40x Immersionsölobjektiv umgelenkt und von diesem auf die farbstoffbeladenen Zellen fokussiert. Dabei war die Beleuchtungszeit auf ein erforderliches Minimum reduziert. Die Emission wurde durch einen weiteren, auf 565 nm zentrierten dichroitischen Spiegel aufgespalten: das kurzwelligere Licht des „grünen“ Kanals getrennt vom langwelligeren Licht des „roten“ Kanals. Das kurzwelligere Licht wurde mittels 535 +/- 25 nm, das langwelligere Licht mit einem 645 +/- 35,5 nm Filter gefiltert, ehe die Signale von einer *Orca Flash 4.0 sCMOS* Kamera detektiert wurden. Eine ICU (*Imaging control unit*) sorgte für synchronisierte Abläufe, und über *Live Aquisition* kontrollierte man als Software-steuerndes Element die Hardwarekomponenten als auch die Aufzeichnung. Nachdem kontrahierende Einzelzellen bzw. Zellcluster (bei neonatalen Ventrikelzellen) im Zufallsprinzip ausgewählt wurden, erfolgte die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale für 5 Sekunden bei einer Aufzeichnungsrate von 500 Bildern pro Sekunde.

Folgende Gruppen ergaben sich daher:

- Zellen aus Wildtyp-Mäusen, CNO frei perfundiert (WT Ktr.)

- Zellen aus Wildtyp-Mäusen, mit 10 μ M CNO perfundiert (WT CNO)
- Zellen aus Dq-positiven Mäusen, CNO frei perfundiert (Dq⁺ Ktr.)
- Zellen aus Dq-positiven Mäusen, mit 10 μ M CNO perfundiert (Dq⁺ CNO)

4.12.2 Analyse und Auswertung

Zuerst wurden in *ImageJ* für jede Zelle/Zellcluster im „grünen“ wie im „roten“ Kanal deckungsgleiche Bildbereiche ausgewählt und nach Abzug des Hintergrundes aus einem „zellfreien“ Bild separat die Rohdaten gewonnen. In *Matlab* wurden dann die einzelnen AP für beide Kanäle ermittelt, der Quotient berechnet (AP „grün“ / AP „rot“) und die Dauer bis zu 30% (APD30) und 70% Repolarisation (APD70) festgestellt. Die Algorithmen dafür hat Dr. Qinghai Tian geschrieben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von *Graphpad Prism* durchgeführt. Abhängig von der Gauß'schen Normalverteilung (D'Agostino-Pearson Test) wurde entweder eine einfaktorielle Varianzanalyse oder ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die statistische Darstellungen zeigen Kastengrafiken (Box-Whiskers-Plot) mit 5-95% Perzentile. Das Signifikanzniveau liegt bei 5%.

5 Ergebnisse

5.1 Western Blot Analyse

5.1.1 Besonderheit des Proteinnachweises von Dq: Der Zeitfaktor

In unserer Arbeitsgruppe konnten sowohl die Rezeptor-Lokalisation auf Zellebene als auch die Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Prof. Peter Lipp detektierte mittels Immunfluoreszenzexperimenten an isolierten und fixierten Kardiomyozyten, dass der Rezeptor sowohl in Vorhof- als auch in Ventrikelzellen korrekt an der Zellmembran lokalisiert war und in Herzzellen von Wildtypmäusen fehlte (siehe 13a-e). Frau Dr. Monika Barth-Schäuble konnte nach RNA Isolierung aus Ventrikeln, cDNA Generierung und anschließender real-time PCR zeigen, dass Dq nur in transgenen Mäusen exprimiert wird (Abbildung 13f).

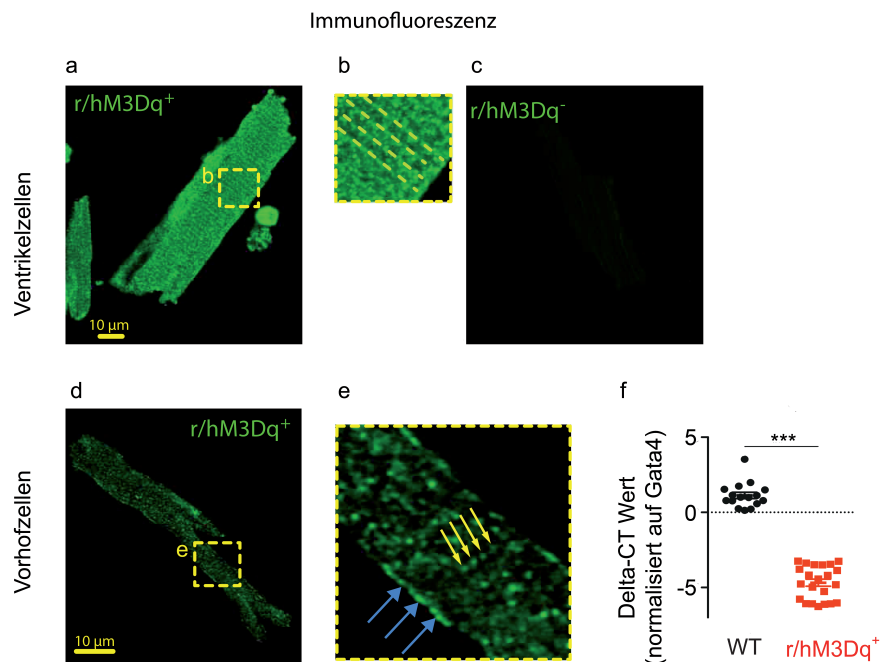


Abbildung 13: Proteinlokalisierung und mRNA Expression. Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation des Designerrezeptors Dq analysiert (a-e). In (a) sowie in dem vergrößerten Ausschnitt in (b) lässt sich nach Markierung mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern gut die Querstreifung (verdeutlicht durch gelbe, unterbrochene Linien) in isolierten Ventrikelzellen erkennen. (c) Ventrikelzelle einer Wildtypmaus nach gleichem Protokoll. (d) und in Vergrößerung (e) zeigen Vorhofzellen. Besonders starke Immunfluoreszenzsignale zeigen sich am Rand (blaue Pfeile) und an Einstülpungen der Membran (gelbe Pfeile). Weitere Untersuchungen in unserem Labor ergaben, dass Dq mit weiteren plasmamembranständigen Proteinen colokalisiert ist [72]. (f) Nachweis der Dq (= r/hM3Dq) mRNA mittels qPCR nach Normalisierung auf den herzspezifischen Marker Gata4. Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde durchgeführt von Prof. Peter Lipp, die qPCR Ergebnisse stammen von Frau Dr. Monika Barth-Schäuble, die mir die Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben, und die in modifizierter Form in Kaiser *et al.* publiziert wurden [72].

Der Proteinnachweis von Dq war hingegen an einige Besonderheiten geknüpft, die nachfolgend gezeigt werden sollen. In ersten Versuchen konnte ich Dq lediglich aus Skelettmuskelproben im Immunoblot detektieren (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Organproben wurden vor der Probenaufarbeitung nativ bei -80 °C gelagert.

Um Dq auch aus Ventrikelextrakten semiquantitativ bestimmen zu können, sollte zum einen die Sensitivität des Nachweises als auch die Reinheit der Proteinfraktion verbessert werden. Ersteres versuchte ich durch alternative primäre Antikörper zu bewerkstelligen, zweiteres durch eine Membranaufreinigung. Auch dieser Ansatz führte nicht zu einer erfolgreichen Detektion, sondern lediglich zu vermehrt unspezifischen Protein-Antikörperbindungen (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der Dq-Expression unter dem MCK-Promotor im Herzen mittels Western Blot gelang nach Rückkehr zum ursprünglich verwendeten Primär-Antikörper *Anti-HA High Affinity* in Verbindung mit einer unmittelbaren Probenaufarbeitung (Lyse, Extraktion, Membranaufreinigung, Denaturierung, Reduktion), wie in Abbildung 14 links zu sehen ist. Die Positivkontrolle (dargestellt als „9“) zeigte Banden im Bereich von 100-110 kDa, die auch in den Zellmembranfraktionen von Herz- („6“) und Skelettmuskelproben („8“) detektierbar waren.

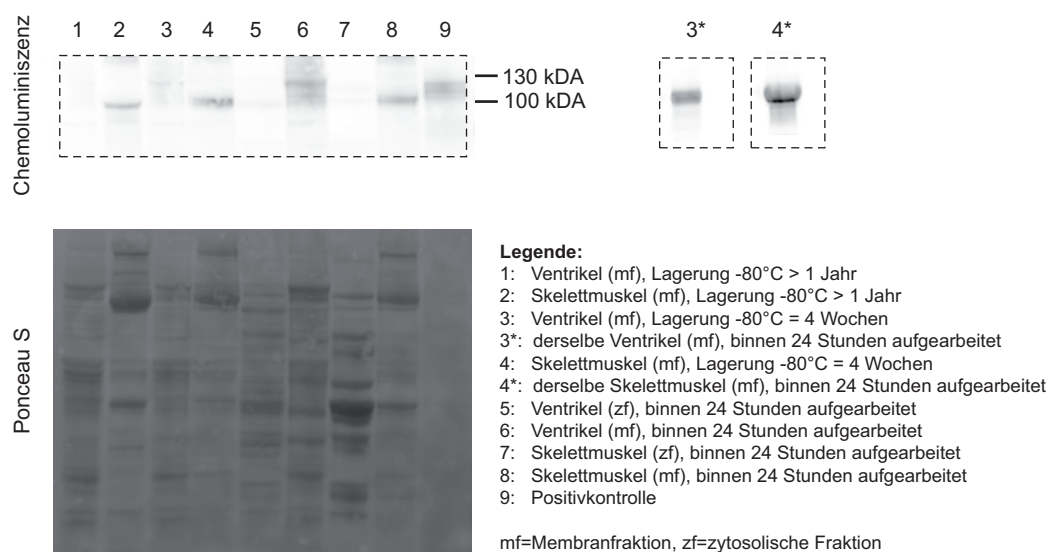


Abbildung 14: Es zeigte sich ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Proteinbandenmuster in Abhängigkeit von der Art und Dauer der Probenlagerung und Aufbereitung. Links oben wird die Proteindetektion mittels Chemiluminiszenz dargestellt (Belichtungszeit: 60 s), unten links die zugehörige Ponceau S Färbung. Es wurden je 20 µg Gesamtprotein von Ventrikelmembranfraktionen (1, 3, 6) bzw. der zytosolischen Fraktion (5) sowie 10 µg von Skelettmuskelmembranfraktionen (2, 4, 8) bzw. der zytosolischen Skelettmuskelfraktion (7) aufgetragen. Die Gesamtproteinmenge im Skelettmuskel wurde wegen der zu erwartenden stärkeren Expression reduziert. Von der Positivkontrolle (9) wurden 2,5 µg Gesamtprotein verwendet. Desweiteren unterschieden sich die aufgetragenen Proben in ihrem Alter seit Probengewinnung und Lagerungszeitpunkt: 1 und 2 wurden mehr als ein Jahr vor der Immunodetektion bis zur Membranaufreinigung aufbereitet und gelagert, bei 3 und 4 betrug die Lagerungszeit 4 Wochen, 6-8 waren frische Proben unter 24 Stunden Lagerungszeit nach Probengewinnung. Im Vergleich dazu sind die beiden Proben „3“ und „4“ rechts in einem früher angefertigtem Western Blot zu sehen (<24 Stunden nach Probengewinnung, je 20 µg Gesamtprotein, Belichtungszeit: 4 s). Verwendeter primärer Antikörper in allen Chemoluminiszenzaufnahmen: Ratten *Anti-HA High Affinity*.

5.1.2 Gewebespezifität des Dq-Expression

Abbildung 15 verifiziert die Gewebespezifität des MCK Promotors, der eine Expression von Dq ausschließlich in quergestreifter Muskulatur ermöglichen soll. Unter Einhaltung der zuvor

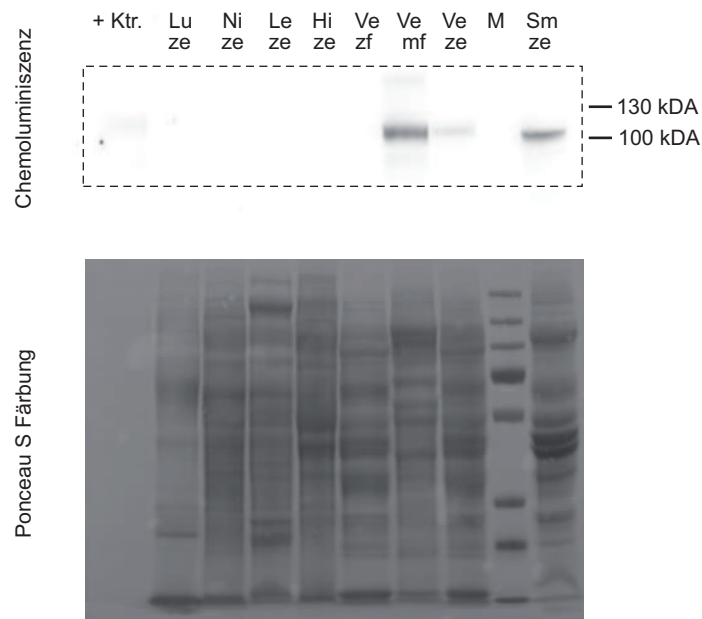


Abbildung 15: Western Blot Analyse: Dq in verschiedenen Organen. Mit Ausnahme der Positivkontrolle (2 µg Gesamtprotein) wurden je 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. Oben: Chemolumineszenzaufnahme (Belichtungszeit: 5 s), unten: Kontrolle des erfolgreichen Membrantransfers die Ponceau S Färbung. + Ktr.: Positivkontrolle; Lu: Lunge; Ni: Niere; Le: Leber; Hi: Großhirn; Ve: Herzventrikel; M: Marker, Proteingrößenstandard; Sm: Skelettmuskel; ze: Zellextrakt; zf: zytosolische Proteinfraktion; mf: Membranproteinfraktion. Verwendeter primärer Antikörper: Ratten *Anti-HA High Affinity*. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

genannten Besonderheiten konnte der Dq-Rezeptor nicht in Zellextrakten von Lunge, Niere, Leber und Großhirn und in der zytosolischen Fraktion der Ventrikel eines transgenen Tieres nachgewiesen werden. Hingegen war sowohl in der Positivkontrolle, im Zellextrakt von Skelettmuskulatur und Ventrikel als auch angereichert in der Membranfraktion des Ventrikels eine spezifische Bande zu erkennen. Abgesehen von der Positivkontrolle wurde jeweils eine Gesamtproteinmenge von 30 µg gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Zu beachten ist neben der Gewebespezifität auch der Vergleich der drei Proben aus dem Herzen (Zellextrakt und die sie zusammensetzende Membran- und zytosolische Proteinfraktion) zum Nachweis der korrekten Lokalisation in der Zellmembran. Bei 100-110 kDa ist das Signal in der Membranfraktion deutlich stärker ausgeprägt als im Zellextrakt und fehlt gänzlich im Zytosol. Der Ventrikel eines Dq-positiven Tieres wurde hälftig aufgeteilt. Eine Hälfte wurde, wie zuvor beschrieben, sofort aufgearbeitet, die andere Hälfte wurde hingegen zuerst vier Wochen bei -80 °C gelagert. Die vierwöchige, native Lagerung führte dazu, dass die die gesuchte Proteinbande kaum nachweisbar war (in Abbildung 14 links dargestellt als „3“). Die sofortige Aufarbeitung zeigte hingegen ein klares Signal im vier Wochen zuvor durchgeführten Western Blot (in Abbildung 14 rechts dargestellt als „3*“). Auch in der Probenspur eines bereits über ein Jahr gelagerten Herzens eines Dq-positiven Tieres war keine Bande sichtbar („1“). Aus gekühlt (+4 °C) gelagerten, bereits denaturierten und reduzierten Proben war ein Nachweis auch nach vier Wochen ohne Einbußen möglich (Daten nicht gezeigt).

Membranaufgereinigte Skelettmuskelproben Dq-positiver Tiere zeigten auch nach längerer Lagerung ein positives Signal („2“ und „4“). Des Weiteren war in zytosolischen Proteinfractionen

nie, auch nicht in sofort denaturierten und reduzierten Ventrikel- („5“) oder Skelettmuskelproben („7“), eine Bande zu detektieren.

Die Färbung mit Ponceau S bestätigte die erfolgreiche Auftragung der Probe vor der Gelelektrophorese. Da wegen der starken Expression von Dq in der Positivkontrolle nur ein Bruchteil der Proteinmenge verwendet wurde, ist folglich nur eine sehr schwache Färbung zu sehen.

5.1.3 Vergleich Wildtyp zu Dq-positiven Tieren sowie interindividuelle Schwankungen

Die Ventrikelzellextrakte von sechs Dq-positiven und einer Wildtypmaus wurden gemeinsam mit der Positivkontrolle unter den in Unterkapitel 5.1.1 genannten Optimalbedingungen untersucht. Die Tiere waren alle zwölf Wochen alt und stammten aus zwei Würfen, waren also zum Teil Wurfgeschwister. Es wurde jeweils eine Gesamtproteinmenge von 30 µg gelelektrophoretisch aufgetragen. Da einheitlich Zellextrakte aufgetrennt wurden, konnte als Ladekontrolle und zur Quantifizierung bzw. Normierung das zytosolische Protein GAPDH verwendet werden.

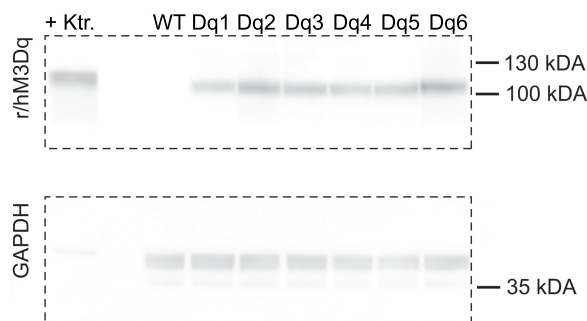


Abbildung 16: Western Blot Analyse: Dq in den Zellextrakten verschiedener Tiere. 30 µg Gesamtprotein wurden jeweils aufgetragen (Positivkontrolle: 2 µg). Oben: Auf Höhe der Bande der Positivkontrolle (+ Ktr.) waren Signale in den Ventrikeln aller untersuchten Dq positiven Tieren detektierbar (Dq1-6), jedoch nicht im Wildtyp-Ventrikel (WT). Verwendeter primärer Antikörper: Ratten *Anti-HA High Affinity*. Belichtungszeit: 2 s. Unten: dieselbe Membran nach Detektion der Ladekontrolle (GAPDH). Man beachte, dass auch der Wildtyp eine Bande aufweist. Verwendeter primärer Antikörper: Ziege GAPDH Antikörper. Belichtungszeit: 2s

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, ist nur in Proben transgener Tieren ein Signal bei 100-110 kDa detektierbar gewesen. Die Normierung auf die Ladekontrolle GAPDH (Signalstärke Dq Bande / Signalstärke GAPDH Bande) ergab Werte von 0,27 (Dq1) bis 0,73 (Dq6).

Ein weiterer Blot wurde aus den Membranfraktionen derselben Tiere angefertigt (Abbildung 17) Die aufgetragene Proteinmenge wurde auf 10 µg reduziert (Positivkontrolle: 2 µg). Die Ladekontrolle mittels Ponceau S Färbung war positiv.

In allen Proben Dq-positiver Tiere war eine deutliche, Dq entsprechende Bande zu detektieren. Auch hier konnte im Wildtyp keine Bande nachgewiesen werden.

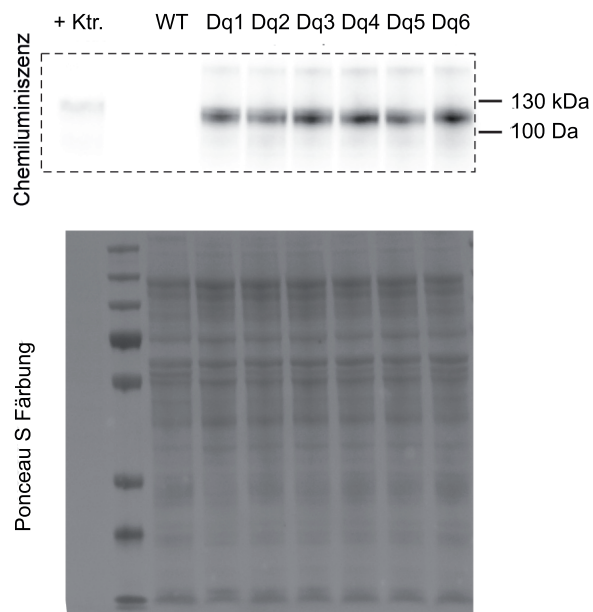


Abbildung 17: Western Blot Analyse: Dq in ventrikulären Membranfraktionen verschiedener Tiere. Oben: Banden auf Höhe des Dq Konstruktes fehlten ausschließlich im Wildtyp. Positivkontrolle: +Ktr.; transgene Tiere: Dq1-6; Wildtypier WT. Es handelt sich um Proben derselben Individuen wie in Abbildung 16. 10 µg Gesamtprotein (Positivkontrolle: 2 µg). Verwendeter primärer Antikörper: Ratten *Anti-HA High Affinity*. Belichtungszeit: 7s. Unten: Ponceau S Färbung als Ladekontrolle.

5.2 Untersuchungen am lebenden Tier

Alle in die Studie einbezogenen Tiere hatten einen unauffälligem Gesundheitsstatus. Für die *in-vivo* Untersuchungen wurden 26 männliche Tiere aus 15 Würfen verwendet, diese teilten sich auf 12 Dq-positive (Dq) und 14 Wildtypiere (WT) auf. Die Gewichte der beiden Gruppen vor Implantation des Transmitters und jeglicher Gabe von CNO oder isotonischer Kochsalzlösung verteilten sich bei gleicher Altersstruktur (Dq⁺: 12,3 +/- 1 Woche, WT: 12,5 +/- 1 Woche) wie in Abbildung 18 gezeigt. Dabei hatten transgene Tiere (23,33 +/- 0,54 g) ein geringgradig, aber signifikant niedrigeres Körpergewicht als Wildtypiere (25,32 +/- 0,55 g).

