

# Funktionelle Analyse des $Ca_v2.3$ Kalziumkanals im kardiovaskulären System

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. nat. med.  
der Medizinischen Fakultät  
und  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Dr. med. Marco Weiergräber  
aus Jülich

Hundt Druck GmbH, Köln

2005

# Funktionelle Analyse des $Ca_v2.3$ Kalziumkanals im kardiovaskulären System

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. nat. med.  
der Medizinischen Fakultät  
und  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Dr. med. Marco Weiergräber  
aus Jülich

Hundt Druck GmbH, Köln

2005





*Alte Ideen lösen sich nur langsam auf,  
denn sie sind mehr als abstrakte logische Formen und Kategorien.*

*Sie sind Gewohnheiten, Präd dispositionen, tief verwurzelte  
Haltungen der Aversion und der Sympathie.*

*Außerdem besteht die Überzeugung  
– obwohl die Geschichte zeigt, dass dies Einbildung ist –,  
dass alle vom menschlichen Geist ersonnenen Fragen mit den  
Alternativen beantwortet werden können,  
die sich aus den Fragen selber ergeben.*

*Tatsächlich aber entwickelt sich intellektueller Fortschritt gewöhnlich  
daraus, dass die Fragen und die beiden von ihnen unterstellten  
Alternativen einfach aufgegeben werden – ein Verzicht, der aus der  
abnehmenden Vitalität der Fragen und einem Wechsel des akuten  
Forschungsinteresses resultiert.*

*Wir lösen die Fragen nicht, wir überwinden sie.*

*Alte Fragen lösen sich durch ihr Verschwinden, durch ihre  
Auflösung, während neue Fragen ihren Platz einnehmen, die den  
veränderten Forschungs- und Präferenzhaltungen entsprechen.*

**John Dewey (1859-1952, Philosoph)**

**The Influence of Darwin on Philosophy (Essay)**



Für  
meine Eltern  
meine Großeltern  
meinen Bruder  
Athena

#### Anmerkung

In der vorliegenden Arbeit werden, soweit sinnvollerweise möglich, Termini technici in der deutschen Fassung verwendet. In einigen Bereichen sind allerdings deutsche Bezeichnungen entweder nicht existent oder zumindest ungebräuchlich; in diesen Fällen finden die englischen, französischen bzw. lateinischen Pendants Verwendung und werden als solche durch kursiven Schriftsatz gekennzeichnet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle - strukturelle und funktionelle Charakteristika	1
1.2. Niederspannungsaktivierte Kalziumkanäle (low-voltage- activated calcium channels, LVA)	7
1.3. Kardiale Elektrophysiologie - eine grundlegende Vorbetrachtung	10
1.4. Ionale Grundlagen der myogenen Automtizität im Herzen	14
1.4.1. Vorbetrachtung	14
1.4.2. Sinusknoten (Nodus sinuatrialis, Keith-Flack-Knoten)	14
1.4.3. Atriales Arbeitsmyokard	20
1.4.4. AV-Knoten	22
1.4.5. His-Purkinje-System	23
1.4.6. Ventrikuläres Arbeitsmyokard	25
1.5. Das Herzmuskelaktionspotential von Mensch und Maus - ein Vergleich	26
1.6. Niederspannungsaktivierte Kalziumkanäle im Herzen und im kardiovaskulären System - von den Ursprüngen ihrer Entdeckung bis zur Gegenwart	29
1.7. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle im Herzen: Wie transgene Mausmodelle neue Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie von Ionenkanälen geben	32
1.8. Der R-Typ Kalziumkanal $Ca_v2.3$ ( $\alpha 1E$ ) im Ratten- und Mausherzen	36
1.9. Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von $Ca_v2.3$ und $Ca_v3.1$ im Rattenherzen	38
1.10. $Ca_v2.3$ in pränatalen Kontroll- und $Ca_v2.3$ defizienten Mausherzen - molekularbiologische und elektrophysio- logische Charakterisierung	43
1.11. $Ca^{2+}$ -Kanalopathien und kardiale Rhythmusstörungen beim Menschen	50
1.12. Fragestellung	53