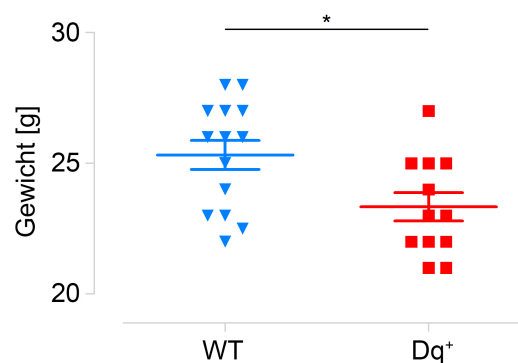


Abbildung 18: Körpergewicht vor Implantation des Telemetrie-Transmitters. Wildtypmäuse hatten ein signifikant (*) höheres Gewicht als gleichaltrige, gleichgeschlechtliche Dq-positive Mäuse.

In Pilotstudien stellte ich fest, dass bei Dq-positiven Tieren die subkutan vom Transmitterkörper gemessene Temperatur nach CNO-Injektion akut um bis zu 10 °C abfiel (Daten nicht gezeigt). Die Tiere vermieden jegliche Bewegung, ohne dass eine Paralyse vorlag und waren apathisch. Zum Tierwohl, um die systemischen Effekte abzumildern und um die weitere Erforschung der G_q-Protein vermittelten Signalwege im Herzen weiterhin zu ermöglichen, wurde eine Wärmequelle installiert, vergleichbar dem Vorgehen nach Allgemeinanästhesie von dadurch in der Thermoregulation eingeschränkten Säugern. Eine Stunde vor Messbeginn wurde die Umgebungstemperatur auf 30 °C erhöht. Der zuvor gemessene Temperaturabfall konnte sowohl bei Dq-positiven Mäusen und vergleichbar zu Wildtypieren nicht weiter beobachtet werden. Alle folgenden Ergebnisse aus den *in-vivo* Messungen wurden unter diesen Bedingungen ermittelt.

5.2.1 Sterberate

Fünf transgenen Tiere wurden 1 mg/kg KGW CNO injiziert. Die zuvor klinisch unauffälligen Mäuse waren wenige Minuten nach intraperitonealer Injektion unwillig, sich zu bewegen. Die EKG-Aufzeichnung aller Tiere zeigte multiple AV-Blöcke ersten und zweiten Grades. Drei Tiere starben nach 30 Minuten, 90 Minuten bzw. 14 Stunden (siehe Abbildung 19 links). In den letzten Minuten vor Eintritt des Todes verzeichnete das EKG ventrikuläre Tachykardien. Die beiden verbleibenden Tiere wurden nach 16 Stunden euthanasiert.

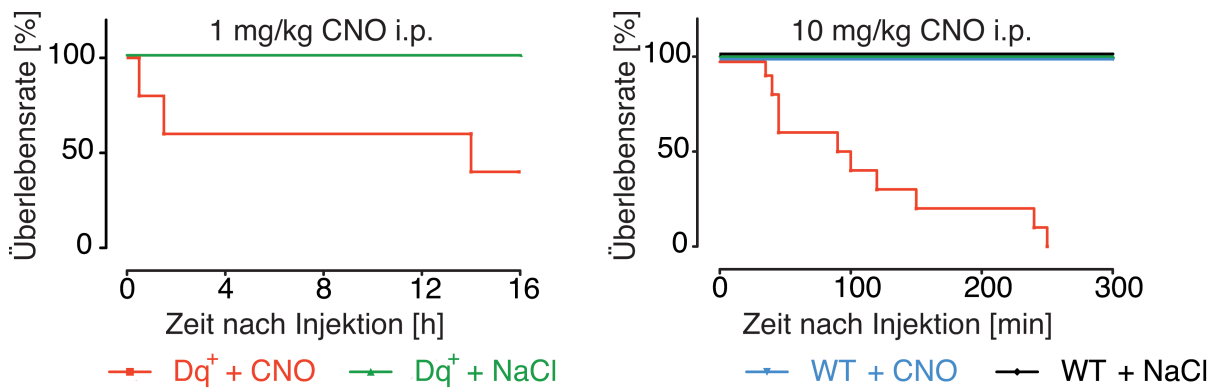


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für Wildtyp- und Dq-positive Tiere in Abhängigkeit von der erhaltenen Injektionslösung (0,9% NaCl oder gelöstes CNO). Dabei erhielten alle Tiere erst 0,9% NaCl und tags darauf CNO. Daher haben alle Tiere eine doppelte Gruppenzugehörigkeit. Links: Transgene Tiere nach Injektion von 0,9% NaCl i.p. bzw. 1 mg/kg KGW CNO in 0,9% NaCl i.p. (n=5). Ein Wildtypier überlebte sowohl Kontroll- als auch CNO-Injektion (nicht in der Abbildung enthalten). Rechts: die CNO-Dosis wurde auf 10 mg/kg KGW erhöht und weitere Wildtypmäuse eingeschlossen (n=10-11 pro Genotyp). Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Die 24 Stunden vorher durchgeführte Injektion des alleinigen Transportvehikels für CNO (0,9% NaCl) verlief hingegen ohne Auffälligkeiten. Eine Injektion von 1 mg/kg CNO in ein Wildtypier führte weder zu feststellbaren Einschränkungen des Allgemeinzustandes, noch zu Auffälligkeiten im EKG.

Diese Daten legten die Vermutung nahe, dass die verwendete Dosis für Dq-positive Tiere nahe der LD₅₀ (letale Dosis für 50% der Population) war. Um die letalen Umstände weitergehend und in reproduzierbarer Form untersuchen zu können, wurde die CNO-Dosis für die Folgeuntersuchungen um Faktor 10 erhöht (10 mg/kg). Elf Wildtyp- und zwölf transgene Mäuse wurden zuerst mit isotonischer Kochsalzlösung als Kontrollinjektion und 24 Stunden später mit 10 mg/kg CNO behandelt.

Wie Abbildung 19 (rechts) zeigt, überlebte keines der Dq-positiven Tiere die ersten 5 Stunden nach Injektion von 10 mg/kg CNO (längste Überlebensdauer: 250 Minuten), davon starben vier von zehn Tieren in den ersten 45 Minuten. Auch diese Tiere waren bei der vorangegangenen Kontrollinjektion ohne klinisch-äußerliche Auffälligkeiten. Es waren ausschließlich Dq-positive Tiere, bei denen die Injektion des Designerliganden zu einer 100 % Sterberate führte, obwohl sie vorher klinisch gesund waren. Bei Wildtypmäuse führte weder 0,9% NaCl, noch darin gelöstes CNO (10 mg/kg) zu Tierverlusten (siehe Abbildung 19 rechts).

5.2.2 Auswertung der Telemetriedaten

Vor und nach Injektion von Kochsalzlösung bzw. CNO wurde die Herzrate anhand der Blutdruck- bzw. EKG-Daten gemessen. Die mittlere Herzrate ist in Abbildung 20 gezeigt. Vor Manipulation zur Injektion lag sie gleichmäßig in allen Gruppen bei etwa 340-370 Schlägen pro Minute und wurde in der Tagphase der nachtaktiven Tiere jeweils zur selben Zeit gemessen. Für die Applikation mussten die Tiere in ihrem ruhenden Zustand gestört und fixiert werden, zudem

mussten die Substanzen injiziert werden. Nach Manipulation kam es unmittelbar zu einem Anstieg der Herzrate in allen Gruppen in Form einer Sinustachykardie. In der Gruppe Dq^+ + CNO minimierte sich Zahl der Individuen, deren Herzrate ermittelt werden konnte, durch fehlende Detektierbarkeit der R-Zacke im EKG bzw. des Blutdruckes oder Tod mit fortlaufender Messdauer von zehn auf sechs Tiere. Die Herzrate war dabei ab Minute 30 tendentiell höher im Vergleich zu allen anderen Gruppen, jedoch nur zu einem Zeitpunkt (55 Minuten nach Injektion von NaCl bzw. CNO) signifikant höher (437 ± 22 bzw. 342 ± 6 Schläge pro Minute) als in der Gruppe Dq^+ + NaCl. Zu anderen Zeitpunkten und im Vergleich zu anderen Gruppen wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

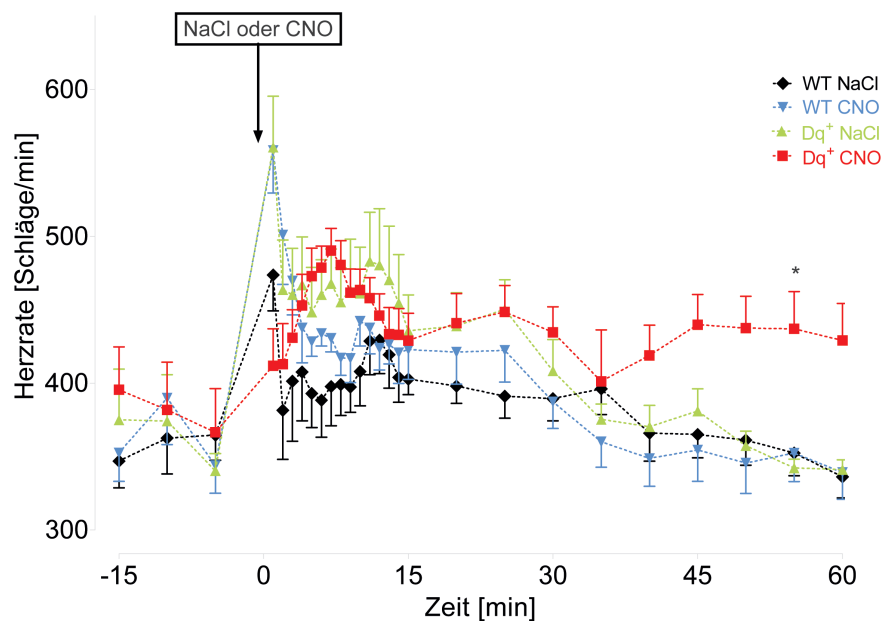


Abbildung 20: Herzrate *in-vivo* vor und nach Injektion von entweder 0,9% NaCl (Kontrollinjektion) oder 1 mg/kg KGW CNO in 0,9% NaCl i.p.. Der Zeitpunkt der Applikation NaCl oder CNO wird mittels Pfeil und der Beschriftung „NaCl oder CNO“ dargestellt. Der Asterisk (*) indiziert eine signifikant höhere Herzrate ($p < 0,05$) von Dq^+ + CNO im Vergleich zu Dq^+ + NaCl zum Zeitpunkt + 55 min *post injectionem*. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Wie Abbildung 21 anhand repräsentativer EKG-Spuren vergleichend zeigt, waren deutliche Unterschiede in Form pathologischer Abweichungen in den Ableitung der elektrischen Herzaktivität zu sehen. Abbildung 22 verdeutlicht die Charakteristika der ausschließlich bei Dq^+ -positiven Tieren nach CNO-Injektion auftretenden Arrhythmien.

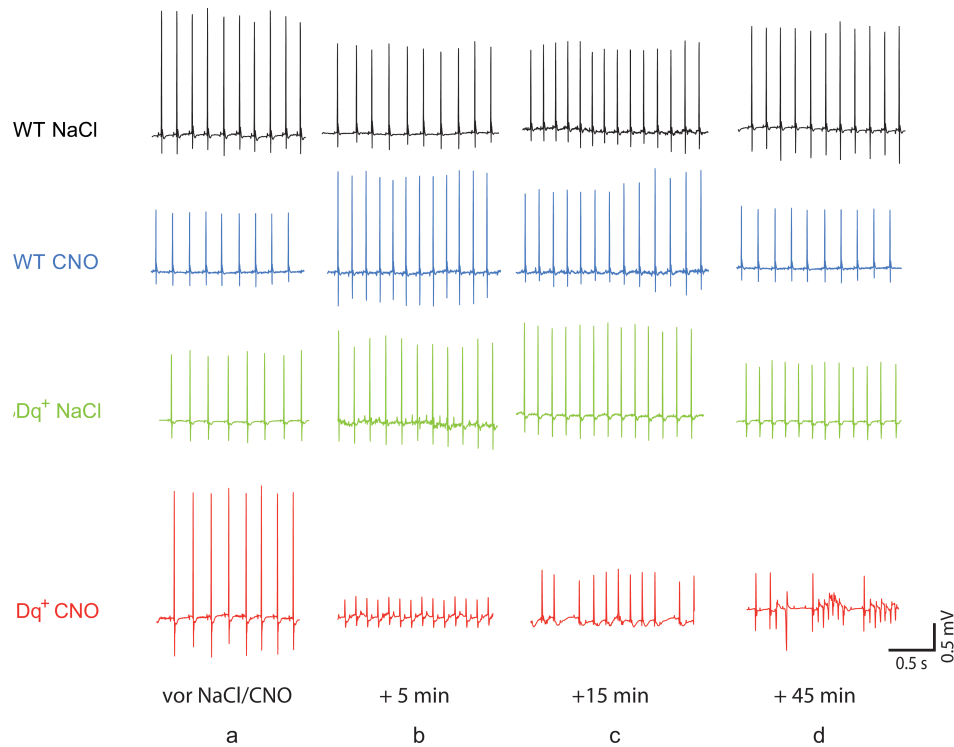


Abbildung 21: Repräsentative EKG-Spuren je eines Tieres aus allen Gruppen. Die linken Spuren (a) zeigen den Status vor Injektion von 0,9% NaCl oder 10 mg/kg KGW CNO. Repräsentative Spuren 5 Minuten nach Injektion von ausschließlich 0,9% NaCl bzw. darin gelöstem (10 mg/kg KGW) CNO sind an zweiter Stelle von links (b), 15 Minuten danach an dritter Stelle (c) und 45 Minuten danach ganz rechts (d) abgebildet.

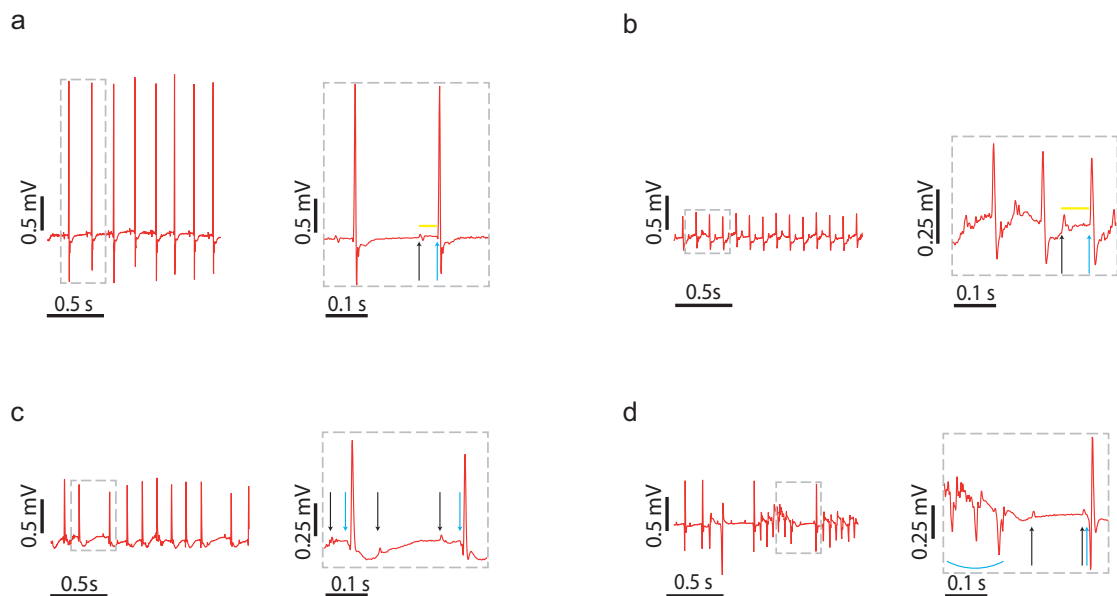


Abbildung 22: Die in Abbildung 21 gezeigten arrhythmischen Veränderungen bei Dq-positiven Tieren nach CNO-Gabe im Detail. Die Kleinbuchstaben a-d entsprechen denselben zeitlichen Verhältnissen zur CNO-Applikation wie in Abbildung 23. Schwarze Pfeile weisen auf den Beginn einer P-Welle hin (in (a) und (b) exemplarisch einmal), blaue Pfeile auf den Beginn eines QRS-Komplexes (a und b: exemplarisch einmal). Gelbe horizontale Linien zeigen deren Differenz als PQ-Intervall an. Der blaue Bogen in (d) verdeutlicht das Auftreten einer Kamertachykardie. (a) Sinusrhythmus; (b) AV-Block Grad I; (c) AV-Block Grad II Typ 1 „Wenckebach“; (d) Kamertachykardie und AV-Dissoziation. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Alle in der Studie inkludierten Tiere zeigten vor Intervention einen normalen Sinusrhythmus (Abbildungen 21a und 22a).

Während unmittelbar nach der Fixierung zur Injektion bei allen Tieren eine Sinustachykardie zu sehen war, trat bei allen Dq-positiven Tieren spätestens fünf Minuten nach CNO-Gabe eine gleichmäßige Verlängerung des PQ-Intervalles auf. Dieser atrioventrikuläre Block (AV-Block) I. Grades ist beispielhaft in den Abbildungen 21b und 22b gezeigt. Nach acht bis zwölf Minuten entwickelte sich daraus ein AV-Block II. Grades Typ 1 „Wenckebach“. Die hierfür typische sukzessive Verlängerung des PQ-Intervalls bis zum Ausfall des QRS-Komplexes, welcher den Ausfall der Kammerkontraktion bei vorausgegangener Vorhoferregung indiziert, ist in den Abbildungen 21c und 22c zu sehen.

Im weiteren Verlauf entwickelten sich unterschiedlich schnell höhergradige Arrhythmien. Vorhöfe und Herzkammern depolarisierten getrennt voneinander, sichtbar an unabhängig voneinander ablaufenden P-Wellen und QRS-Komplexen. Die PP-Intervalle waren kürzer als die RR-Intervalle. Neben einzelnen ventrikulären Extrasystolen kam es zur allgemeinen Verbreiterungen des QRS-Komplexes (Störung in der ventrikulären Reizleitung und Depolarisation) und einem Anstieg der Dauer des QTc-Intervalles (verlängerte De- und Repolarisation). Ehe im EKG keine Herzaktion mehr sichtbar war (Asystolie), traten zumeist Episoden zahlreicher, schnell hintereinander ablaufenden Extrasystolen auf bis hin zur Ventrikulären Tachykardie (siehe Abbildungen 21d und 22d). Während der Ventrikulären Tachykardie, auch Kammer-tachykardie genannt, wurde die Auswurfleistung des Herzens insuffizient, die lebenswichtigen Organe wurden unterversorgt, die Tiere starben.

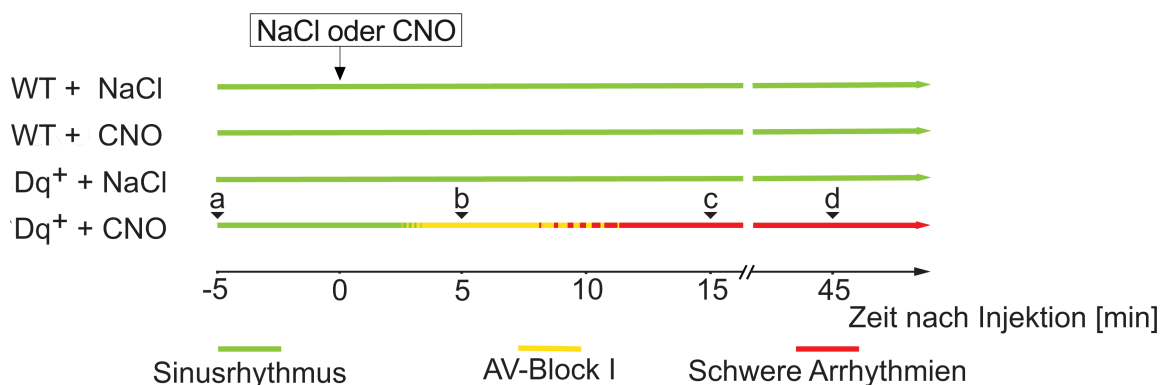


Abbildung 23: Zeitliches Auftreten von Arrhythmien. Die Kleinbuchstaben a-d beziehen sich auf die in Abbildung 21 und 22 gewählten Zeitpunkte für die Darstellung repräsentativer EKG-Spuren. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Abbildung 23 zeigt, ob und wann in einer Gruppe im EKG Arrhythmien sichtbar wurden. Wenn keines der untersuchten Tiere in den untersuchten Zeitpunkten anhaltende und pathologisch relevante Herzrhythmusstörungen gezeigt hatte, wurde dies als grüner Abschnitt dargestellt. Als nicht pathologisch relevant wurde etwa die der Injektion folgende Sinustachykardie eingestuft, genauso wie vereinzelt ausfallende QRS-Komplexe (< 5/Minute). Eine pathologisch verlängerte PQ-Zeit (> 0,04 Sekunden) erklärt sich durch eine verzögerte Überleitungszeit im

AV-Knoten (AV-Block I. Grades) und ist alleine nicht klinisch relevant. Der AV-Block I. Grades wurde daher abgegrenzt von weiteren beobachteten Arrhythmien in der Zeitleiste als gelber Abschnitt dargestellt. Das Auftreten höhergradiger AV-Blöcke bis zur AV-Dissoziation, QRS-Komplex-Verbreiterungen, Extrasystolen und ventrikulärer Tachykardien werden in Abbildung 23 als roter Abschnitt verdeutlicht.

Die statistische Auswertung der Telemetriedaten ist in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

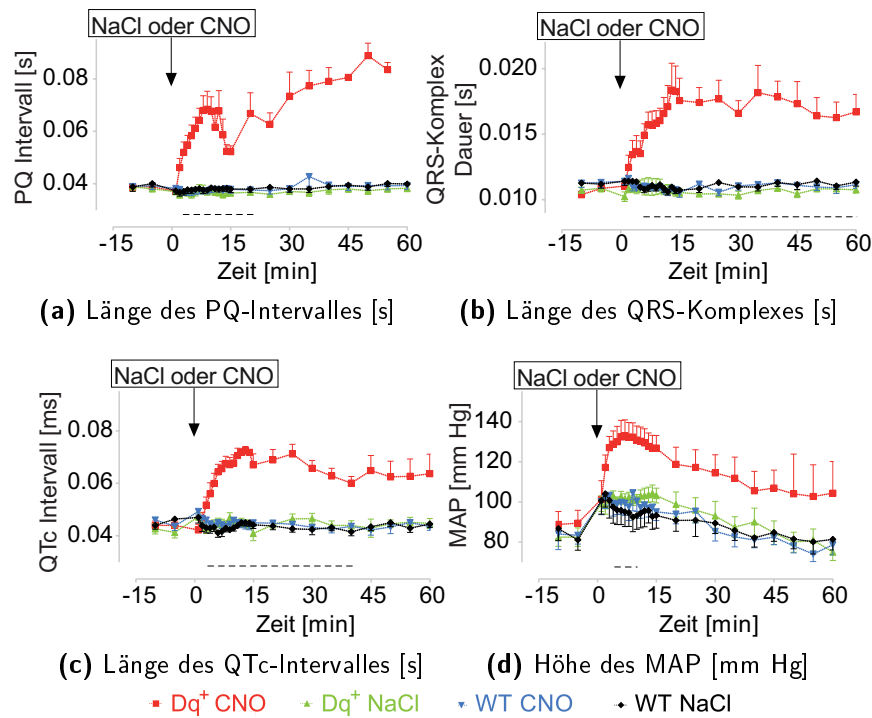


Abbildung 24: Statistische Auswertung der Telemetriedaten. Der Zeitpunkt der Applikation von 0,9% NaCl oder 10 mg/kg CNO (in 0,9% NaCl) wird mittels Pfeil und der Beschriftung „NaCl oder CNO“ dargestellt. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt Zeitpunkte, an denen die Gruppe Dq + CNO signifikant höhere Werte gegenüber allen anderen Gruppen hatte. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Das PQ-Intervall als Maß für die Überleitungszeit von Beginn der atrialen bis zum Beginn der ventrikulären Erregung war ab Minute 3 nach Injektion in Gruppe Dq⁺ + CNO signifikant länger im Vergleich zu allen anderen Konditionen. Die mittlere Länge [s] nahm anfangs fast linear zu und fiel dann kurzfristig nach 10 Minuten ab. Zu diesem Zeitpunkt entwickelten viele der Tiere eine Wenckebach-Periodik mit stetig zunehmender PQ-Intervall Länge bis zum QRS-Komplex Ausfall. Für diese Tiere konnte die Länge des PQ-Intervalles nicht festgelegt werden und daher nicht weiter statistisch erfasst werden. Die Kurve zeigt zu jedem Zeitpunkt nur die verbliebenen Tiere, deren PQ-Intervall messbar blieb (Abbildung 24 a).

Die Breite des QRS-Komplexes nahm in der Gruppe Dq⁺ + CNO Gruppe zeitgleich mit der Länge des PQ-Intervalles zu und war ab Minute 6 nach CNO-Injektion signifikant länger gegenüber WT + NaCl, WT + CNO und Dq⁺ + NaCl (Abbildung 24 b). Eine Verbreiterung des QRS-Komplexes ist symptomatisch für eine Störung der ventrikulären Reizleitung.

Das QTc-Intervall - die gesamte Phase der elektrischen kardialen Aktivität inklusive Erregungsrückbildung und auf die Herzrate korrigiert - folgte dem Trend der zuvor beschriebenen Parameter und wird in Abbildung 24 c gezeigt: es stieg ebenfalls kurze Zeit nach CNO-Injektion nur bei Dq-positiven Tieren an. Die ermittelten Werte waren ab Minute 4 signifikant länger im Vergleich zu allen anderen Konditionen.

Wie in Abbildung 24d ersichtlich, zeigte die Messung des Blutdrucks größere Schwankungen. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP, *mean arterial pressure*) der Tiere stieg nach Tierfixierung und Injektion in allen Gruppen an. Nach etwa 30 Minuten erreichte er in den drei Kontrollgruppen wieder ein mit dem Ausgangswert vergleichbares Niveau. Bei Dq-positiven Mäusen stieg der MAP nach CNO-Applikation auf höhere Werte und betrug zwischenzeitlich $132,9 \pm 8,0$ mm Hg (Minute 7 nach CNO) bei einem Ruhewert von $89,3 \pm 6,4$ mm Hg (5 Minuten vor CNO). Er fiel danach zwar langsam ab, blieb aber immer etwa 20-35 mm Hg über dem MAP der anderen Gruppen. Signifikant höher gegen alle anderen Gruppen waren diese Werte vier bis zehn Minuten nach Injektion, gegenüber vereinzelt Gruppen auch zu späteren Zeitpunkten.

Die Stichprobengrößen zu jedem der Messzeitpunkte konnte, wie schon oben erwähnt, mitunter schwanken. Gründe dafür war die Nichtauswertbarkeit eines Parameters (etwa durch veränderliche PQ-Intervalle oder durch eine äußerst flache Annäherung der T-Welle zur isoelektrischen Linie), die Bildung eines Blutgerinnsels am Blutdruckmesskatheter oder der Tod der Tiere vor Ablauf der 60-minütigen Auswerte-Periode. Gerade für das PQ-Intervall war daher die Stichprobengröße der Gruppe Dq + CNO sehr klein geworden. Deswegen wurden in den Graphiken ab einer Stichprobengröße < 5 Mäuse keine Signifikanzen mehr vermerkt. Die angefügte Tabelle 3 soll die zur Verfügung stehenden Stichprobengrößen zu jedem Zeitpunkt für jeden Parameter zeigen.

Zeit	PQ-Intervall				QRS-Komplex				QTc-Intervall				MAP			
	WT NaCl	WT CNO	Dq+ NaCl	Dq+ CNO	WT NaCl	WT CNO	Dq+ NaCl	Dq+ CNO	WT NaCl	WT CNO	Dq+ NaCl	Dq+ CNO	WT NaCl	WT CNO	Dq+ NaCl	Dq+ CNO
-10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	9	8	8	7	7
-5	10	9	10	10	10	9	10	10	10	10	9	9	8	8	7	7
+1	9	10	10	10	8	10	10	10	9	10	10	10	8	8	7	7
+2	9	10	10	9	9	10	10	10	10	9	10	10	8	8	7	7
+3	10	10	10	8	9	10	10	10	10	10	10	10	8	8	7	7
+4	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	7	7
+5	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	10	9	8	8	7	7
+6	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8	7	7
+7	10	10	10	7	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8	7	7
+8	10	10	10	6	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8	7	7
+9	10	10	10	5	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	7	7
+10	10	10	10	5	10	10	10	10	10	10	9	7	8	8	7	7
+11	9	10	9	4	10	10	10	10	10	10	9	6	8	8	7	7
+12	9	10	9	6	10	10	10	10	10	10	9	7	8	8	7	7
+13	9	10	9	5	10	10	10	10	10	10	9	6	8	8	7	7
+14	9	10	10	4	10	10	10	10	8	10	9	6	8	8	7	7
+15	9	9	10	4	10	10	10	10	8	10	9	8	8	8	7	7
+20	10	10	9	5	10	10	10	10	10	10	9	7	8	8	7	6
+25	10	9	10	3	10	9	10	10	10	10	9	7	8	8	7	6
+30	10	10	9	3	10	10	10	10	10	10	9	7	8	8	7	6
+35	10	10	10	4	10	10	10	10	10	10	9	6	8	8	7	6
+40	10	10	10	3	10	10	10	9	10	10	9	6	8	8	7	6
+45	10	9	10	1	9	9	10	6	10	10	9	4	8	8	7	4
+50	10	10	9	2	10	10	9	6	10	10	9	4	8	8	7	3
+55	10	10	10	2	10	10	10	6	10	10	9	4	8	8	7	3
+60	10	10	10	0	10	10	10	6	10	10	9	3	8	8	7	3

Tabelle 3: Stichprobenzahlen der Telemetriedaten

5.3 CNO Plasmakonzentration

Um für die Experimente am Langendorff Apparat (*ex-vivo*) und auf Einzelzellebene CNO-Konzentrationen in vergleichbaren Größenordnungen wie in den *in-vivo* Experimenten verwenden zu können, sollte diese im Blutplasma zu einem kritischen Zeitpunkt bestimmt werden. Guettier und Kollegen haben in einer Messreihe festgestellt, dass 15 Minuten nach i.p. Injektion die CNO-Konzentration im Kreislauf am höchsten war[48]. Zu diesen Zeitpunkt waren zudem die CNO-induzierten Effekte im *in-vivo* EKG bei allen Dq-positiven Tieren stark ausgeprägt (siehe Abbildung 23). Durch die höhere verwendete Dosis (Faktor 10) in den Telemetrie-Experimenten sollte der Wert für unsere Studie neu ermittelt werden. Bei einer Stichprobengröße von fünf Tieren konnte eine CNO-Plasma-Konzentration von $7,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ festgestellt werden (Messung durch die Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken).

5.4 Untersuchungen am isolierten Herz

Die Auswirkung einer Dq Aktivierung auf das isolierte Herz wurde bei einer CNO-Konzentration von $7,5 \mu\text{M}$ (in Tyrode) untersucht, entsprechend der ermittelten CNO-Plasma-Konzentration 15 Minuten nach Injektion von 10 mg/kg KGW CNO im lebenden Tier (siehe Unterkapitel 5.3).

5.4.1 Wahl des passenden Perfusionsprotokolles

Zu Beginn der Untersuchung am isolierten Herzen wurden drei verschiedene Perfusionsprotokolle getestet, die sich darin unterschieden, wie lange das Herz mit CNO-freier Tyrode versorgt wurde.

Eine Adaptionzeit von ≥ 10 Minuten vor dem Wechsel auf CNO-hältige Tyrode führte bei keinem der untersuchten Herzen Dq-positiver Tiere zu einer Veränderung der elektrischen Aktivität ($n=3$).

Zwei Herzen Dq-positiver Mäuse wurden unmittelbar nach Anschluss an den Langendorffapparat mit CNO-hältiger Tyrode perfundiert. An beiden Herzen waren sofort sehr breite QRS-Komplexe (12 bzw. 14 ms) bei kleiner R-Amplitude sichtbar.

Um einen longitudinalen Vergleich zu ermöglichen, wurde im dritten Perfusionsprotokoll wieder eine Adaptionphase mit CNO-freier Tyrode eingeführt, die auf 2-5 Minuten vor dem Wechsel auf CNO-hältige Tyrode verkürzt wurde. Für die weitere Analyse wurden diese Einstellungen verwendet. Die Stichprobengröße betrug sieben (WT) bzw. zehn (Dq^+) Herzen.

5.4.2 Auswertung der am isolierten Herzen erhobenen Daten

Der allgemein gleichförmigere Verlauf des EKGs bei Abwesenheit systemischer Effekte (Bewegung, vegetatives Nervensystem, Atmung etc.) erlaubt zur besseren Visualisierung der Veränderung am EKG eine repräsentative 3D Darstellung der chronologisch ablaufenden einzelnen

elektrischen Herzaktivitäten (Abbildung 25a,c). Im Hintergrund beginnend und nach vorne laufend ist vor und nach CNO-Applikation die Form des EKGs bei unveränderter Elektrodenanordnung zu sehen. Dabei wurden die höchsten Punkte der R-Zacken synchron hintereinander gelegt, sodass die von hinten links nach vorne rechts verlaufende Achse den Zeitablauf des Experiments zeigt, beginnend etwa 90 Sekunden bevor CNO Kontakt zum Herzen hatte. Die von vorne links nach hinten rechts verlaufende Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf innerhalb der einzelnen EKG-Zyklen. Die Spannungsamplitude ist farblich kodiert abgebildet. Die Peaks der P-Wellen sind zur besseren Kenntlichmachung mit einer gelb gestrichelten Linie markiert. Rechts sind zu kritischen Zeitpunkten typische EKG-Zyklen im 2D-Verlauf abgebildet (Abbildung 25b,d). Auffallend ist in Herzen von Dq-positiven Tieren der drastische Abfall der R-Amplitude und die Längenzunahme des PQ-Intervalles und des QRS-Komplexes (Abbildung 25c,d). Dagegen kommt es in Wildtyp-Herzen durch CNO nur zu unwesentlichen Veränderungen (Abbildung 25a,b).

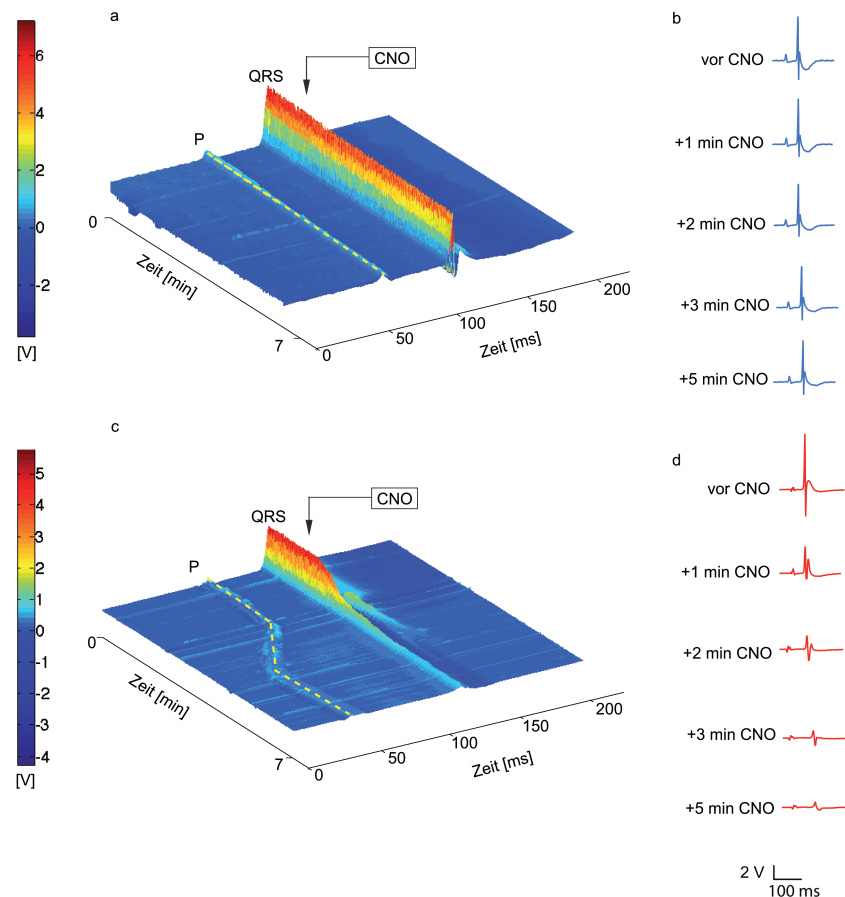


Abbildung 25: Repräsentative Darstellung der EKG Zyklen in isolierten Herzen von Wildtyp (a,b) und Dq-positiven (c,d) Mäusen. Jeweils links (a,c) sind als 3D-Grafik die einzelnen, aufeinander folgenden EKG-Zyklen eines sieben Minuten langen Messzeitraumes aneinandergereiht. Die rechten Tafeln (b,d) zeigen einzelne EKG-Zyklen zu ausgewählten Zeitpunkten. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, sind die beobachteten Veränderungen der EKG-Parameter bereits nach ein bis zwei Minuten signifikant im Vergleich zum Wildtyp. Dabei verlängerte sich das PQ-Intervall in der Dq-positiven Gruppe von $39 \pm 0,5$ ms vor CNO-Applikation auf $66 \pm 0,8$ ms nach fünf Minuten. In Wildtypherzen kam es im selben Zeitrahmen zu einem

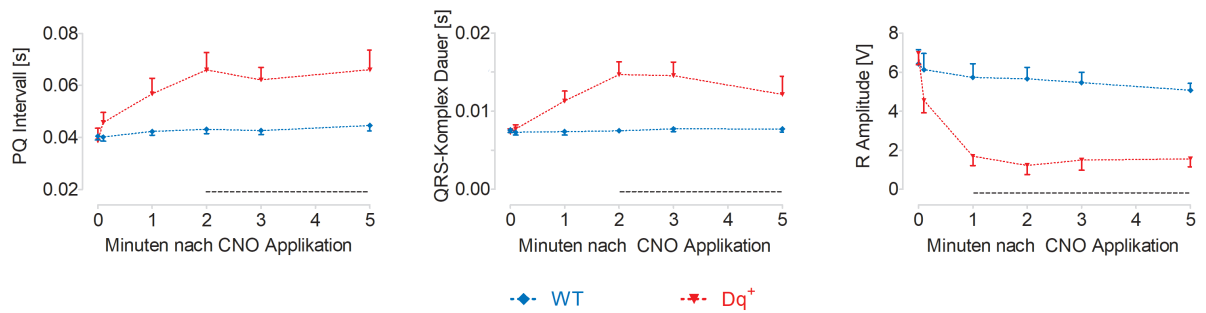


Abbildung 26: Statistische Auswertung und Darstellung der Dauer der PQ-Intervalle (links), der QRS-Komplexe (Mitte) und der Höhe der R-Amplitude (rechts) retrograd perfundierter Herzen im Zeitverlauf. Die x-Achse zeigt die Dauer der Einwirkung von 7,5 μ M CNO im Gewebe. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. $n=7-10$ Herzen. Daten gezeigt in Kaiser *et al.* [72].

nicht signifikanten Anstieg von $40 \pm 0,1$ ms auf $45 \pm 0,2$ ms. Die Dauer des gemessenen QRS-Komplexes stieg in der transgenen Gruppe von $7 \pm 0,5$ ms auf 12 ± 2 ms, während sie in Wildtypherzen gleichbleibend war ($8 \pm 0,3$ ms zum Zeitpunkt 0; $8 \pm 0,4$ ms nach fünf Minuten). Die R-Amplitude fiel in der Dq-positiven Herzen von $6,9 \pm 0,6$ V auf $1,6 \pm 0,4$ V, in der Wildtypherzen lediglich von $6,4 \pm 0,73$ V auf $5,1 \pm 0,4$ V. Die Analyse des QTc-Intervalles als Indikator der Erregungsrückbildung ist im Gegensatz zur Messung am lebenden Tier nicht möglich gewesen: In Mäuseherzen läuft die T-Welle bis zum Erreichen der isoelektrischen Linie tangential aus. Durch das in den Langendorff-Messungen stärkere Rauschen des Signals war das Ende der T-Welle nicht festzulegen.

5.5 Optische Messung der Aktionspotentiale

5.5.1 Aktionspotentialdauer in neonatalen Kardiomyozyten

Abbildung 27 zeigt Ventrikelzellen neonataler Mäuse in Zellkultur an Tag 0, 1, 5 und 7 nach Isolation. Die frisch isolierten Zellen wurden einige Tage kultiviert und beobachtet, bis sie an der Deckglasoberfläche hafteten und miteinander in Kontakt traten. Am Tag 0 sahen die Zellen abgerundet aus, wurden dann spindelförmig, später flacher, größer, bildeten Zell-zu-Zell-Kontakte aus und fingen an spontan zu kontrahieren. Wenn möglichst viele synchronisiert kontrahierende Ventrikelzellen zu detektieren waren, Zellkontakte sichtbar waren, ohne dass nach der Isolation noch vorhandene Fibroblasten sie überwucherten, konnten sie für die Experimente verwendet werden. In meinem Fall war dies am 9. (DIV9) und 10. Tag (DIV10) nach Isolation.

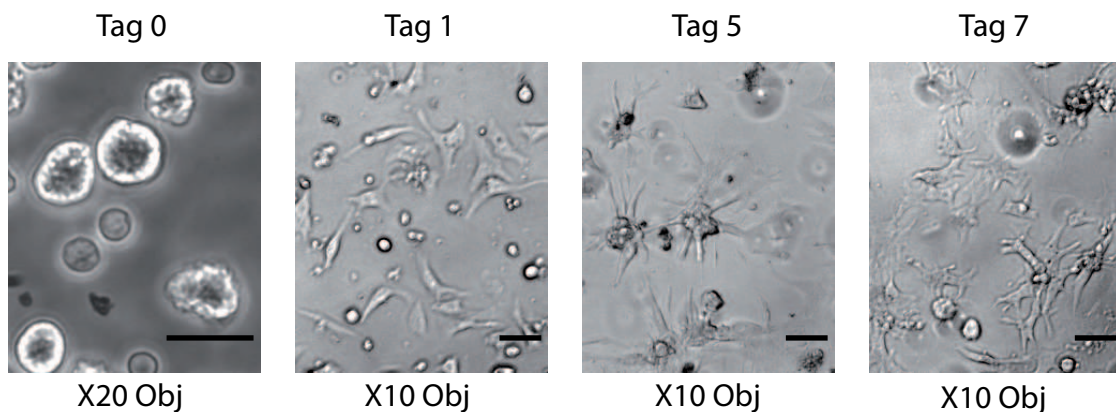


Abbildung 27: Dargestellt werden mikroskopische Durchlichtaufnahmen isolierter und kultivierter neonataler Kardiomyozyten am Tag der Zellisolation sowie 1, 5 und 7 Tage danach. Der Messbalken entspricht 50 μm .

Um Aktionspotentiale in den neonatalen Kardiomyozyten optisch zu messen, wurde in Pilotstudien Tyrode ohne weitere Zusätze verwendet. Für die Provokationsmessung mit CNO wurde aufgrund der Ergebnisse aus der CNO-Konzentrationsbestimmung im Plasma 10 μM CNO gewählt (siehe Abschnitt 5.3. Während der Messung wurden die Zellen elektrisch stimuliert (2 Hz, 5 ms). Es gelang dabei nicht, stabile Messungen zu etablieren: die wenigen Herzzellen, die nach di-8-ANEPPS Färbung (10 μM , 15 min Inkubationsdauer) noch kontraktile waren, zeigten auch unter Kontrollbedingungen keine normalen Aktionspotentiale mehr, sondern lediglich nicht reproduzierbare Änderungen im Membranpotenzial. Bei dem Versuch, dieselben Zellen bzw. Zellverbände ein zweites Mal zu messen konnte keine Kontraktilität mehr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In der Folge wurden potentiell zytotoxische Variablen (di-8-ANEPPS-Konzentration, Inkubationszeit, Anregungsdauer) auf ihren Effekt auf die Messung überprüft, und von Tyrode auf HBSS (+0,25 mM Natriumpyruvat) gewechselt. Die di-8-ANEPPS-Konzentration wurde auf bis zu 3,75 μM und die Inkubationsdauer auf 10 Minuten gesenkt. Die elektrische Anregungsdauer wurde auf bis zu 2 ms reduziert. Auf eine wiederholte Messung an denselben Zellen

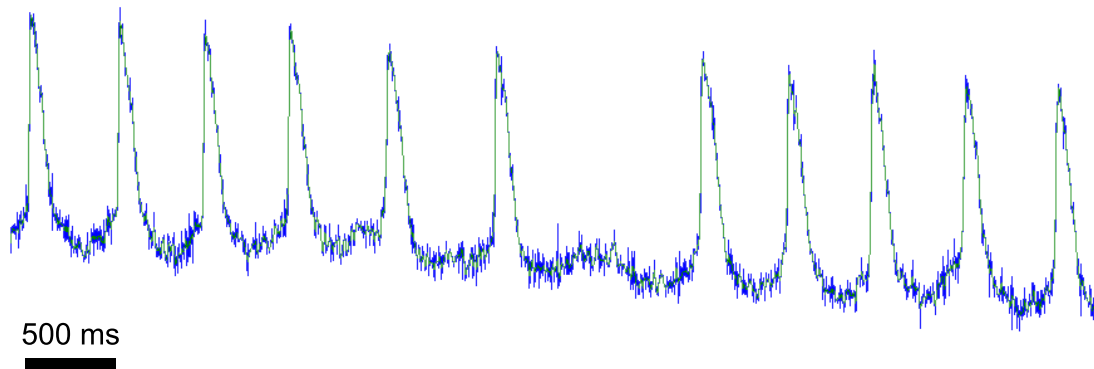


Abbildung 28: Aufzeichnung eines typischen Aktionspotentials einer neonatalen Maus-Ventrikelzelle bei optischer Messung und elektrischer Stimulation mit 2 Hz.

wurde verzichtet, stattdessen wurden vergleichbare Zellpopulationen entweder als CNO-freie Kontrolle nur mit HBSS (+DMSO als „Leerkontrolle“) perfundiert oder mit HBSS + CNO (in DMSO). Die CNO-Konzentration wurde in allen Etablierungsversuchen mit 10 μM beibehalten. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit mit 5 μM di-8-ANEPPS konnten bei guter Signalstärke reproduzierbare Messungen erzielt werden und daher als Bedingung in den Folgemessungen angewendet. Das Variieren der elektrischen Stimulation verbesserte die Reproduzierbarkeit nicht weiter.

Die nachfolgend beschriebenen Daten stammten von Zellen dreier Wildtyp- und von sieben Dq-positiven Welpen. 31-59 Zellen/Gruppe konnten an DIV 9 und 23-36 Zellen/Gruppe an DIV10 ausgewertet werden. Abbildung 28 zeigt typische, optisch gemessene Aktionspotentiale eines neonatalen Kardiomyozyten, Abbildung 29a und b zeigt die statistische Auswertung nach Messtagen getrennt. Die mittlere Dauer der Aktionspotentiale ist Tabelle 4 zu entnehmen. Bei dem Vergleich, ob CNO die Länge der Aktionspotentiale verändert, konnte lediglich an DIV9 ein signifikanter Unterschied zwischen den Dq⁺-Gruppen für APD70 festgestellt werden (Abbildung 29a). Um die Stichprobenzahl vergrößern zu können, wurde außerdem noch untersucht, ob sich die Länge der Aktionspotentiale zwischen DIV9 und DIV10 signifikant verändert. Dies war für die Gruppe Dq⁺ Ktr. bei APD70 zutreffend (Abbildung 29c oben rechts).

Um dennoch die Stichproben vergrößern zu können, wurden die CNO perfundierten Gruppen normalisiert. Dazu wurden die einzelnen Messwerte durch den Mittelwert der entsprechend CNO-frei perfundierten Gruppen (getrennt nach Genotyp) dividiert und die Gruppen „WT CNO“ und „Dq⁺ CNO“ gegeneinander verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied, weder für APD30, noch für APD70, festgestellt werden (Abbildung 29c).

	WT Ktr.			WT CNO			Dq ⁺ Ktr.			Dq ⁺ CNO		
	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n
APD30 DIV9	43	2,4	31	38	1,9	46	40	2,0	35	39	1,8	53
APD70 DIV9	228	14,0	33	235	15,4	53	275	17,2	38	216	13,9	56
APD30 DIV10	51	4,4	29	37	1,9	23	44	2,9	33	38	1,7	31
APD70 DIV10	193	12,6	30	188	15,6	25	181	12,2	33	182	14,1	36

Tabelle 4: Aktionspotentialdauer in isolierten, neonatalen Ventrikelzellen. Die Dauer entspricht der durchschnittlichen Länge der APD30 bzw. APD70

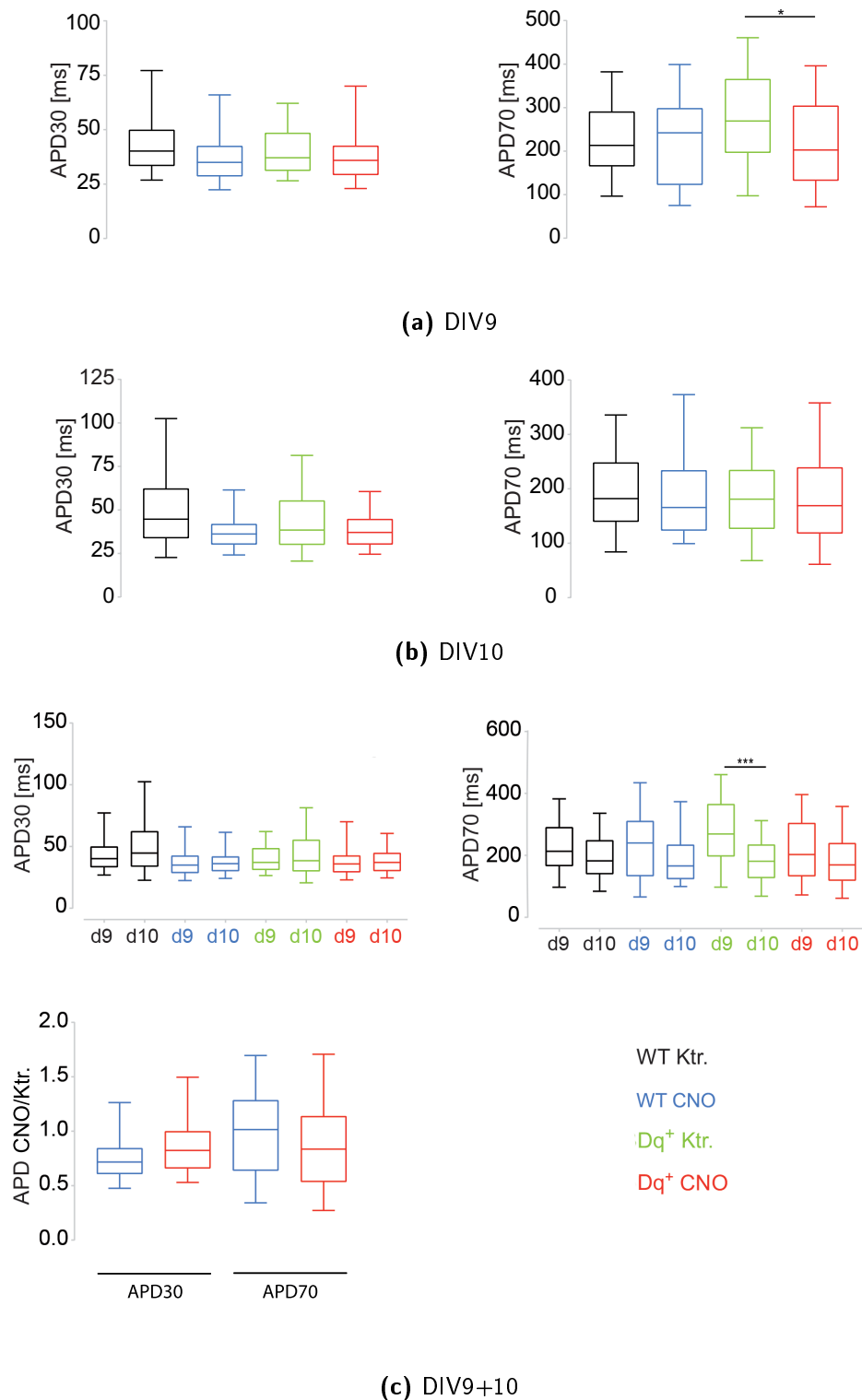


Abbildung 29: Aktionspotentialdauer in neonatalen Kardiomyozyten. (a) APD30 und APD70 an DIV9; (b) APD30 und APD70 an DIV 10; (c) Vergleich von APD30 (links oben) und APD70 (rechts oben) zwischen den beiden Messtagen; Links unten: die Werte für APD30 und APD70 von CNO perfundierten Zellen wurden auf den Mittelwert CNO-frei perfundierter Zellen normalisiert und verglichen. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

5.5.2 Aktionspotentialdauer in adulten Ventrikelzellen

Die vergleichsweise fragileren adulten Ventrikelzellen konnten bei den Konditionen, die für neonatale Zellen verwendet wurden, nicht gemessen werden. Die Zellen ließen sich nicht mehr regelmäßig stimulieren. Innerhalb einer Minute nach Lichtexposition verloren die Zellen ihre Struktur und rundeten sich ab. Eine schrittweise Reduktion der di-8-ANEPPS Konzentration bis auf 1 μM bei verkürzter Inkubationsdauer auf 10 Minuten führte zwar dazu, dass die Zellen ihre Form behielten, sie konnten aber immer noch nicht reproduzierbar gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere di-8-ANEPPS-Reduktion war ohne schwere Einbußen in der Signalstärke nicht möglich.

Nachdem zusätzlich die Umgebungstemperatur auf 20 - 22 °C Raumtemperatur gesenkt wurde, gelang es, die adulten Zellen bei ausreichender Signalstärke und in ausreichender Zahl reproduzierbar zu messen. Abbildung 30 zeigt repräsentativ den Verlauf der mittels optischer Messung ermittelten Aktionspotentiale. Für die Darstellung wurden die Spuren normalisiert, indem der niedrigste Wert vor Auslösung des AP und höchste Wert des AP als 0 und 1 definiert wurden. Außerdem wurde die Bestimmung von APD30 (Aktionspotentialdauer bei 30% Repolarisation), und APD70 (Aktionspotentialdauer bei 70% Repolarisation) als charakteristische Werte der Repolarisation dargestellt.

Es konnte von jeweils 3 Wildtyp- und Dq-positiven Tieren insgesamt 145 - 207 Zellen pro Gruppe gemessen werden. Die dabei ermittelten Werte für von APD30 und APD70 sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Wie Abbildung 31 zeigt, war die Aktionspotentialdauer in adulten Dq-positiven Zellen signifikant länger nach Applikation von 10 μM CNO. Dies galt sowohl für die frühe Phase (APD30) als auch für die späte Phase (APD70) der Repolarisation. Sie stieg im Vergleich zur unter Kontrollbedingungen gemessenen genotypgleichen Gruppe von 10,9 \pm 0,18 ms auf 11,9 \pm 0,20 ms (APD30) bzw. von 24,7 \pm 0,52 ms auf 29,2 \pm 0,63 ms (APD70). Dagegen führte CNO in Zellen von Wildtypmäusen zu keiner signifikanten Veränderung in der Aktionspotentialdauer (10,0 \pm 0,20 ms und 10,1 \pm 0,22 ms für APD30 bzw. 22,0 \pm 0,55 ms und 23,4 \pm 0,65 ms für APD70).

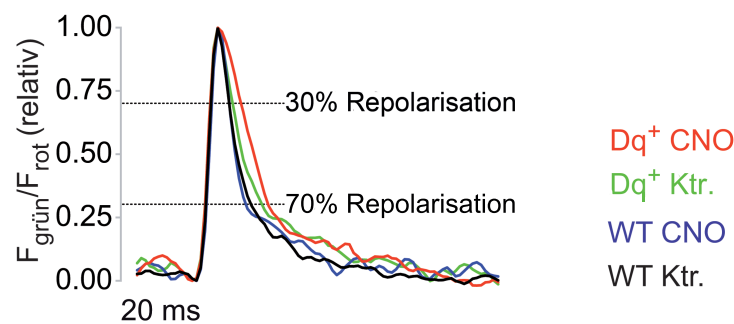


Abbildung 30: Gezeigt werden repräsentative Spuren der Aktionspotentiale einzelner Zellen adulter Tiere jeder Gruppe. Um sie vergleichbar zu machen, wurde das Signal der Mittelwert der binnen 5 Sekunden abgelaufenen Aktionspotentiale festgestellt und normalisiert. Durch horizontal gestrichelte Linien sind 30%ige bzw. 70%ige Repolarisation zur Bestimmung von APD30 und APD 70 dargestellt.

	WT Ktr.			WT CNO			Dq ⁺ Ktr.			Dq ⁺ CNO		
	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n	Dauer [ms]	SEM [ms]	n
APD30	10,0	0,20	169	10,1	0,22	144	10,9	0,18	175	11,9	0,20	207
APD70	22,0	0,55	170	23,4	0,65	145	24,7	0,52	175	29,2	0,63	206

Tabelle 5: Aktionspotentialdauer in isolierten, adulten Ventrikelzellen. Die Dauer entspricht der durchschnittlichen Länge der APD30/APD70

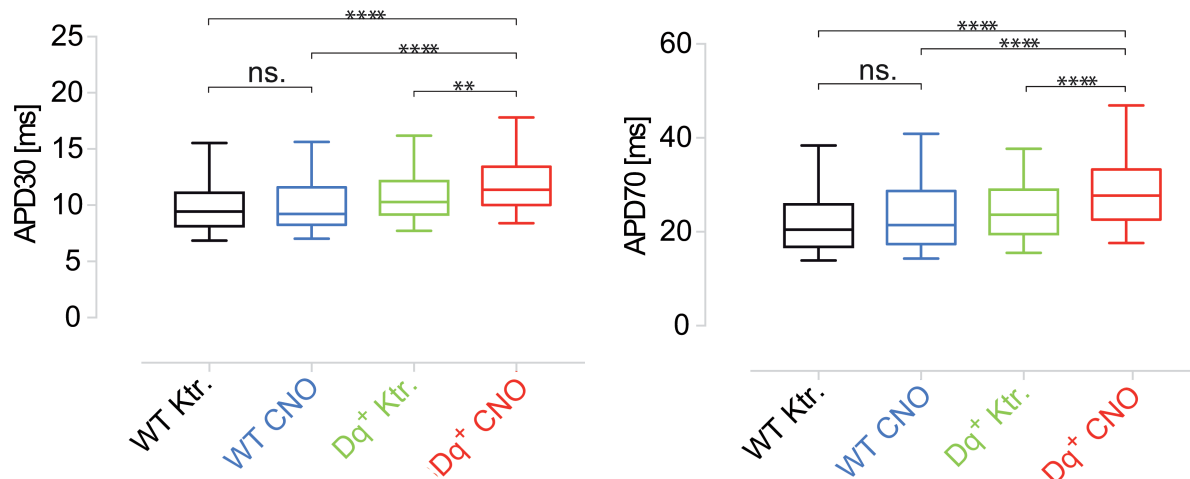


Abbildung 31: Vergleich von APD30 (links) und APD70 in adulten Ventrikelzellen.

Zusammenfassend konnte im optischen Messverfahren bei neonatalen Ventrikelzellen nur an DIV9 eine signifikante Verkürzung der APD70 festgestellt werden. Dieser Unterschied war an DIV10 als auch nach Normalisierung verschwunden, auch alle anderen Parameter der Länge der Repolarisationsphase des Aktionspotentials waren weder durch CNO, noch im Zusammenspiel mit dem Designerrezeptor signifikant unterschiedlich zu Kontrollbedingungen. Die Zellen neonatalen Ursprungs können kultiviert werden und waren allgemein stabiler während der Messung. Um adulte Ventrikelzellen zu untersuchen, musste unter anderem die Messtemperatur von 37 °C auf Raumtemperatur gesenkt werden. Unter diesen Bedingungen waren bei Zellen, bei denen der Designerrezeptor mit seinem Agonisten interagieren konnte, die Aktionspotentiale länger.

6 Diskussion

G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln, wie eingangs erwähnt, im Herzen und in allen anderen Geweben des Säugerorganismus zahlreiche äußere Signale, indem sie durch Bindung eines Liganden an der Zellaußenseite heterotrimäre G-Proteine an der Zellinnenseite aktivieren. Die Vielzahl an davon abhängigen kurz- und langfristigen Regel- und Steuerungsmechanismen stellen die Rezeptoren und die von ihnen ausgelösten Signalkaskaden in den Mittelpunkt physiologischer und pathologischer Zellfunktionen [121]. Um innerhalb der heterogenen Gruppe der G-Protein vermittelten Signalkaskaden die spezifische Bedeutung der durch das aktivierte G_q -Trimer induzierten Mechanismen im Herzen erforschen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Mäusemodell verwendet, welches die gezielte Aktivierung modifizierter G_q -gekoppelter Rezeptoren (DREADDs) mittels künstlichem Agonisten erlaubt.

6.1 Auswahl des Mausmodelles

Die Labormaus (*Mus musculus*) bietet als Modell für die Erforschung der humanen und generell der Säugerphysiologie und -pathologie eine Reihe von Vorteilen: Die kodierenden Regionen der Gene von Mensch und Maus stimmen zu etwa 95% überein. Die erfolgreich abgeschlossene Gensequenzierung der Maus, die ausgereiften Möglichkeiten genetischer Manipulation, die kleine Größe, der kurze Generationszyklus, die einfache Haltung und die effiziente Generation vergleichbarer Studienkohorten durch große Wurfzahlen und Standardisierung durch Inzuchtlinien sind weitere Vorteile eines Mausmodelles [54, 101, 126]. Ein unzählbares Ausmaß bedeutender medizinischer und biologischer Errungenschaften basieren auf Studien an der Labormaus. Die Übertragbarkeit und Einsetzbarkeit ist allerdings limitiert [101]. Trotz der hohen genetischen Übereinstimmung zeigten etwa manche Medikamente, die im Tierversuch vielversprechend war, eine schwache Wirkung bei Anwendung am Menschen. Der hohe Inzuchtgrad, der einerseits eine hohe Standardisierung mit sich bringt, spiegelt andererseits die genetische Vielfalt innerhalb einer Säugerspezies nicht wider. Mäuse sind resistenter als Menschen gegen Infektionen und Entzündungen und eignen sich laut Seok und Kollegen nur bedingt für immunologische Studien [135]. Dem widersprechen Takao und Miyakawa [147], die mit etablierten Methoden eine Metadatenanalyse an den selben Daten durchführten und eine hohe Korrelation zwischen humanen und murinen Ergebnissen gefunden haben. Mäuse stellen daher nur ein Modell für den Menschen dar, welcher aus naheliegenden ethischen und praktischen Gründen meist nicht selbst Proband für die medizinisch-biologische Grundlagenforschung sein kann [101].

Aus den genannten Gründen und ethischen Gesichtspunkten wird daher die Reduktion, Verbesserung und Verfeinerung (3-R Prinzip: *reduce, refine, replace*) von Tierversuchen angestrebt. Zusammenfassend ist heute das Mausmodell für die biomedizinische Forschung unerlässlich, muss aber in den einzelnen Anwendungen kritisch hinterfragt werden. In dieser Arbeit stand die Untersuchung G_q -Protein vermittelter Signalwege auf die elektrische Aktivität des Her-

zens im Zentrum. Wenn Ergebnisse an genetisch modifizierten Mauslinien Rückschlüsse auf humane Pathophysiologien liefern sollen, muss daher insbesondere die abweichende Herzmorphologie [36], die Besonderheiten des murinen EKGs hinsichtlich Frequenz, der Ausrichtung des generierten Nettodipols und Trennung von De- und Repolarisation [18] sowie die unterschiedliche Beteiligung von Ionenkanälen am Aktionspotential [114] berücksichtigt werden (siehe auch Abschnitt 3.3.3).

6.2 Verwendung von DREADD-basierter Technologie

Seit der Vorstellung der DREADD-basierenden Chemorezeptoren-Generation im Jahr 2007 [4] erfreute sich die Technologie vor allem auf dem Gebiet der Neurowissenschaften wachsender Beliebtheit [153]. Die Möglichkeit, G_s -, G_i -, G_q - und β -Arrestin vermittelte Signalwege zeitlich und räumlich kontrolliert zu initiieren und zu überwachen, erlaubt den Fokus auf Wirkung und Folgen der Aktivierung der *de facto* in allen Zelltypen vorkommenden Proteine [161]. Der Versuch, endogene G_q -koppelnde Rezeptoren spezifisch im Herzen zu aktivieren, scheitert insbesondere bei Untersuchungen am lebenden Tier an folgenden Punkten:

- Liganden, die an endogenen Rezeptoren binden, binden auch an anderen Rezeptortypen. Dadurch kann eine alleinige Aktivierung des G_q -Signalweges nicht untersucht werden.
- Die Liganden binden auch an auf anderen Gewebetypen vorkommenden Rezeptoren. Systemische Effekte erschweren die Interpretation der Wirkung auf den Gewebetyp von Interesse (z. B. Herzmuskelzellen).
- Die endogenen Rezeptoren selbst bzw. die nachgeschalteten Effektoren beeinflussen mehrere Signalwege.

DREADDs werden zusätzlich zu ihren natürlichen Pendants exprimiert und sind in ihrer Generation chemogenetischer Rezeptoren Abkömmlinge muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Durch genetische Modifikation an der dritten und fünften Transmembranhelix des Rezeptors [161] bringen diese Rezeptoren folgende Eigenschaften mit: DREADDs haben ihre Affinität zu natürlichen Liganden verloren [4, 48]. Zirkulierendes Acetylcholin bindet nicht an DREADDs. Eine konstitutive Aktivität ist in der Regel nicht gegeben, was speziell für die M3Dq Rezeptoren belegt werden konnte [48]. Sie werden durch die künstliche Substanz CNO aktiviert. CNO hingegen hat keine Affinität zu endogenen Rezeptoren [48, 153, 129].

Dadurch können Untersuchungen am intakten Organismus gezielt vorgenommen werden, denn:

- Der Ligand CNO bindet nicht an anderen Rezeptortypen. Nur der für den genetisch modifizierten Organismus gewählte DREADD wird aktiviert.
- Durch die Auswahl des die Expression steuernden Promotors kann die Untersuchung im Tiermodell auf den Gewebetyp von Interesse beschränkt werden (z. B. Herzmuskelzellen).
- Interaktion mit anderen Signalkaskaden kann mit Einschränkungen (siehe unten) ausgeschlossen werden. Es kann gezielt das Protein von Interesse (z. B. das G_q -Heterotrimer) aktiviert werden.

Diese Vorteile sind nicht exklusiv für chemogenetische Strategien. Eine weitere etablierte Methode vereint ähnliche Eigenschaften: Optogenetische Technologien kombinieren lichtempfindliche Kanäle (Opsine) mit Elementen von GPCRs. Die intakten lichtempfindlichen Domänen des Hybridproteins an der Zellaußenseite können mit Licht der richtigen Wellenlänge stimuliert werden und auf intrazellulärer Seite das G-Protein von Interesse aktivieren [79]. Auch diese Methode erlaubt eine zeitlich und räumlich spezifische Aktivierung G-Protein koppelnder Rezeptoren. Hinsichtlich zeitlicher Steuerung bringen optogenetische Methoden Vorteile gegenüber der DREADD-Technologie. Während bei letzterer die Rezeptor-Liganden-Bindung, bedingt durch die Applikationsroute (mindestens Injektion) verzögert ist, können optogenetische Rezeptoren unmittelbar durch Lichtimpuls aktiviert werden [10, 97, 64]. Außerdem verbleibt CNO lange im Körper [48], bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion mindestens 60 Minuten [129]. Optogenetische Rezeptoren werden hingegen sofort deaktiviert, sobald der Lichtimpuls beendet ist. Zusätzlich können die Experimente problemlos wiederholt werden. In eigenen Experimenten war eine erneute Untersuchung mit DREADD-Mäusen am selben Tier aufgrund der 100% Sterblichkeit (respektive Euthanasie aus Tierschutzgründen) allerdings hinfällig. Eine mögliche Rezeptordesensibilisierung für seinen Liganden wird kontrovers diskutiert, wird aber mit den neueren Generationen von DREADDs immer häufiger ausgeschlossen [154, 129]. Im Menschen, einigen Primaten und im Meerschweinchen findet im geringen Grade eine Umwandlung in das antipsychotisch wirksame Clozapin statt [165]. CNO galt lange Zeit als im Mäuse- und Rattenorganismus inert [48], bis 2018 Manvich und Kollegen in beiden Arten eine Rückkonversion in Clozapin belegen konnten. In entsprechenden Substitutionstest trainierter Mäuse und Ratten konnten sie zeigen, dass die Gabe von CNO einen clozapinähnlichen, interozeptiven Konditionierungsstimulus erzeugen kann. Die Autoren schlagen daher vor, bei der Anwendung von DREADD-Technologien neben Kontrolltieren auch Kontrollinjektionen mit der Trägersubstanz von CNO durchzuführen [99]. Jendryka *et al.* empfehlen nach ihrer Pharmakokinetik- und Verhaltensstudie ebenfalls ein ähnliches Vorgehen um unspezifische Effekte auszuschließen, wiesen auf den CNO-dosisabhängigen neuromodulativen Effekt bei Mäusen und Ratten hin, heben aber den Positivnutzen von CNO als gezielter DREADD-Ligand hervor [67]. Die Konversion von CNO zu Clozapin ist vor allem für Neurowissenschaften bedeutsam und limitiert einen möglichen therapeutischen Einsatz CNO-aktivierbarer chemogenetischer Rezeptoren. Eine Besetzung von endogenen Neurorezeptoren und Veränderung endogener Neurometabolite durch den Einsatz von CNO konnte etwa bei Ratten nachgewiesen werden [6]. Ein CNO-freier Ansatz hin zu Alternativen könnte ein machbarer Ausweg aus dieser Problematik sein und ist Gegenstand aktueller Neuro- und Chemogenetikforschung [153].

Andere Eigenschaften hingegen zeichnen DREADDs gegenüber optogenetischen Werkzeugen aus. Lediglich einzelne Punktmutationen waren nötig und gaben ein klassisches Aktivierungsmuster durch Rezeptor-Liganden-Bindung [160]. Optogenetische Rezeptoren werden durch Lichtimpulse vergleichsweise künstlich angesprochen [129]. Der größte Vorteil der DREADD-basierten gegenüber optogenetischen Methoden liegt in der nahezu nicht invasiven Aktivierung. Die Applikation des Aktivators CNO geschieht durch Injektion oder ist, je nach Anwendungs-

gebiet, auch oral möglich [161]. Optogenetische Rezeptoren müssen hingegen nahe an die aktivierende Lichtquelle mit genügend großer Intensität gebracht werden. Bei Untersuchungen am Herzen bedeutet dies die Eröffnung des Brustkorbes, welche eine Allgemeinanästhesie und entsprechend schmerzausschaltenden und damit pharmakologisch relevante Eingriffe erfordert. Alternativ können Lichtleiter implantiert werden [119].

Die Anwendung optogenetischer und chemogenetischer Werkzeuge stellen die Methoden der Wahl dar, um GPCR gezielt zu aktivieren und von subzellulärer Ebene bis hin zum Gesamtorganismus zu untersuchen. Welcher Technologie der Vorzug zu geben ist oder ob im konkreten Fall sogar eine parallele Anwendung vorteilhaft wäre, hängt von der jeweiligen Fragestellung und den jeweiligen Gegebenheiten ab. Um die Bedeutung G_q -Protein koppelnder Signalwege im Herzen zu erforschen, insbesondere hinsichtlich ihres Einflusses auf die kardiale elektrische Tätigkeit, wurde in dieser Arbeit der Ansatz mittels DREADD-Technologie gewählt. So konnten komplikationslos Beobachtungen am frei beweglichen Tier durchgeführt werden. Eine ultraschnelle Kinetik ist für die grundlegende Untersuchung der gefragten Mechanismen an Herzmuskelzellen nicht von vorrangiger Bedeutung. Dabei wurde der Injektion der Vorzug gegenüber einer oralen Applikation des synthetischen Liganden gegeben, um eine bessere Steuerung der zeitlich gezielten Aktivierung zu ermöglichen. Nichtsdestotrotz würden zusätzliche Untersuchungen an optogenetischen Modellen die erzielten Ergebnisse unterstützen und erweitern.

Frühere Generationen chemogenetischer Rezeptoren wie die Opioidrezeptoren RASSLs zeigten *in-vivo* eine konstitutive Aktivität, initiierten also die Signalkaskade in Abwesenheit ihres zugeordneten Liganden [31]. Nahezu alle GPCR zeigen physiologischerweise basale Aktivität [143], eine Eigenschaft, die bei der zusätzlichen Einbringung eines Rezeptors allerdings unerwünscht ist [23]. Bei den auf muskarinischen Acetylcholinrezeptoren basierenden DREADDs konnte diese Eigenschaft zumindest für die auf M3-Rezeptoren basierenden und G_q -Protein koppelnden Designerrezeptoren eliminiert werden [48, 2, 66]. So untersuchte etwa die Gruppe um Jürgen Wess die mutierten Rezeptoren in transfizierten COS-7 Zellen. In An- oder Abwesenheit von Acetylcholin oder CNO bzw. von natürlichen Rezeptoren oder G_s - bzw. G_q -Protein koppelnden DREADDs wurde die intrazelluläre Konzentration von cAMP und Inositoltriphosphat gemessen. Die DREADDs bezeichneten die Autoren als R-s bzw. R-q. Sowohl R-s als auch R-q exprimierende Zellen reagierten nach Stimulation selbst mit sehr hohen Konzentrationen von Acetylcholin nicht mit einer verstärkten Bildung von cAMP bzw. Inositoltriphosphat. Dagegen war CNO am Wildtyp-Rezeptor inaktiv. CNO-Applikation führte z. B. bei R-q transfizierten Zellen zu einem Anstieg von Inositoltriphosphat, aber zu keinen Änderungen im cAMP, was seine Spezifität für G_q unterstreicht [48]. Dabei wurden Konzentrationen bis 10^{-4} M CNO untersucht. Die Bestimmung des CNO-Gehaltes in meiner Arbeit (siehe Abschnitt 5.3) ergaben bei höchsten angewendeten Injektionsmenge einen Plasmalevel im Bereich weniger 10^{-6} M, also einer Konzentration deutlich unterhalb des von Guettier *et al.* [48] analysierten Bereichs.

CNO aktivierte R-s führten in Zellkultur zu einem Anstieg von cAMP, nicht aber von Inositoltriphosphat. Basal, also in Kulturen, denen weder Acetylcholin noch CNO zugesetzt wurde,

kam es aber bei R-s transfizierten Zellen zu geringer, aber gegenüber nicht transfizierten Zellen signifikanter cAMP Bildung [48]. R-q transfizierte Zellen zeigten sich frei von Agonist-unabhängiger, basaler Aktivität (Inositoltriphosphatbildung) [48]. Daraus ergibt sich für den in meiner Arbeit verwendeten R-q, einem humanen M3-Rezeptor (hM3q) mit den typischen DREADD-Punktmutation, eine nahezu perfekte Grundvoraussetzung für die Anwendung am Ganztier.

6.3 Gewebe-spezifische Expression und subzelluläre Lokalisation des Dq Rezeptors

Um zu überprüfen, ob die neue DREADD-Mauslinie sich zur Untersuchung des G_q -Signalweges im Herzen eignet bzw. welche Limitationen sich ergeben, musste vorab die korrekte Expression und Lokalisation des Designerrezeptors untersucht werden. G_q -Protein gekoppelte Rezeptoren befinden sich, wie andere GPCRs, in der Zellmembran unterschiedlichster Zelltypen. Die membranständige Lokalisation ist für eine korrekte Signalweitergabe durch extrazelluläre Signale unerlässlich. Die Verwendung des MCK-Promotors sollte garantieren, dass die Expression auf quergestreifte Muskel, wie Herz- und Skelettmuskel, limitiert ist. So soll der G_q -Signaweg durch den synthetischen Agonisten CNO andere Zelltypen des Körpers nicht aktiviert werden können. Dies ist insofern wichtig, um bei der Erforschung am lebenden Organismus potentielle Nebeneffekte aus der Aktivierung in anderen Geweben ausschließen zu können.

Die Spezifität des MCK-Promotor-abhängigen Genexpression ist bereits beschrieben worden [151]. Dies deckt sich mit meinen Untersuchungen: Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, konnte der Designerrezeptor bei Überprüfung in diversen Organen (Lunge, Niere, Leber, Hirn, Herz, Skelettmuskel) lediglich in Herz und Skelettmuskel nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei dieser semiquantitativen Bestimmung die Expression im Skelettmuskel erwartungsgemäß stärker als im Herz. Für die nachfolgenden Untersuchungen bedeutete das, dass systemische Effekte durch die Dq-Aktivierung in der Skelettmuskulatur berücksichtigt werden müssen, während weitere Organe keine direkte Rolle spielen sollten.

Der am Rezeptor N-terminal anhängende HA-Tag kommt natürlicherweise in eukaryotischen Zellen nicht vor, für die Detektion können daher gegen den HA-Tag gerichtete Antikörper benutzt werden. Ein Vorversuch mit dem Primäantikörper (Ursprung: Maus) *HA-Epitope Tag Ab 5B1D10* (Life Technologies Europe BV, NL-Bleiswijk) war insofern nicht erfolgreich, als unspezifisch Banden im Western Blot auftauchten. Der Wechsel zu *Anti-HA high affinity* (Ursprung: Ratte) brachte im Test an Dq-exprimierenden HEK-Zellen die gewünschte Spezifität. In Proben von Herzen Dq-positiver Mäuse zeigten sich im Western Blot Banden auf der passenden Höhe (zwischen 100 und 130 kDa), die der Masse des Dq Rezeptors entsprach und die gänzlich bei Proben aus Dq-negativen Tieren fehlten. Nur Tiere mit passendem Genotyp (Dq^+) exprimieren also den Designerrezeptor. Dieser Beleg einer erfolgreichen Proteinexpression in transgenen Tieren waren kongruent mit der Detektion an Einzelzellen mittels Immunfluoreszenz durch

Prof. Peter Lipp (Abbildung 13a-e) und dem von Frau Dr. Barth-Schäuble durchgeführten mRNA-Nachweis (Abbildung 13f).

Interessanterweise zeigten sich anfangs doppelte Banden auf der doppelten Lauflänge (Daten nicht gezeigt), die sich als Dimere des Rezeptors interpretieren lassen könnten. Diese verschwanden, wenn die Proben vor der Gelelektrophorese länger in 4x NuPAGE® LDS Sample Buffer und 10x NuPAGE® Sample Reducing Agent bei 4 °C gelagert wurden. Gleichzeitig stellte die frühzeitige Reduktion und Aufbrechung der Disulfidbrücken der Proben eine wichtige Grundvoraussetzung für den Proteinnachweis im Ventrikel dar (Abbildung 14). Erste Western Blot Analysen nach vorangegangener Kryolagerung der Herzen Dq-positiver Mäuse zeigten keine Dq - Banden. Aus Proben sehr starker Expression, wie Skelettmuskel oder transfierte HEK-Zellen, gelang der Proteinnachweis auch nach langer Lagerdauer der nativen Probe bei -80 °C. Anders verhielt es sich bei Proben von Herzen. Unmittelbar nach Organentnahme aufgeschlossene und mit 4x NuPAGE® LDS *Sample Buffer* und 10x NuPAGE® *Sample Reducing Agent* versetzte Ventrikelproben Dq-positiver Tiere ermöglichte eine problemlose Detektion von Dq im Western Blot. Teile derselben Proben wurden vor Reduktion tiefgefroren (-80 °C). Bereits nach 4 Wochen Lagerung war keine Bande mehr im Western Blot sichtbar. Denkbar wäre ein Abbau des Rezeptors durch Proteasen, dem man eben durch frühzeitige Deaktivierung begegnen kann.

In dieser Arbeit wurde eingehend untersucht, dass vorangegangene Probenlagerung und -aufarbeitung bedeutsam für eine erfolgreiche Western Blot Analyse war. Eine Folge dieser Erkenntnis war, dass ein nachträglicher Proteinnachweis aus nativ gelagerten Proben nicht möglich war. Ist es für eine Fragestellung essenziell, dass ein Proteinnachweis durchgeführt werden soll, muss die Probe unmittelbar nach Organentnahme aufgearbeitet werden. So musste auch auf einen Proteinnachweis aus den Herzen jener Mäuse, denen Transmitter implantiert wurde, verzichtet werden. Hier stand die schonende Isolierung des empfindlichen Radiotelesenders im Vordergrund. Angesichts der Tatsache, dass die erfolgreiche Proteinexpression in Dq-positiven Tieren als zuverlässig betrachtet werden und eine solche Beprobung keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn zur Fragestellung gebracht hätte, konnte diese Einschränkung in Kauf genommen werden.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen interindividuelle Unterschiede anhand der Herzen einer Wildtypmaus und sechs transgenen Mäusen. Erwartungsgemäß zeigten nur Dq-positive Tiere eine Bande auf der erwarteten Höhe für Dq. Diese waren aber unterschiedlich stark ausgeprägt. Normiert auf die Ladekontrolle ergaben sich Schwankungen um bis zu 200%. Inwiefern tatsächlich interindividuelle Unterschiede bestehen, oder die Degradation von Dq unterschiedlich weit fortgeschritten war, ließ sich im Rahmen meiner Arbeit nicht klären. Sollte für zukünftige Fragestellungen eine etwaige Bedeutung des Expressionsniveau relevant werden, sollte von einer Ermittlung mittels Western Blot abgesehen werden.

Wie eingangs erwähnt, sollte Dq, wie seine endogenen Analoga, ausschließlich auf der Zellmembran exprimiert werden, wo sie ihre die Möglichkeit haben, extrazellulär CNO zu binden und das Signal intrazellulär weiter zu geben. Nur so kann die Signalkaskade initiiert und da-

mit auch untersucht werden. In einem entsprechenden Proteinnachweis (Abbildung 13) konnte ich zeigen, dass sich im Zytosol von Herzzellen kein Designerrezeptor nachweisen lässt, während Dq auf der Zellmembran, im Vergleich zur Probe mit der Gesamtheit an Zellproteinen, angereichert war.

Damit waren die Grundvoraussetzungen für weitere Experimente geschaffen: Dq befindet sich ausschließlich auf der Plasmamembran quergestreifter Muskelzellen Dq-positiver Mäuse. Weder in Wildtypmäusen, noch in anderen Organen anderer Art außer Herz und Skelettmuskel war Dq detektierbar. Eine Aktivierung im Skelettmuskel kann diverse systemische Effekte, die nicht Gegenstand der Untersuchung sind, hervorrufen. Mögliche Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System machten aber eine zusätzliche Untersuchung auch am isolierten Herzen nötig, um diese bei der Interpretation berücksichtigen und Vergleiche zu Experimenten am Gesamtorganismus ziehen zu können.

6.4 *In-vivo* Aktivierung von Dq

6.4.1 Dq-positive Mäuse haben geringgradig niedrigeres Körpergewicht als Wildtypmäuse

Vor Implantation der EKG/Blutdrucksensoren wurden die Mäuse routinemäßig gewogen. Hierbei ergab sich ein leicht geringeres mittleres Körpergewicht der Dq-positiven Tiere im Verhältnis zur Vergleichsgruppe (siehe Abbildung 18). Ich stellte mir daher die Frage, ob die reine Expression von Dq bereits systemische Auswirkungen besitzt, insbesondere auf das Herz-Kreislauf-System hat.. Hierzu wurden von Frau Dr. Laura Schröder echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Es ergaben sich hierbei keine Unterschiede in der Funktion oder Morphologie des Herzens [72]. Das telemetrisch erfasste EKG und der systemische Blutdruck waren ebenfalls unabhängig vom Genotyp in Abwesenheit von CNO (siehe Abbildungen 21 und 24). Ich schlussfolgerte daraus, dass Dq ohne seinen synthetischen Liganden keine konstitutive Aktivität aufwies, was somit Befunde aus anderen Mausmodellen bestätigte [48]. Für Dq-positive Mäuse war der genaue Locus im Genom nicht bekannt, ich vermutete daher, dass das durch die Insertion beeinflusste Gen unter Umständen für die leichte Gewichtsreduktion der Dq-positiven Tiere verantwortlich sein konnte und sah daher von der Züchtung von homozygoten Tiere ab, für meine Studien wurden ausschließlich heterozygote Männchen verwendet. Diese Situation wurde in meiner Gruppe für zukünftige Studien dahingehend verbessert, dass genetisch modifizierte Mauslinien mit einer Dq-Insertion in den ROSA26 Lokuserzeugt wurden.

6.4.2 *In-vivo* Dq Aktivierung führt dosisabhängig zum Tod

Kontrollexperimente in Dq-negativen Mäusen ergaben, dass die Injektion des synthetischen Dq-Antagonisten CNO keine messbaren Effekte auf die elektrische Aktivität des Herzens und den systemischen Blutdruck hatte. Vollkommen anders stellte sich der Sachverhalt bei Dq-positiven Tieren dar: die Startdosis von 1 mg/KGW führte in 40% der Tiere innerhalb von

16 Stunden zum Tod. Diese Dosis wurde aufgrund bereits erfolgreicher Studien mit Dq in anderen Geweben benutzt [48, 37]. Die Injektion einer zehnfach höheren Dosis führte zu einer hundertprozentigen Sterblichkeit in Dq-positiver Mäuse innerhalb von 250 Minuten. Einen Beitrag bei der Verschlechterung des Allgemeinzustandes bis hin zum Tod könnte auch die Dq-Aktivierung in der Skelettmuskulatur spielen. Obwohl die Tiere sich nicht mehr bewegten, waren keine Lähmungen oder tetanische Kontraktion zu beobachten. Sie waren bei Berührung fähig, die Körperposition zu verändern. Atembewegungen waren sichtbar. Eine funktionelle Beeinträchtigung des Zwerchfells als eigentliche Todesursache ist daher unwahrscheinlich. Die spätere Analyse der EKG-Daten (siehe Abschnitte 5.2 und 6.4.4) zeigte, dass dem Tod akute und schwerwiegende Rhythmusstörungen des Herzens vorausgingen.

6.4.3 Radiotelemetriesysteme stellen die *state-of-the-art* Methode zur Erfassung kardiovaskulärer Parameter an wachen Labortieren dar

Radiotelemetrische Messsysteme sind eine an wachen und frei beweglichen Labortieren seit über 25 Jahren etablierte und bewährte Methode zur Erfassung physiologischer Parameter wie EKG, Blutdruck, Körpertemperatur und davon ableitbarer Parameter [78, 134, 61, 39]. Kramer und Kinter [77] zählen zahlreiche Beispiele aus der Literatur auf, die zeigen, wie die implantierbare Radiotelemetrie bei Labornagern anderen Methoden hinsichtlich Qualität und Quantität der Daten, Tierschutz und Kostenkalkulation überlegen ist. Die Tiere können hierbei nach der Implantation in ihrer gewohnten Umgebung belassen werden. Da zur Messung weder eine Fixierung, noch eine Sedierung vorgenommen werden muss, kann der tatsächliche physiologische Zustand erfasst werden, frei von akutem Stressgeschehen oder durch Pharmaka hervorgerufenen Effekten. Im Vergleich zu nicht operierten Tieren kann die Einzelhaltung sozial lebender Tiere als auch die Operation selbst die Messparameter beeinflussen [141]. Dennoch gilt die Radiotelemetrie-Methode als Goldstandard zur zuverlässigen Messung des Blutdrucks bei Labortieren [80]. Eine häufig verwendete, nicht invasive Methode zur Blutdruckmessung, die *tail-cuff* Methode, verlangt Zwangsmaßnahmen oder Training der Tiere. Letzteres ist an Ratten schneller und zuverlässiger erfolgreich als bei Labormäusen. Im direkten Vergleich zu aus Telemetrie gewonnen Messwerten hatte sich gezeigt, dass der mit der *tail-cuff* Methode erfasste Blutdruck zudem unterschätzt werden kann [168].

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, das Radiotelemetrieimplantat einzusetzen: Eine Möglichkeit besteht an der Bauchaorta (Blutdruckmesskatheter) bzw. in der Bauchhöhle (Transmitterkörper). Nachteilig ist zu nennen, dass bei dieser invasiveren Methode die operative und postoperative Sterblichkeit erhöht ist [71] und sich zudem erst ab einem Körpergewicht von ≥ 27 g eignet (Herstellerangaben). Die Gewichte der Versuchstiere in meiner Arbeit lagen in der Mehrheit bei 23-25 g. Deshalb wurde für den Blutdruckmesskatheter der Zugang über die *Arteria carotis communis sinistra* (linke Halsschlagader) gewählt. Da dabei der Transmitterkörper mit der Temperatureinheit subkutan, also im Unterhautgewebe, implantiert wird, konnte bei dieser Methode die Körperkerntemperatur nicht valide gemessen werden.

Alle Tiere durften sich nach der Implantation mindestens acht Tage erholen, spätestens am zehnten Tag fand die erste Messung statt. Aus der Literatur war zu entnehmen, dass Ratten mit intraperitonealem Radiotelemetrie-Implantat etwa nach einer Woche für die Messung verwendet werden können [46]. In einer anderen Studie wurde an Mäusen die Rekonvaleszenz nach intraperitonealer Implantation zweier verschiedener Transmitter überprüft. Diese lag beim leichteren Transmitter (1,1 g) bei drei Tagen, und bei neun Tagen im Falle des schwereren Transmitters (3,5 g) [55]. Der in dieser Arbeit verwendete HD-X11 Transmitter von *Datasci International* hat ein Gewicht von 2,2 g und liegt damit etwa im Mittel der zuvor genannten Transmittertypen. Veröffentlichte Daten zum Regenerationsprozess von Mäusen zu genau diesem Transmitter nach subkutaner Implantation konnten nicht gefunden werden. Aus der Überlegung heraus, dass die subkutane Implantation weniger invasiv ist, zusammengenommen mit dem Transmittergewicht, wurde daher der eingangs erwähnte Erholungszeitraum von acht Tagen gewählt. In eigenen Beobachtungen konnte ich feststellen, dass die von mir operierten Tiere bereits wenige Stunden nach der Operation aufmerksam an der Umwelt teilgenommen, sich im Käfig und an den Käfigwänden entlang geschickt bewegt und sich arttypisch verhalten haben. Alle Vergleichsgruppen wurden standardisiert behandelt, gehalten und gemessen, sodass mögliche Effekte der Implantation minimiert waren.

Auf postoperative Analgesie und Antibiose wurde im Sinne von Tierschutz und Tiergesundheit Wert gelegt. Der Einsatz von Antibiotika kann kontrovers diskutiert werden. Unter hochsterilen Operationsbedingungen kann ein Verzicht der Antibiose erwogen werden. Das Zusammenspiel aus Größe des Operationsmikroskop, vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz abgenommener Räumlichkeiten und praktischer Umsetzbarkeit erlaubte zwar eine keimarme, aber keine keimfreie Umgebung. Etwaige Wundinfektionen hätten zum Ausschluss der Tiere oder sogar zum Tierversuch geführt, beides hätte die Anzahl der in den Versuch eingehenden Tiere vergrößert, widersprüchlich zum 3-R Prinzip: *reduce, refine, replace*. Unbemerkte Infektionen ohne augenscheinliche Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes einzelner Tiere hätten die Validität der Daten bedeutend negativer beeinflusst als der Einsatz des Wirkstoffes Enrofloxacin.

Während unter keimfreien Bedingungen der Einsatz von Antibiotika in Betracht gezogen werden könnte, ist ein adäquates Schmerzmittelregime zwingend notwendig. Die Invasivität der Methode erlaubt keinen Verzicht auf Analgesie. Die Tierschutzrelevanz einer Schmerzbehandlung bei Versuchstieren ergibt sich aus §1 sowie aus §9 Abs. 2 Satz 3 des Tierschutzgesetzes. Die pathophysiologischen Auswirkungen von Schmerzen betreffen zahlreiche Organsysteme auf zahlreiche Art. Der eingesetzte Wirkstoff Carprofen wird von der GV-SOLAS für den präventiven Einsatz bei Operationen an Labornagern empfohlen, es sei denn, die Untersuchung stünde im Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen [56]. Inflammatorische Fragestellungen waren nicht Gegenstand meiner Arbeit.

Es wurde bei allen Tieren dasselbe Antibiose- und Analgesieprotokoll verwendet. Enrofloxacin und Carprofen wurden mindestens sechs Tage vor der ersten Radiotelemetriemessung abgesetzt. Dadurch konnte ich eventuelle Effekte der postoperativen Medikation auf die Ergebnisse

einschränken.

Die Verwendung der Radiotelemetriemethode in Kombination mit einem standardisiertem Medikamentenprotokoll gestattete mir daher einen möglichst unverfälschten Blick auf Blutdruck und EKG im Mausmodell.

6.4.4 *In-vivo* Dq Aktivierung induziert aberrante elektrische Aktivität des Herzens

Das EKG von Wildtyp- und transgenen Mäusen vor CNO Gabe zeigte keinerlei Unterschiede. Nach Injektion von CNO (10 mg/kg KGW) kam es dann ausschließlich in Dq-positiven Tieren zu substantiellen, reproduzierbaren und charakteristischen Veränderungen im EKG des Herzens, die auf Störungen im Reizleitungssystem des Herzens hinwiesen. Der Grad des aberranten EKG Verhaltens nahm zeitlich bis zum Tod der Tiere zu.

AV-Blöcke ersten Grades, wie sie in den ersten Minuten aufgetreten sind, sind in der Regel benigne und funktionell bedeutungslos [88]. Diese Art von AV-Block weist darauf hin, dass zwar die Überleitungszeit von den Vorhöfen auf die Kammern verlängert ist, die unterstützende Füllfunktion ist jedoch immer noch gegeben, die Erregung von Vorhöfen und Kammern erfolgt immer noch vollständig und liegt innerhalb eines Herzzyklus.

Die folgend auftretenden AV-Blöcke zweiten Grades, Typ 1 „Wenckebach“, werden in der Regel proximal des His'sche Bündels verursacht und zählen zu den supraventrikulären Arrhythmien, können aber wie der AV-Block ersten Grades auch physiologisch bei Sportlern auftreten [88]. Parallel zu AV-Blöcken zweiten Grades trat bei den CNO-stimulierten Dq-positiven Mäuse ebenfalls eine substantielle Verbreiterung der QRS-Komplexe auf, die bei keiner anderen Versuchsgruppe zu finden war. Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben und von Boukens und Kollegen [18] eingehend erörtert, ist das Ende des QRS-Komplexes bzw. die Ausbreitungsdauer der Erregungswelle über die Ventrikel bei der Maus schwierig festzulegen: Beim EKG von Mäusen geht die negative S-Zacke nach Kreuzung des isoelektrischen Punktes in die positive J-Zacke über. Die Autoren geben eine Überschätzung der Dauer der ventrikulären Erregung an, wenn die J-Zacke in den QRS-Komplex miteingerechnet wird. Boukens und Kollegen schlagen vor, den QRS-Komplex anhand Ableitung I oder aVF zu bestimmen, da in diesen Ableitungen das Ende der S-Zacke mit dem Ende der ventrikulären Aktivierung bei Mäusen übereinstimmt. Dies war mit der Transmittertechnik schwer umzusetzen, da die beiden vorhandenen Elektroden hierzu links und rechts des Brustkorbes befestigt werden müssten. Die freie Beweglichkeit der Mäuse hätte die Häufigkeit von Störungen bei der Aufzeichnung der EKG-Daten erhöht. Ich wählte daher folgenden Ansatz: Alle Maßnahmen, von der Implantation über Messung in Ableitung II, Datenauswertung und Interpretation wurden von mir durchgeführt, um den menschlichen Einfluss hier zu minimieren. Die beiden letztgenannten Prozeduren wurden für alle Messungen gemeinsam im Block und geblindet durchgeführt. Dadurch wurden analysebedingte Schwankungen bei der QRS-Komplex-Bestimmung auf ein Minimum reduziert und somit vergleichbar gemacht. Dies erlaubte eine sehr gute Vergleichbarkeit aller Gruppen innerhalb meiner Arbeit.

Die Dauer der so bestimmten QRS-Komplexe waren nur in den Dq-positiven Mäusen nach CNO-Applikation beinahe doppelt so lange wie in allen anderen Mausgruppen (Abbildung 22b). Ich interpretierte diese Befunde als gestörte Reizausbreitung in den Ventrikeln, möglicherweise zurückzuführen auf eine aberrante Funktion der Purkinjefasern als primärer Bestandteil des ventrikulären Reizleitungssystems. Aktivierung von G_q -gekoppelten Signalwegen modulieren somit – zumindest in der Maus – die ventrikuläre Reizausbreitung im Ventrikel.

Der Umstand, dass De- und Repolarisationsphase der Ventrikel einer Maus am EKG ineinander übergehen, erschwert auch die Festlegung des QT-Intervalls. Hinzu kommt die geringe Amplitude der T-Welle und ihr flaches Auslaufen zur isoelektrische Linie. Auch hier habe ich nach dem Prinzip „Ein Operateur, ein Analyst, ein Block“ gearbeitet, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Die so durchgeführte Analyse ergab eine CNO-abhängige signifikante Zunahme des QT Intervalls ausschließlich in Dq-positiven Mäusen.

Da das QT-Intervall-Länge mit steigender Herzrate kürzer wird, [103, 18] wird der rohe QT-Wert zur Herzrate in Relation gesetzt: $QTc = \frac{QT[ms]}{\sqrt{RR[s]}}$ [9]. Mitchell [103] schlug vor, die nach Bazett benannte Formel für Mäuse anzupassen: $QTc = \frac{QT}{\sqrt{\frac{RR}{100}}}$. Ich habe diese Formel in meiner Arbeit verwendet. Andere Studien zeigen dahingegen, dass der Zusammenhang des QT-Intervalls und Herzrate bei Mäusen geringer ist und eine Korrektur entfallen kann [130]. QTc als Maß der gesamten ventrikulären elektrischen Aktivität war nur bei Dq-positiven Mäusen nach CNO-Gabe signifikant verlängert. Unter Berücksichtigung der Überlagerung von De- und Repolarisation im murinen EKG [16, 142] gehe ich davon aus, dass neben der Reizausbreitung auch die Erregungsrückbildung der Ventrikel dieser Mäuse beeinträchtigt ist.

Nur Dq-positive Tiere verstarben innerhalb weniger Stunden nach Applikation von 10 mg/kg KGW CNO. Dem Herzstillstand gingen immer längerdauernde, sich wiederholende Episoden ventrikulärer Tachykardien voraus (siehe Abbildung 21d). Der Todeszeitpunkt wurde mit Erreichen der elektrischen Asystolie festgehalten.

Zusammenfassend konnte ich feststellen, dass die intraperitoneale Applikation von CNO nur bei Dq-positiven Mäusen hochgradige Arrhythmien auslösten, die für die höhere Dosis immer mit multiplen Perioden ventrikulärer Tachykardie endeten, in denen eine koordinierte Pumpleistung des Herzens unmöglich war. Die resultierende Ischämie schädigte möglicherweise hierfür besonders empfindliche Organe wie Herz und Gehirn und führte so letztendlich zu Kreislaufstillstand und Tod.

6.4.5 Dq Aktivierung beeinträchtigt den systemischen Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde *in-vivo* an freilaufenden Mäusen invasiv am Aortenbogen gemessen. Während der Experimente kam es grundsätzlich zu Anstieg des Blutdruckes. So stellte ich einen injektionsbedingten milden und kurzfristigen Hypertonus bei allen Gruppen fest, während ausschließlich die Dq-positiven Tiere nach CNO Administration einen signifikant höheren MAP als alle anderen Gruppen hatten, der allerdings innerhalb von ma-

ximal 10 Minuten wieder auf moderate Werte abfiel. Aufgrund der spezifischen Expression von Dq in quergestreiften Muskeln kann ich eine Änderung der Nachlast durch Vasokonstriktion ausschließen. Ob und inwieweit allerdings eine mögliche Tonusänderung in Skelettmuskeln einen Beitrag zum Hypertonbus hatte, bleibt für mich vorerst spekulativ. Ein deutlich positiv inotroper Effekt konnte allerdings in isolierten Ventrikelzellen von Dq-positiven Mäusen in Einzelzellexperimenten nachgewiesen werden [72]. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass zumindest ein Teil des gemessenen Blutdruckanstiegs durch eine inotrope Antwort des Herzens selber beigetragen wurde. Abschließend kann diese Frage besser in einem Mausmodell mit Herz-spezifischer Dq-Expression beantwortet werden.

6.5 Störungen der elektrophysiologischen Tätigkeit lassen sich am isolierten Herzen reproduzieren

Um mögliche Beiträge der Skelettmuskel-Expression oder zusätzlicher undetektierter Expression von Dq in anderen Geweben und Organen und ihren möglichen Beitrag auf meine Ergebnisse besser beurteilen zu können, habe ich den Ansatz des isolierten Organs gewählt, der eine sehr gute Kontrolle der experimentellen Bedingungen erlaubte. Dieses Verfahren trägt wesentlich dazu bei, Grundprinzipien der Herzphysiologie zu erforschen [146, 11], etwa wenn wie in diesem Fall die pathophysiologischen Auswirkung einer intrazellulären Signalkaskade im Zentrum des Interesses steht. Die Spezifität des MCK-Promotors beschränkte die Expression des Dq Rezeptors auf quergestreifte Muskelzellen [151], während die ursprünglichen Rezeptoren (muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren) ubiquitär vorkommen [163]. Durch die Untersuchung am isolierten Herzen konnte vor allem der mögliche Beitrag einer Dq-Aktivierung im Skelettmuskel ausgeschlossen werden. Auch der mögliche Beitrag von psychogenen CNO-Effekten, die kürzlich beschrieben wurden, konnte so ausgeschlossen werden [67]. Nichtsdestotrotz sollte hier beachtet werden, dass ein denerviertes Herz außerhalb seiner physiologischen Umgebung analysiert wurde [146]. Blut wurde zudem durch eine einfachere Salzlösung ersetzt und die Perfusion erfolgte retrograd. Der Vorteil der von mir angewandten, modifizierten Langendorff Technik, in seiner Urversion beschrieben von Oscar Langendorff [84], liegt darin, dass ich das Herz funktionell unter Ausschaltung der systemischen Faktoren untersuchen und die Ergebnisse zusammen mit den *in-vivo*- und Einzelzell-Ergebnissen interpretieren konnte.

Wie meine Ergebnisse eindeutig gezeigt haben, kam es ausschließlich in Herzen von Dq-positiven Mäusen nach CNO Applikation innerhalb von wenigen Minuten zu substanzieller Modulation der elektrischen Charakteristik des Herzens. Hierzu gehörten auch Schlüsselergebnisse aus den *in-vivo* Versuchen, wie eine Verlängerung der Erregungs-Überleitung vom Vorhof in die Ventrikel, der am isolierten Organ als PQ-Strecke oder -intervall quantifiziert wurde und auch die massive Verbreiterung des QRS war deutlich zu erfassen. Letzterer Befund deutete, wie auch schon die *in-vivo* Experiment, auf eine gestörte Ausbreitung der Erregung im Ventrikel hin. Um die CNO Stimulation in diesen *ex-vivo* Experimenten möglichst ähnlich der *in-vivo* Situation zu machen, hatte ich eine ähnliche CNO Konzentration gewählt, wie sie vorher im

Blutplasma der Mäuse nach *in-vivo* Injektion von 10 mg/kg KGW CNO bestimmt wurde.

Gerade durch die hochkontrollierten Bedingungen der modifizierten Langendorff-Methodik und der auch daraus resultierenden störungsarmen Datenerfassung konnte ich diesen Effekt mithilfe eines von Dr. Qinghai Tian in *Matlab* geschriebenen Algorithmus sehr eindrücklich graphisch darstellen. Mathematisch wurde die zeitliche Position des QRS Komplexes fixiert und so entfernte sich die P-Welle scheinbar immer weiter vom zunehmend verformten und verbreiterten QRS-Komplex. Parallel dazu kam es ebenfalls in der *ex-vivo* Situation zu der *in-vivo* beobachteten Deformation des QRS Komplexes. Aus diesen Befunden ergaben sich daher unterstützende Hinweise, dass die schweren Störungen der Reizleitung im Herzen durch die Dq Aktivierung im Herzen entstanden sind und diese weitestgehend unabhängig von systemischen Effekten geschah. Nichtsdestotrotz bleiben abschließende Untersuchungen besseren Mausmodellen mit Herz-spezifischer Dq-Expression vorbehalten.

6.5.1 Einfluss der Readaptationphase auf die Stimulierbarkeit der Dq-gekoppelten Antwort des isolierten Herzens

In diesem Kapitel möchte ich über einen interessanten und nicht verstandenen Befund in Zusammenhang mit den Experimenten in den isolierten Herzen diskutieren. Klassischerweise lässt man ein isoliertes Herz in der externen Perfusion einige Minuten adaptieren. Nach der Organentnahme wird das Herz auf Eis gelagert bis es an die Perfusion mit Tyrode oder einer vergleichbaren Lösung verbunden werden kann. Die Lagerung in eiskalter kalziumfreier Tyrode erniedrigt den Energieverbrauch und verhindert ischämische Schäden. Bei der Reperfusion wird nicht nur erst das restliche Blut aus dem Herzen gespült, es kommt auch zur Readaptierung an die neuen Bedingungen und zur Wiederaufnahme der spontanen kontraktiven Tätigkeit. In einer ersten Versuchsreihe wurde den isolierten Herzen eine besonders lange Readaptionszeit gewährt (>10 Minuten). Interessanterweise hatte allerdings nach dieser Phase CNO seine Wirkung (s.o.) verloren. Das Protokoll hatte ich adaptiert, ehe ich auf mögliche Ursachen für diesen Befund eingehen konnte.

Die Readaptationszeit wurde auf die Zeit reduziert, bis sie stabil kontrahierten (für mindestens 30 Sekunden) und die EKG-Elektroden positioniert waren. Außerdem musste die Zeit für die Laufstrecke von der Blasenfalle bis zum Herzen - der Wechsel auf die Testlösungen geschah am Dreivegehahn vor der Blasenfalle (siehe Abbildung 12) - noch abgewartet werden. Die tatsächliche Perfusion mit der entsprechenden Testlösung ergab rechnerisch aus dem Volumen in den Schlauchsystemen und dem gemessenen Perfusionsfluss. Es dauerte zwischen 2-5 Minuten, bis die echte Perfusion mit der Testlösung erfolgte.

Die dritte Protokollvariante, das Herz direkt mit der CNO-haltigen Testlösung zu perfundieren, hatte ich nach einzelnen Probemessungen wieder verworfen. Der Nachteil lag in der fehlenden Kontrolle auf funktionelle Schäden am Herz unabhängig von der Dq-Aktivierung.

Die Beobachtungen am isolierten Herz ergaben, dass pathophysiologische Effekte geringgradiger waren, wenn das Herz über einen längeren Zeitraum (10-15 Minuten) nur CNO-frei

perfundiert wurde, ehe der synthetische Ligand eingesetzt wurde. Im Western Blot fiel auf, dass der Proteinnachweis umso schwieriger war, je länger die Organentnahme zurücklag (siehe Abschnitt 6.3). Denkbar wäre daher, dass Dq *ex-vivo* sehr schnell degradiert.

6.6 Möglichkeiten der optischen Messung von ventrikulären Aktionspotentialen als Alternative zur Patch Clamp Technik

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von Ventrikelzellen durch Dq Aktivierung untersucht. Hierbei habe ich durch Vergleich von adulten und neonatalen Ventrikelzellen intendiert, ontogenetisch bedingte Aktionspotentialänderungen nach Dq Aktivierung zu analysieren. Für diese Studien wählte ich die nicht invasive optische Messmethode mithilfe von kleinen organischen Molekülen [70, 149]. Im Vergleich zur Messung mittels der Patch Clamp Technik können darüber hinaus im selben Zeitraum eine größere Anzahl von Zellen gemessen werden, was insbesondere auch hinsichtlich der verkürzten Messzeiten bei primären adulten Kardiomyozyten bedeutsam ist. Der Vorteil des von mir gewählten Farbstoffes di-8-ANEPPS gegenüber anderen spannungssensitiven Farbstoffen liegt in seiner Eigenschaft, über einen längeren Zeitraum membranständig zu bleiben, ohne in die Zelle einzudringen und in seiner sehr schnellen Kinetik [63, 149]. Zudem ist di-8-ANEPPS stabiler als das weniger lipophile di-4-ANEPPS und bietet sich besonders für Einzellmessungen an [38]. Für die Isolation neonataler, muriner Ventrikelzellen habe ich ein für neonatale Ratten-Ventrikelzellen etabliertes Protokoll adaptiert [149]. Durch Verwendung einer anderen Collagenase (CLS-2, Worthington, Cellsystems GmbH, D-Troisdorf) und Reduktion der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 400 g behielten die neonatalen Ventrikelzellen ihre Fähigkeit spontan zu kontrahieren. Anstatt *F10 complete medium* wurde L-Glutamin- und HEPES-haltiges DMEM als Basis verwendet. Für adulte, ventrikuläre Kardiomyozyten der Maus war ein Isolationsprotokoll in unserem Labor etabliert [123, 120], welches im Rahmen meiner Arbeit unverändert angewendet wurde.

In der Studie von Tian *et al.* [149] wurde für die Superfusion neonataler Ratten-Ventrikelzellen kalziumhaltige Tyrode verwendet und die Zellen vor der optischen Messung 10 Minuten lang mit 10 μM di-8-ANEPPS inkubiert. In meiner Arbeit an neonatalen Maus-Ventrikelzellen waren die Zellen unter diesen Bedingungen trotz Stimulation nicht mehr elektrisch erregbar, d.h. ich konnte keine Aktionspotentiale auslösen. Erst die Verwendung von modifizierter HBBS (siehe Abschnitt 4.3) und die Reduktion der di-8-ANEPPS-Konzentration auf 5 μM bei Einhaltung einer Inkubationsdauer von 15 Minuten erlaubte es mir, die Zellen erfolgreich zu stimulieren und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Signifikante Unterschiede waren allerdings zwischen Dq positiven Zellen und Wildtypzellen unter Einfluss von CNO nicht zu finden.

Die augenscheinlichsten Unterschiede von HBBS zu Tyrode liegen in der Änderung des Puffersystems hin zu den auch physiologisch im Körper vorkommenden Bikarbonat- und Phosphatpuffern, als auch durch den Zusatz von Natriumpyruvat, welches als Antioxidans die zytotoxischen Effekte von di-8-ANEPPS [128, 52] zu reduzieren half. Natriumpyruvat wird als

besonders starkes Antioxidans [75] etwa in der Reproduktionsmedizin beschrieben [107]. Intrazelluläres Pyruvat kann potentiell in die Kalzium - Homöostase eingreifen. Natriumpyruvat verhindert z. B. die schnelle Inaktivierung von CRAC (*Calcium release activated channel*) Kanälen in RBL-1 Zellen (*rat basophilic leucaemia cells*) [7]. In meiner Versuchsanordnung hat der Einsatz von Natriumpyruvat die Vitalität der Zellen verbessert, womöglich aber den Kalziumhaushalt beeinflusst. Der Mechanismus des Natriumpyruvat wurde von mir im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Die empfindlicheren Ventrikelzellen adulter Mäuse benötigten eine weitere Adaption des Messprotokolls. Ich reduzierte die di-8-ANEPPS Konzentration auf 1 μ M. Eine weitere Reduktion führte zu einer insuffizienten Färbung, sodass die Farbstofffluoreszenz im Hintergrund nicht mehr zu detektieren war. Reproduzierbare Aktionspotentiale nach Stimulation (1 Hz) konnten erst nach Absenkung der experimentellen Temperatur auf Raumtemperatur (20 - 22 °C) ausgelöst und gemessen werden. Hierbei zeigte sich dann allerdings, dass, im Gegensatz zur Abwesenheit von CNO-Effekten in neonatalen Zellen, die Aktionspotentiale von adulten Dq-positiven Myozyten nach CNO-Gabe signifikant länger waren. Die sich hierbei nun ergebene interessante Frage, ob dies nun eine Folge ontogenetischer Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Myozyten ist, konnte ich aufgrund der grundsätzlich unterschiedlichen Messbedingungen wie Farbstoffbeladung und Temperatur allerdings nicht beantworten.

Die Methode der Messung des Aktionspotentials mittels di-8-ANEPPS ist durch seine Zytotoxizität limitiert [52, 149]. Dies zeigte sich in meiner Arbeit unter anderem durch die Notwendigkeit, die Konzentration bis an die Grenze der Messbarkeit zu reduzieren, um die Myozyten elektrisch stimulieren zu können. Zudem musste bei adulten Ventrikelzellen die experimentelle Temperatur auf unphysiologisch geringe Werte reduziert werden. Die Körperkerntemperatur von Labormäusen liegt bei 38 - 39,5 °C. Die experimentelle Temperatur beeinflusst unter anderem das elektrophysiologische Verhalten von Myozyten. Beispiele hierfür sind die Abnahme einwärts gerichteter Kaliumströme bei Temperaturabfall [104] oder die Regulierung von L-Typ Kalziumkanälen [171].

Frau Dr. Wenyng Xian aus meinem Institut führte als Alternative zu den optischen Verfahren die Charakterisierung der Aktionspotentiale mittels *Patch Clamp* Technik (*whole-cell approach*) bei 34 °C durch. Bei diesen Messungen wurden keine signifikanten Modulationen der Aktionspotenziale gefunden. APD30, APD70 und repräsentative Aktionspotentiale sind Abbildung 32 zu entnehmen.

Warum die verschiedenen Messansätze zu so diametral unterschiedlichen Ergebnissen führte, lässt sich grundlegend nicht erklären, bedürfen daher noch weiteren Studienansätzen.

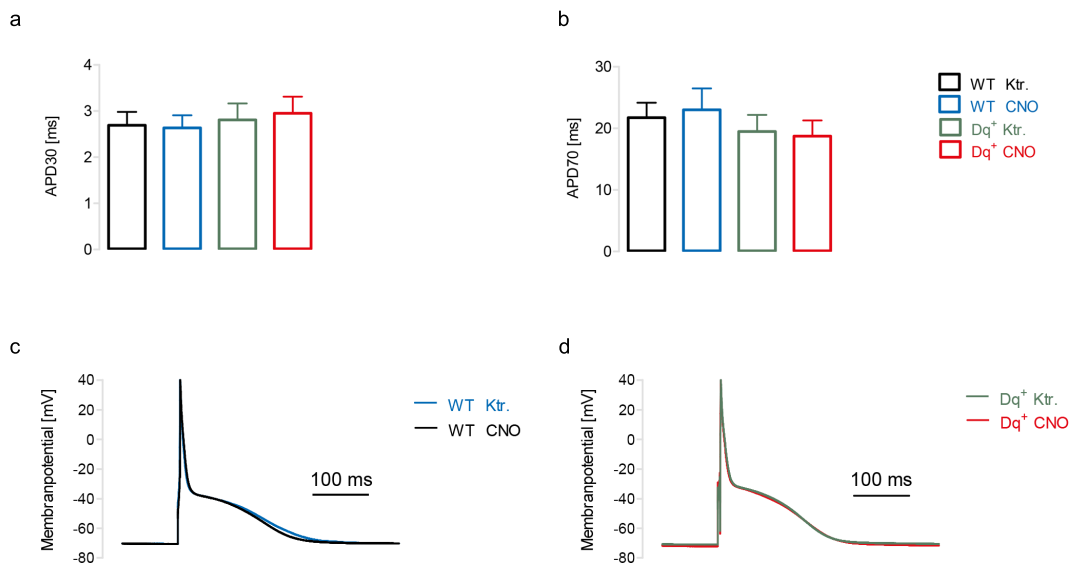


Abbildung 32: Mittels *Patch Clamp* gemessene Aktionspotentiale adulter Ventrikelzellen unterschieden sich weder in An- oder Abwesenheit von CNO signifikant voneinander, unabhängig vom Genotyp ($n =$ je 22 Zellen von 3 Mäusen). (a) APD30; (b) APD70, Balken zeigen den Mittelwert mit Standardfehler; typische Aktionspotentiale von Wildtyp (c) bzw. Dq-positiven (d) Kardiomyozyten. Die Abbildung wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Wenying Xian zur Verfügung gestellt, und die in modifizierter Form in Kaiser *et al.* publiziert [72].

6.7 Mögliche Ursachen der veränderten Elektrophysiologie des Herzens nach Dq Aktivierung

Eine Aktivierung des Dq Rezeptors durch CNO Gabe veränderte sowohl *in-vivo* als auch *ex-vivo* die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens substantziell, während sich mögliche Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften zumindest von Ventrikelmyozyten, wie oben dargestellt, nicht eindeutig nachweisen ließen. In Kaiser *et al.* [72] konnte allerdings gezeigt werden, dass der Kalziumhaushalt sowohl von ventrikulären wie auch atrialen Myozyten nach CNO Gabe in Dq-positiven Tieren signifikant moduliert wurde. Desweiteren wurde gefunden, dass das Dq Protein mit dem dominanten kardialen Connexin Cx43 in immunzytochemischen Untersuchungen kolokalisierte. Connexin 43 (Cx43) sind *gap junctions* bildende Transmembranproteine im Glanzstreifen, die an der Fortleitung des Aktionspotentials zwischen Myozyten beteiligt sind [47, 82]. In *in-vivo* Versuchen konnten wir zeigen, dass CNO-vermittelte Dq Aktivierung zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung von Cx43 an Position S368 festgestellt werden. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure ist in der Literatur als PKC-abhängig beschrieben [82]. Es muss hier angemerkt werden, dass die Aktivierung von PKCs eine klassische Folge der Stimulation von G_q -abhängigen Signalwegen ist [150]. Für die Cx43 Phosphorylierung an dieser Position sind bereits funktionelle Konsequenzen für ihre Ionenleitfähigkeiten beschrieben worden [112, 83, 139]. Wir postulierten daher, dass die Dq vermittelte Stimulation des G_q -Signalweges zu einer reduzierten Zell-zu-Zell-Kommunikation bzw. Reizleitweiterleitung führt [72]. Dies wäre mechanistisch für die aberranten EKGs Dq-positiver Mäuse nach CNO-Gabe in meinen *in-vivo* und *ex-vivo* Untersuchungen verantwortlich.

6.8 Schlussfolgerung/Ausblick

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich die DREADD vermittelte Aktivierung des G_q Signalweges und seine Folgen auf die Herzfunktion anhand eines neuen Mausmodells untersucht. Diese Aktivierung veränderte binnen weniger Minuten die Reizgeneration wie auch -weiterleitung im Herzen und führte bei einer Dosis von 10 mg CNO/kg KGW zu 100% Mortalität infolge ventrikulärer Tachykardie. Unter Ausschluss systemischer Effekte konnte ich Störungen der kardialen Reizleitung, wie ich sie im EKG festgestellt habe, auch *ex-vivo* am isolierten Herz reproduzieren.

In Einzelzellversuchen konnte ich eine Verlängerung des Aktionspotentials an adulten, nicht aber an neonatalen Ventrikelkardiomyozyten mittels optischer Messung durch einen ratiometrischen, spannungssensitiven Farbstoff beobachten. Diese Veränderung konnte in mittels *Patch Clamp* Methodik untersuchten Aktionspotentialmessungen in unserem Labor nicht bestätigt werden [72]. *Patch Clamp* gilt als methodischer Goldstandard, während ich für die optische Messung des Aktionspotentials Modifikationen vornehmen musste. Ich nehme an, dass der beobachtete Effekt der optischen Messung weniger eine D_q -vermittelte Änderung, sondern durch die Grenzen der Methode bedingt ist. In weiterführenden Studien in meiner Arbeitsgruppe konnte die Kolo-kalisation von D_q und Connexin 43 sowie auch eine D_q -abhängige Phosphorylierung von Connexin 43 gezeigt werden, was zumindest eine von der D_q Aktivierung ausgehende Beeinflussung der Reizweiterleitung und somit die dramatischen kardialen Arrhythmien erklären würde [72].

DREADDs eignen sich hervorragend, um G-Protein induzierte intrazelluläre Signalwege vor allem *in-vivo* zu untersuchen und viele der Forschungshindernisse zu überwinden, fanden aber bis dato ihr Haupteinsatzgebiet in den Neurowissenschaften. DREADDs erlauben eine möglichst physiologische und störungsfreie Nachbildung einer physiologischen Aktivierung von G-Protein abhängigen Signalwegen durch Liganden-Rezeptor Interaktion. Eine Basisaktivität des zusätzlich eingebrachten Rezeptors bleibt aus [48]. Dies deckt sich auch mit meinen Untersuchungen: die EKG-Ableitungen frei laufender Mäuse und isolierter Herzen von D_q -positiven Tieren und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern waren vor CNO-Applikation identisch. Allerdings hat dieses Mausmodell, das erstmals die DREADD-basierte Untersuchung von GPCRs im Herzen erlaubte, auch seine Grenzen. Der Rezeptor wird hierbei in allen quergestreiften Muskelzellen der Maus exprimiert, also neben dem Herzen auch in der Skelettmuskulatur. Effekte einer D_q -Aktivierung in der Skelettmuskulatur auf die *in-vivo* erzielten Ergebnisse muss daher auch im Zusammenhang mit dem Herzen unbedingt verifiziert und unter Umständen berücksichtigt werden. Außerdem zeigten D_q -positive Mäuse ein leicht geringeres mittleres Körpergewicht als ihre Wurfgeschwister, dessen Ursache weder bekannt war noch in meinen Studien untersucht wurde. Zukünftige Untersuchungen, auch um die genauen, molekularbiologischen Mechanismen zu erforschen, sollten daher auf ein Cre-Rekombinase abhängiges Expressionssystem zurückgreifen. Dieses würde es erlauben, das Gen des DREADDs z.B. im ROSA26 zu platzieren [173]. Die gewebespezifische, zeitlich kontrollierte Expression würde dann durch die Verpaarung solcher

Mäuse mit entsprechenden Cre-Rekombinase Treiber Mauslinien erlauben, in denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle entsprechend Gewebe-spezifischer Promotoren erfolgt. Die schlussendlich zeitliche Aktivierung der Expression erfolgt in solchen transgenen Mausmodellen durch die Injektion des Cre-Aktivators Tamoxifen.

7 Literatur

- [1] Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998) Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 280(5363):574–577
- [2] Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicoletti MA, *et al.* (2009) Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63(1):27–39
- [3] Anderson R, Mori S, Spicer D, Sanchez-Quintana D, Jensen B (2018) The Anatomy, Development, and Evolution of the Atrioventricular Conduction Axis. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 5(3):44
- [4] Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(12):5163–5168
- [5] Baatz G (2002) EKG bei Hund und Katz. Anfertigung, Auswertung, Interpretation. Schattauer GmbH
- [6] Bærentzen S, Casado-Sainz A, Lange D, Shalgunov V, Tejada IM, Xiong M, L'Estrade ET, Edgar FG, Lee H, Herth MM, *et al.* (2019) The chemogenetic receptor ligand clozapine N-oxide induces in vivo neuroreceptor occupancy and reduces striatal glutamate levels. *Frontiers in Neuroscience* 13:187
- [7] Bakowski D, Parekh AB (2007) Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Current Biology* 17(12):1076–1081
- [8] Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA (2003) Dual inhibition of β -adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor–receptor interaction in vivo. *Circulation* 108(13):1611–1618
- [9] Bazett HC (1920) An analysis of the time relations of electrocardiograms. *Heart* 7:353–370
- [10] Beiert T, Bruegmann T, Sasse P (2014) Optogenetic activation of Gq signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 102(3):507–516
- [11] Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50(6):940–950
- [12] Bers DM (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415(6868):198
- [13] Boender AJ, de Jong JW, Boekhoudt L, Luijendijk MC, van der Plasse G, Adan RA (2014) Combined use of the canine adenovirus-2 and DREADD-technology to activate specific neural pathways in vivo. *PloS One* 9(4):e95392

- [14] Bokil NJ, Baisden JM, Radford DJ, Summers KM (2010) Molecular genetics of long QT syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism* 101(1):1–8
- [15] Bosch NA, Cimini J, Walkey AJ (2018) Atrial fibrillation in the ICU. *Chest* 154(6):1424–1434
- [16] Boukens BJ, Hoogendijk MG, Verkerk AO, Linnenbank A, van Dam P, Remme CA, Fiolet JW, Opthof T, Christoffels VM, Coronel R (2012) Early repolarization in mice causes overestimation of ventricular activation time by the QRS duration. *Cardiovascular Research* 97(1):182–191
- [17] Boukens BJ, Kristensen DL, Filogonio R, Carreira LB, Sartori MR, Abe AS, Currie S, Joyce W, Conner J, Opthof T, *et al.* (2018) The electrocardiogram of vertebrates: Evolutionary changes from ectothermy to endothermy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*
- [18] Boukens BJ, Rivaud MR, Rentschler S, Coronel R (2014) Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of *Mus musculus*'. *The Journal of Physiology* 592(21):4613–4626
- [19] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2):248–254
- [20] Capote LA, Perez RM, Lympelopoulou A (2015) GPCR signaling and cardiac function. *European Journal of Pharmacology* 763:143–148
- [21] Cervantes D, Crosby C, Xiang Y (2010) Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circulation Research* 106(1):79–88
- [22] Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, *et al.* (2009) Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119(12):1562–1575
- [23] Conklin BR, Hsiao EC, Claeysen S, Dumuis A, Srinivasan S, Forsayeth JR, Guettier JM, Chang W, Pei Y, McCarthy KD, *et al.* (2008) Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nature Methods* 5(8):673
- [24] Coward P, Wada HG, Falk MS, Chan SD, Meng F, Akil H, Conklin BR (1998) Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(1):352–357
- [25] Cullingford TE, Markou T, Fuller SJ, Giraldo A, Pikkarainen S, Zoumpoulidou G, Alsafi A, Ekere C, Kemp TJ, Dennis JL, *et al.* (2008) Temporal regulation of expression of immediate early and second phase transcripts by endothelin-1 in cardiomyocytes. *Genome Biology* 9(2):R32

- [26] Cunningham JG, Klein BG (2013) Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. Saunders W.B, fifth edition, Elsevier/Saunders
- [27] D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW (1997) Transgenic $G\alpha_q$ overexpression induces cardiac contractile failure in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 94(15):8121–8126
- [28] DeGeorge Jr BR, Gao E, Boucher M, Vinge LE, Martini JS, Raake PW, Chuprun JK, Harris DM, Kim GW, Soltys S, *et al.* (2008) Targeted inhibition of cardiomyocyte Gi signaling enhances susceptibility to apoptotic cell death in response to ischemic stress. Circulation 117(11):1378–1387
- [29] Desai AD, Yaw TS, Yamazaki T, Kaykha A, Chun S, Froelicher VF (2006) Prognostic significance of quantitative QRS duration. The American Journal of Medicine 119(7):600–606
- [30] Dhein S, Van Koppen CJ, Brodde OE (2001) Muscarinic receptors in the mammalian heart. Pharmacological Research 44(3):161–182
- [31] Dong S, Rogan SC, Roth BL (2010) Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs. Nature Protocols 5(3):561
- [32] Dorn GW (2005) Physiologic Growth and Pathologic Genes in Cardiac Development and Cardiomyopathy. Trends in Cardiovascular Medicine 15(5):185 – 189
- [33] Dorn GW, Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. The Journal of Clinical Investigation 115(3):527–537
- [34] Dorn GW, Tepe NM, Wu G, Yatani A, Liggett SB (2000) Mechanisms of impaired β -adrenergic receptor signaling in $G\alpha_q$ -mediated cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction. Molecular pharmacology 57(2):278–287
- [35] Dyavanapalli J, Hora AJ, Escobar JB, Schloen J, Dwyer MK, Rodriguez J, Spurney CF, Kay MW, Mendelowitz D (2020) Chemogenetic activation of intracardiac cholinergic neurons improves cardiac function in pressure overload-induced heart failure. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 319(1):H3–H12
- [36] Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE (2011) The Utility of the Small Rodent Electrocardiogram in Toxicology. Toxicological Sciences 121(1):11–30
- [37] Farrell MS, Pei Y, Wan Y, Yadav PN, Daigle TL, Urban DJ, Lee HM, Sciaky N, Simmons A, Nonneman RJ, *et al.* (2013) A $G\alpha_s$ DREADD Mouse for Selective Modulation of cAMP Production in Striatopallidal Neurons. Neuropsychopharmacology 38(5):854
- [38] Fast VG (2005) Recording action potentials using voltage-sensitive dyes. In: Practical Methods in Cardiovascular Research, Springer, 233–255
- [39] Fenske S, Pröbstle R, Auer F, Hassan S, Marks V, Pauza DH, Biel M, Wahl-Schott C (2016) Comprehensive multilevel in vivo and in vitro analysis of heart rate fluctuations in mice by ECG telemetry and electrophysiology. Nature Protocols 11(1):61

- [40] Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews* 82(4):893–922
- [41] Filtz TM, Grubb DR, McLeod-Dryden TJ, Luo J, Woodcock EA (2009) Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase C β 1b. *The FASEB Journal* 23(10):3564–3570
- [42] Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J (2018) Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: an experimental study. *Molecular Metabolism* 7:161–170
- [43] Gertsch M (2008) *Das EKG: Auf einen Blick und im Detail*. Springer
- [44] Goldberg AN, Hellerstein HK, Bruell JH, Daroczy AF (1968) Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects. *Cardiovascular Research* 2(1):93–99
- [45] Grace PM, Wang X, Strand KA, Baratta MV, Zhang Y, Galer EL, Yin H, Maier SF, Watkins LR (2018) DREADDed microglia in pain: Implications for spinal inflammatory signaling in male rats. *Experimental Neurology* 304:125–131
- [46] Greene AN, Clapp SL, Alper RH (2007) Timecourse of recovery after surgical intraperitoneal implantation of radiotelemetry transmitters in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 56(2):218–222
- [47] Gros DB, Jongsma HJ (1996) Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18(9):719–730
- [48] Guettier JM, Gautam D, Scarselli M, De Azua IR, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, *et al.* (2009) A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(45):19197–19202
- [49] Gussak I, Chaitman BR, Kopecky SL, Nerbonne JM (2000) Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. *Journal of Electrocardiology* 33(2):159–170
- [50] Halls ML, Cooper DM (2010) Sub-picomolar relaxin signalling by a pre-assembled RXFP1, AKAP79, AC2, β -arrestin 2, PDE4D3 complex. *The EMBO Journal* 29(16):2772–2787
- [51] Hansen BJ, Li N, Helfrich KM, Abudulwahed SH, Artiga EJ, Joseph ME, Mohler PJ, Hummel JD, Fedorov VV (2018) First in vivo use of high-resolution near-infrared optical mapping to assess atrial activation during sinus rhythm and atrial fibrillation in a large animal model. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 11(12):e006870
- [52] Hardy M, Lawrence C, Standen N, Rodrigo G (2006) Can optical recordings of membrane potential be used to screen for drug-induced action potential prolongation in single cardiac myocytes? *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54(2):173–182

- [53] Hasenfuss G, Mulieri LA, Blanchard EM, Holubarsch C, Leavitt BJ, Ittleman F, Alpert NR (1991) Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species. *Circulation Research* 68(3):836–846
- [54] Hedrich H (2012) *The Laboratory Mouse*. Academic Press, second edition, Elsevier Science
- [55] Helwig BG, Ward JA, Blaha MD, Leon LR (2012) Effect of intraperitoneal radiotelemetry instrumentation on voluntary wheel running and surgical recovery in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 51(5):600–608
- [56] Henke J, Haberstroh BJ, Freiburg Martin Sager D, Zahner D, Arras GM, *et al.* (2015) Schmerztherapie bei Versuchstieren. *GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde* :72
- [57] Herdmann E, Riecker G, *et al.* (1996) *Klinische Kardiologie*. Springer
- [58] Herrmann S, Lipp P, Wiesen K, Stieber J, Nguyen H, Kaiser E, Ludwig A (2013) The cardiac-calcium sodium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. *Cardiovascular Research* 99(4):780–788
- [59] Hoth M, Wischmeyer E (2017) *Duale Reihe Physiologie*. Third edition, Georg Thieme
- [60] Hu J, Stern M, Gimenez LE, Wanka L, Zhu L, Rossi M, Meister J, Inoue A, Beck-Sickingher AG, Gurevich VV, *et al.* (2016) A G protein-biased designer G protein-coupled receptor useful for studying the physiological relevance of Gq/11-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 291(15):7809–7820
- [61] Huetteman DA, Bogie H (2009) Direct Blood Pressure Monitoring in Laboratory Rodents via Implantable Radio Telemetry. In: DiPetrillo K (ed.) *Cardiovascular Genomics: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 57–73
- [62] Hurst JW (1998) Naming of the waves in the ECG, with a brief account of their genesis. *Circulation* 98(18):1937–1942
- [63] Hüser J, Lipp P, Niggli E (1996) Confocal microscopic detection of potential-sensitive dyes used to reveal loss of voltage control during patch-clamp experiments. *Pflügers Archiv* 433(1-2):194–199
- [64] Iwai Y, Ozawa K, Yahagi K, Mishima T, Akther S, Vo CT, Lee AB, Tanaka M, Itohara S, Hirase H (2021) Transient astrocytic Gq signaling underlies remote memory enhancement. *Frontiers in Neural Circuits* 15:18
- [65] Jackson EK, Zhang Y, Gillespie DD, Zhu X, Cheng D, Jackson TC (2017) SDF-1 α (Stromal Cell-Derived Factor 1 α) Induces Cardiac Fibroblasts, Renal Microvascular Smooth Muscle Cells, and Glomerular Mesangial Cells to Proliferate, Cause Hypertrophy, and Produce Collagen. *Journal of the American Heart Association* 6(11):e007253
- [66] Jain S, de Azua IR, Lu H, White MF, Guettier JM, Wess J (2013) Chronic activation of a designer G q-coupled receptor improves β cell function. *The Journal of clinical investigation* 123(4):1750–1762

- [67] Jendryka M, Palchaudhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Kätzel D, Nissen W, Pekcec A (2019) Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Scientific Reports* 9(1):1–14
- [68] Jo SH, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao RP (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent Gs signaling during β 2-adrenergic stimulation. *Circulation research* 91(1):46–53
- [69] Joung B, Chen PS, Lin SF (2011) The role of the calcium and the voltage clocks in sinoatrial node dysfunction. *Yonsei Medical Journal* 52(2):211–219
- [70] Kaestner L, Tian Q, Lipp P (2011) Action potentials in heart cells. In: *Fluorescent Proteins II*, Springer, 163–182
- [71] Kaïdi S, Brutel F, Deun FV, Kramer K, Remie R, Dewé W, Remusat P, Delaunois A, Depelchin O (2007) Comparison of two methods (left carotid artery and abdominal aorta) for surgical implantation of radiotelemetry devices in CD-1 mice. *Laboratory Animals* 41(3):388–402
- [72] Kaiser E, Tian Q, Wagner M, Barth M, Xian W, Schröder L, Ruppenthal S, Kaestner L, Boehm U, Wartenberg P, *et al.* (2019) DREADD technology reveals major impact of Gq signalling on cardiac electrophysiology. *Cardiovascular Research* 115(6):1052–1066
- [73] Katz AM (2010) *Physiology of the Heart*. Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins
- [74] Kehat I, Molkentin JD (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122(25):2727–2735
- [75] Kładna A, Marchlewicz M, Piechowska T, Kruk I, Aboul-Enein HY (2015) Reactivity of pyruvic acid and its derivatives towards reactive oxygen species. *Luminescence* 30(7):1153–1158
- [76] Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, Dos Remedios C, Stienen GJ, van der Velden J (2010) Protein kinase C α and ε phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca²⁺ sensitivity in human myocardium. *Basic Research in Cardiology* 105(2):289–300
- [77] Kramer K, Kinter LB (2003) Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiological Genomics* 13(3):197–205
- [78] Kramer K, van Acker SA, Voss HP, Grimbergen JA, van der Vijgh WJ, Bast A (1993) Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 30(4):209–215
- [79] Krook-Magnuson E, Soltesz I (2015) Beyond the hammer and the scalpel: selective circuit control for the epilepsies. *Nature Neuroscience* 18(3):331
- [80] Kurtz T, Griffin K, Bidani A, Davisson R, Hall J (2005) Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association. Recommendations for blood

- pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension* 45:299–310
- [81] Lakatta EG, DiFrancesco D (2009) What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(2):157–170
- [82] Lambiase PD, Tinker A (2015) Connexins in the heart. *Cell and Tissue Research* 360(3):675–684
- [83] Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF (2000) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *The Journal of Cell Biology* 149(7):1503–1512
- [84] Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 61(6):291–332
- [85] Lee MH, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM (2008) Role of β -arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription. *Journal of Biological Chemistry* 283(4):2088–2097
- [86] Lee RJ, Kalman JM, Fitzpatrick AP, Epstein LM, Fisher WG, Olgin JE, Lesh MD, Scheinman MM (1995) Radiofrequency catheter modification of the sinus node for 'inappropriate' sinus tachycardia. *Circulation* 92(10):2919–2928
- [87] Lepschkin E, Surawicz B (1952) The measurement of the QT interval of the electrocardiogram. *Circulation* 6(3):378–388
- [88] Lewalter T, Lüderitz B (2010) *Herzrhythmusstörungen. Diagnostik und Therapie*. Sixth edition, Springer Medizin
- [89] Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S (1996) Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circulation Research* 78(4):689–696
- [90] Li H, Guo W, Yamada KA, Nerbonne JM (2004) Selective elimination of IK₁ slow1 in mouse ventricular myocytes expressing a dominant negative Kv1.5 α subunit. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 286(1):H319–H328
- [91] Li J, Ning Y, Hedley W, Saunders B, Chen Y, Tindill N, Hannay T, Subramaniam S (2002) The molecule pages database. *Nature* 420(6916):716
- [92] Li JH, Jain S, McMillin SM, Cui Y, Gautam D, Sakamoto W, Lu H, Jou W, McGuinness OP, Gavrilova O, *et al.* (2013) A novel experimental strategy to assess the metabolic effects of selective activation of a Gq-coupled receptor in hepatocytes in vivo. *Endocrinology* 154(10):3539–3551
- [93] Lodhi IJ, Semenkovich CF (2009) Why we should put clothes on mice. *Cell Metabolism* 9(2):111–112

- [94] London B (2001) Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 12(9):1089–1091
- [95] Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ (2009) Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(12):2351–2355
- [96] Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393(6685):587
- [97] Makowka P, Bruegmann T, Dusend V, Malan D, Beiert T, Hesse M, Fleischmann BK, Sasse P (2019) Optogenetic stimulation of G_s-signaling in the heart with high spatio-temporal precision. *Nature Communications* 10(1):1–9
- [98] Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA (2010) β -arrestin-dependent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II after β_1 -adrenergic receptor stimulation. *The Journal of Cell Biology* 189(3):573–587
- [99] Manvich DF, Webster KA, Foster SL, Farrell MS, Ritchie JC, Porter JH, Weinshenker D (2018) The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Scientific Reports* 8(1):3840
- [100] Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, Wada T, Nagao T, Kurose H (2002) $G_{\alpha 12/13}$ mediates α_1 -Adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research* 91(10):961–969
- [101] Milani-Nejad N, Janssen PM (2014) Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacology & Therapeutics* 141(3):235–249
- [102] Mironova E, Suliman F, Stockand JD (2019) Renal Na^+ excretion consequent to pharmacogenetic activation of Gq-DREADD in principal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 316(4):F758–F767
- [103] Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998) Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274(3):H747–H751
- [104] Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A (1997) Temperature dependence of the inward rectifier K^+ channel gating in guinea-pig ventricular cells. *The Japanese Journal of Physiology* 47(1):73–79
- [105] Miyamoto S, Del Re DP, Xiang SY, Zhao X, Florholmen G, Brown JH (2010) Revisited and Revised: Is RhoA Always a Villain in Cardiac Pathophysiology? *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3(4):330–343
- [106] Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM (2010) The anatomy and physiology of the sinoatrial node - a contemporary review. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 33(11):1392–1406

- [107] Morales H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F, Van Langendonck A (1999) Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 52(2):149–157
- [108] Moreira TS, Antunes VR, Falquetto B, Marina N (2018) Long-term stimulation of cardiac vagal preganglionic neurons reduces blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension* 36(12):2444–2452
- [109] Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F (2005) cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research* 97(12):1296–1304
- [110] Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434(7030):225
- [111] Murphy C, Lazzara R (2016) Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 46(1):9–18
- [112] Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and-deficient cell lines. *The Journal of Cell Biology* 111(5):2077–2088
- [113] Nakajima Ki, Wess J (2012) Design and functional characterization of a novel, arrestin-biased designer G protein-coupled receptor. *Molecular Pharmacology* :mol–112
- [114] Nerbonne JM (2014) Mouse models of arrhythmogenic cardiovascular disease: challenges and opportunities. *Current Opinion in Pharmacology* 15:107–114
- [115] Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews* 85(4):1205–1253
- [116] Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D (2001) Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circulation Research* 89(11):944–956
- [117] Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H (2007) G α 12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *Journal of Biological Chemistry* 282(32):23117–23128
- [118] Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, *et al.* (2008) P2Y₆ receptor-G α 12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *The EMBO Journal* 27(23):3104–3115
- [119] Nussinovitch U, Gepstein L (2015) Optogenetics for in vivo cardiac pacing and resynchronization therapies. *Nature Biotechnology* 33(7):750
- [120] Oberhofer M, Tian Q, Ruppenthal S, Wegener S, Reil JC, Körbel C, Hammer K, Menger M, Neuberger HR, Kaestner L, *et al.* (2013) Calcium dysregulation in ventricular myocytes from mice expressing constitutively active Rac1. *Cell Calcium* 54(1):26–36

- [121] Offermanns S (2001) In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in $G\alpha$ -deficient mice. *Oncogene* 20(13):1635
- [122] Offermanns S, Simon MI (1998) Genetic analysis of mammalian G-protein signalling. *Oncogene* 17(11):1375
- [123] Pahlavan S, Oberhofer M, Sauer B, Ruppenthal S, Tian Q, Scholz A, Kaestner L, Lipp P (2012) $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ contribute to the maintenance of cellular electrophysiology and Ca^{2+} handling in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 95(1):48–58
- [124] Pang BJM, Green MS (2017) Epidemiology of ventricular tachyarrhythmia. *Herzschrittmachertherapie+ Elektrophysiologie* 28(2):143–148
- [125] Park D, Fishman G (2017) Development and function of the cardiac conduction system in health and disease. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 4(2):7
- [126] Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK (2017) Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424(1–2):123–145
- [127] Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevicz T, Fidelman N, Desai K, Vranizan K, Lee EK, *et al.* (2000) Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(9):4826–4831
- [128] Rohr S, Salzberg B (1994) Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophysical Journal* 67(3):1301–1315
- [129] Roth BL (2016) DREADDs for neuroscientists. *Neuron* 89(4):683–694
- [130] Roussel J, Champeroux P, Roy J, Richard S, Fauconnier J, Le Guennec JY, Thireau J (2016) The complex QT/RR relationship in mice. *Scientific Reports* 6:25388
- [131] Ruan H, Mitchell S, Vainoriene M, Lou Q, Xie LH, Ren S, Goldhaber JL, Wang Y (2007) $G\alpha_{i1}$ -mediated cardiac electrophysiological remodeling and arrhythmia in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 116(6):596–605
- [132] Salazar NC, Chen J, Rockman HA (2007) Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768(4):1006–1018
- [133] Sanchez-Quintana D, Cabrera J, Farre J, Climent V, Anderson R, Ho S (2005) Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation. *Heart* 91(2):189–194
- [134] Schierok H, Markert M, Pairet M, Guth B (2000) Continuous assessment of multiple vital physiological functions in conscious freely moving rats using telemetry and a plethysmography system. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 43(3):211–217

- [135] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, *et al.* (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(9):3507–3512
- [136] Smejkal GB, Shainoff JR, Kottke-Marchant KM (2003) Rapid high-resolution electrophoresis of multimeric von Willebrand Factor using a thermopiloted gel apparatus. *Electrophoresis* 24(4):582–587
- [137] Smith JS, Imagawa T, Ma J, Fill M, Campbell KP, Coronado R (1988) Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of General Physiology* 92(1):1–26
- [138] Smrcka AV, Oestreich EA, Blaxall BC, Dirksen RT (2007) EPAC regulation of cardiac EC coupling. *The Journal of Physiology* 584(3):1029–1031
- [139] Solan JL, Lampe PD (2018) Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1860(1):83–90
- [140] Sommer JR, Johnson EA (1968) CARDIAC MUSCLE. *The Journal of Cell Biology* 36(3):497–526
- [141] Späni D, Arras M, König B, Rüllicke T (2003) Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Laboratory Animals* 37(1):54–62
- [142] Speerschneider T, Thomsen MB (2013) Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiologica* 209(4):262–271
- [143] Spiegel AM, Weinstein LS (2004) Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annual Review of Medicine* 55:27–39
- [144] Strader CD, Gaffney T, Sugg E, Candelore MR, Keys R, Patchett A, Dixon R (1991) Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *Journal of Biological Chemistry* 266(1):5–8
- [145] Strathmann M, Simon MI (1990) G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(23):9113–9117
- [146] Sutherland FJ, Hearse DJ (2000) The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research* 41(6):613–627
- [147] Takao K, Miyakawa T (2015) Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(4):1167–1172
- [148] Takefuji M, Wirth A, Lukasova M, Takefuji S, Boettger T, Braun T, Althoff T, Offermanns S, Wettschureck N (2012) G13-Mediated Signaling Pathway Is Required for Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Circulation* 126(16):1972–1982

- [149] Tian Q, Oberhofer M, Ruppenthal S, Scholz A, Buschmann V, Tsutsui H, Miyawaki A, Zeug A, Lipp P, Kaestner L (2011) Optical action potential screening on adult ventricular myocytes as an alternative qt-screen. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27(3-4):281–290
- [150] Tilley DG (2011) G protein–dependent and G protein–independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circulation Research* 109(2):217–230
- [151] Trask RV, Billadello JJ (1990) Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1049(2):182–188
- [152] Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J (2009) The sympathetic nervous system in heart failure: physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology* 54(19):1747–1762
- [153] Urban DJ, Roth BL (2015) DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 55(1):399–417, PMID: 25292433
- [154] Vazey EM, Aston-Jones G (2014) Designer receptors: therapeutic adjuncts to cell replacement therapy in Parkinson’s disease. *The Journal of Clinical Investigation* 124(7):2858–2860
- [155] Völkers M, Weidenhammer C, Herzog N, Qiu G, Spaich K, von Wegner F, Peppel K, Müller OJ, Schinkel S, Rabinowitz JE, *et al.* (2011) The inotropic peptide β ARKct improves β AR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through $G\beta\gamma$ -mediated L-type calcium current disinhibition. *Circulation Research* 108(1):27–39
- [156] Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, *et al.* (2016) Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Molecular Pain* 12:1744806916681567
- [157] Wang H, Grant JE, Doede CM, Sadayappan S, Robbins J, Walker JW (2006) PKC- β II sensitizes cardiac myofilaments to Ca²⁺ by phosphorylating troponin I on threonine-144. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41(5):823–833
- [158] Wang L, Chen SR, Ma H, Chen H, Hittelman WN, Pan HL (2018) Regulating nociceptive transmission by VGluT2-expressing spinal dorsal horn neurons. *Journal of Neurochemistry* 147(4):526–540
- [159] Wang L, Duff HJ (1997) Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circulation Research* 81(1):120–127
- [160] Wess J (2016) Use of designer G protein-coupled receptors to dissect metabolic pathways. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27(9):600–603
- [161] Wess J, Nakajima K, Jain S (2013) Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends in Pharmacological Sciences* 34(7):385–392

- [162] Wessels A, Sedmera D (2003) Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological Genomics* 15(3):165–176, PMID: 14612588
- [163] Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* 85(4):1159–1204
- [164] Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie J Tom M abd Chen, Chien KR, Offermanns S (2001) Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ in cardiomyocytes. *Nature Medicine* 7:1236–1240
- [165] Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ (2016) The use of DREADDs to deconstruct behavior. *Frontiers in Genetics* 7:70
- [166] Wiegerinck RF, Verkerk AO, Belterman CN, van Veen TA, Baartscheer A, Opthof T, Wilders R, de Bakker JM, Coronel R (2006) Larger cell size in rabbits with heart failure increases myocardial conduction velocity and QRS duration. *Circulation* 113(6):806–813
- [167] Wiesen K, Kaiser E, Schröder L, Scholz A, Ruppenthal S, Reil JC, Backes C, Meese E, Meier C, Bogdanova A, *et al.* (2016) Cardiac remodeling in $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ knockout mice. *International Journal of Cardiology* 202:836–845
- [168] Wilde E, Aubdool AA, Thakore P, Baldissera Jr L, Alawi KM, Keeble J, Nandi M, Brain SD (2017) Tail-cuff technique and its influence on central blood pressure in the mouse. *Journal of the American Heart Association* 6(6):e005204
- [169] Xu H, Guo W, Nerbonne JM (1999) Four kinetically distinct depolarization-activated K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *The Journal of General Physiology* 113(5):661–678
- [170] Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, Weigert R, Molinolo AA, Bouvier M, Gutkind JS (2011) A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Science Signaling* 4(191):ra60–ra60
- [171] Yamaoka K, Yuki T, Kawase K, Munemori M, Seyama I (2002) Temperature-sensitive intracellular Mg^{2+} block of L-type Ca^{2+} channels in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 282(3):H1092–H1101
- [172] Zhong P, Liu X, Zhang Z, Hu Y, Liu SJ, Lezama-Ruiz M, Joksimovic M, Liu Qs (2014) Cyclin-dependent kinase 5 in the ventral tegmental area regulates depression-related behaviors. *Journal of Neuroscience* 34(18):6352–6366
- [173] Zhu H, Aryal DK, Olsen RH, Urban DJ, Swearingen A, Forbes S, Roth BL, Hochgeschwender U (2016) Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. *Genesis* 54(8):439–446
- [174] Zhu L, Dattaroy D, Pham J, Wang L, Barella LF, Cui Y, Wilkins KJ, Roth BL, Hochgeschwender U, Matschinsky FM, *et al.* (2019) Intra-islet glucagon signaling is critical for maintaining glucose homeostasis. *JCI Insight* 4(10)

Gesetzestexte

Tierschutzgesetz (TierSchG) idF vom 18.03.2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 141 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626)

Internetquellen

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wiggers_Diagram_de.svg#/media/File:Wiggers_Diagram_de.svg zuletzt abgerufen am 08.05.2021, 12:00

<https://destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> zuletzt abgerufen am 08.05.2021, 15:20

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

9 Publikationen

Erstautorenschaft

- **Kaiser E**, Tian Q, Wagner M, Barth M, Xian W, Schröder L, Ruppenthal S, Kaestner L, Boehm U, Wartenberg P, Lu H, McMillin SM, Bone DBJ, Wess J, Lipp P (2019) DREADD technology reveals major impact of Gq signalling on cardiac electrophysiology. *Cardiovascular Research*. 115(6):1052–1066

Mitautorenschaft

- Herrmann S, Lipp P, Wiesen K, Stieber J, Nguyen H, **Kaiser E**, Ludwig A (2013) The cardiac sodium-calcium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. *Cardiovascular Research*. 99(4):780–788
- Wang J, Wagner-Britz L, Bogdanova A, Ruppenthal S, Wiesen K, **Kaiser E**, Tian Q, Krause E, Bernhardt I, Lipp P, Philipp S E, Kaestner L (2013) Morphologically homogeneous red blood cells present a heterogeneous response to hormonal stimulation. *PloS One*, 8(6):e67697
- Kaestner L, Tian Q, **Kaiser E**, Xian W, Müller A, Oberhofer M, Ruppenthal S, Sinncker D, Tsutsui H, Miyawaki A, Moretti A, Lipp P (2015) Genetically Encoded Voltage Indicators in Circulation Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(9):21626–21642
- Wiesen K, **Kaiser E**, Schröder L, Scholz A, Ruppenthal S, Reil JC, Backes C, Meese E, Meier C, Bogdanova A, Lipp P, Kaestner L (2016) Cardiac remodeling in $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ knockout mice. *International Journal of Cardiology*. 202:836–845
- Danielczok J, Hertz L, Ruppenthal S, **Kaiser E**, Petkova-Kirova P, Bogdanova A, Krause E, Lipp P, Freichel M, Kaestner L, Birnbaumer L (2017) Does Erythropoietin Regulate TRPC Channels in Red Blood Cells? *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 41(3):1219–1228
- Steinbach J, Goedicke-Fritz S, Tutdibi E, Stutz R, **Kaiser E**, Meyer S, Baumbach JI, Zemlin M (2019) Bedside Measurement of Volatile Organic Compounds in the Atmosphere of Neonatal Incubators Using Ion Mobility Spectrometry. *Frontiers in Pediatrics*. 7:248
- Fortmann I, Dammann MT, Humberg A, Siller B, Stichtenoth G, Engels G, Marißen J, Faust K, Hanke K, Goedicke-Fritz S, Derouet C, Meyer S, Stutz R, **Kaiser E**, Herting E, Göpel W, Härtel C, Zemlin M (2021) 5 year follow up of Extremely Low Gestational Age Infants after timely or delayed administration of routine vaccinations. *Vaccines (akzeptiert)*.

Poster

- Kaiser E, Wess J, Tian Q, Ruppenthal S, Schröder L, Kaestner L, Lipp P. Conditional and selective activation of the Gq pathway in the heart and its impact on cardiac function in vivo. 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (13.-15. März 2014, Mainz)
- Kaiser E, Wess J, Tian Q, Ruppenthal S, Schröder L, Kaestner L, Lipp P. Conditional and selective activation of the Gq pathway in the heart and its impact on cardiac function in vivo. Cell Physics (22.-26. September 2014, Saarbrücken)
- Kaiser E, Tian Q, Barth M, Ruppenthal S, Wess J, Kaestner L, Lipp P. Gq signaling in the heart impacts primary pacemaking and conduction propagation. 94. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (5.-7. März 2015, Magdeburg)

10 Danksagung

Was lange währt, wird endlich gut - und dies wäre unmöglich gewesen ohne die zahlreiche Unterstützung, die mir während meiner Promotionszeit zugekommen ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Lipp, der mir nicht nur das Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern zahlreiche inspirierende Ideen mit mir teilte, permanente fachliche Unterstützung bot und selbst aus einen vermeintlichen Pessimisten wie mir stets den Glauben an mich selbst heraus locken konnte.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Lars Kaestner herzlich dafür danken, dass er immer mit konstruktiven Rat und Tat mein Vorankommen gesichert hat. Ein riesiges Dankeschön, dass du mir geholfen hast, auch mal um die Ecke zu denken!

Dr. Sandra Ruppenthal, Dr. Monika Barth-Schäuble und Dr. Qinghai Tian bin ich zutiefst dankbar für ihre fachliche und freundschaftliche Entwicklungshilfe für Tiermediziner in ihren Fachgebieten. Sandra und Moni, ihr habt mir als Freunde die Welt der Molekularbiologie eröffnet, Qinghai, ohne deine geduldige Hilfsbereitschaft wäre ich an optischen Messungen, Matlab und Igor gescheitert.

Lieben Dank für miteinander Forschen, Lachen, Bangen, Hoffen, Motivieren, und eine Freundschaft, die über die Arbeit hinaus geht an all meine ehemaligen Kollegen im Institut für Molekulare Zellbiologie: Dr. Laura Schröder - Schwester im Geiste! - Katja Flügel, die mit mir den Endspurt teilt, Dr. Kathrina Wiesen, die mich in die Transmitter-Technik eingeführt hat, Dr. Benjamin Sauer und Dr. Julia Schweitzer für IT- und Endorphin-Support, Dr. Laura Hertz für zahlreiche Spontanhilfestellungen, Tanja Kuhn und Sabrina Hennig für die Unterstützung in Labor und in der Tierhaltung, Dr. Jens Danielczok für humanmedizinisch – veterinärmedizinisches Fachsimpeln, Karin Schumacher und Cornelia Feß, die bei allen organisatorischen Angelegenheiten unendlich hilfsbereit waren, Dr. Polina Petkova-Kirova, Dr. Xin Hui, Dr. Wenying Xian, Jia Guo - thank you for bringing sunshine to the lab!

Allen Organisatoren, Supervisoren und Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1326, insbesondere Prof. Dr. Dieter Bruns, Frau Judith Arend und Dr. Petra Weißgerber möchte ich herzlich „Danke“ sagen.

Und zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken - ihr seid mein Ausgleich, meine Motivation, mein Ruhepol, meine Stütze, mein Rückzugsort. Mama und Papa, danke für eure unerschütterliche Fürsorge und Liebe. Meinen Geschwistern und ihren Kindern danke ich von Herzen für all den Beistand und die Unbeschwertheit, die sie mich über die örtliche Distanz hinweg immer spüren lassen. Meine innigsten GeDanken gelten Mark, für Liebe und Flügel: hinterm Brust- und unterm Schlüsselbein - du begleitest mich mein Leben lang auf meinem Weg.