<b>2. Materialien</b>	<b>54</b>
2.1. Allgemeine Reagenzien	54
2.2. Geräte	58
2.3. Materialien zur Mikrosomenisolation	58
2.4. Materialien für SDS-PAGE / Western Blot	60
2.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli)	60
2.4.2. Semi-Dry Blot	62
2.5. Histochemische Arbeitsmaterialien	65
2.5.1. Allgemeine Reagenzien	65
2.5.2. Antikörperliste	67
2.6. Verfahren zur Isolation, Auftrennung und Detektion von Ca <sub>v</sub> -α1-Kalziumkanaluntereinheiten	68
2.6.1. Mikrosomale Membranen aus Gewebe und Zellkulturen	68
2.6.1.1. Mikrosomenpräparation	68
2.6.1.2. Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuremethode (BCA-Methode)	69
2.6.2. Verfahren zur Proteindetektion - Grundlagen der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
2.6.3. Transferverfahren und Western-Blot	75
2.6.3.1. Semi-dry blotting-Verfahren und Membranvorbereitung (membrane wetting protocol)	75
2.6.3.2. Naßtank-Verfahren	78
2.6.3.3. Proteindetektion mittels Antikörper	78
2.6.4. Histochemie	81
2.6.4.1. Fixation	81
2.6.4.2. Einbettung	84
2.6.4.3. Deparaffinierung und Rehydratisierung	87
2.6.4.4. Trichromfärbung nach Masson	87
2.6.4.5. Eindecken (Dehydratisierung und Klärung)	89
2.7. Voltage-Clamp-Verfahren	90
2.7.1. Materialien für Patch-Clamp-Experimente	90
2.7.2. Patch-Clamp-Verfahren – Grundlagen	91

2.7.3. Elektrophysiologische Materialien	95
2.7.4. Patch-Pipetten	95
2.7.5. Elektrophysiologischer Messtand und Versuchsablauf	96
2.7.6. Verwendete Pharmaka	98
2.8. Dissoziation kardialer Mausmyozyten	101
2.8.1. Materialien und Reagenzien zur Langendorff-Myozytendissoziation	101
2.8.2. Dissoziation nach der Chunk (Stückchen)-Methode zur Gewinnung akut dissoziierter Mausmyozyten	102
2.8.3. Reagenzien zur Präparation eines Schweineherzens	103
2.8.4. Dissoziation von Maus-Kardiomyozyten mittels Langendorff-Apparatur	104
2.8.5. Dissoziation nach der Chunk-Methode	108
2.8.6. Aufbereitung menschlichen Herzgewebes	110
2.9. Telemetrische Detektion von Biopotentialen - Materialien und Methoden zur Kleintierchirurgie und telemetrischen Implantation von Radiofrequenztransmittern zur EKG, EEG und EMG-Messung	111
2.9.1. Injektionslösungen und Pharmaka	111
2.9.2. Operationsbedarf - chirurgische Geräte	112
2.9.2.1. Allgemeines	112
2.9.2.2. Mikrochirurgie-Mikrodissektions-Besteck	113
2.9.2.3. Weiteres chirurgisches Material	115
2.9.2.4. Chirurgisches Nahtmaterial	118
2.9.2.5. Materialien zur enzymatischen Transmitterreinigung und Resterilisation	119
2.9.3. Telemetrie-System zur Aufnahme elektrokardiographischer (EKG) und elektroenzephalographischer (EEG) Signale	119
2.9.3.1. Chirurgische Implantation des TA10ETA-F20 Transmitters	123
2.9.3.2. Operationskautelen	124
2.9.3.3. Postoperative Behandlung	130
2.9.3.4. Wiederverwendung der TA10ETA-F20-Transmitter	131
2.9.3.5. Pharmakologische Injektionsexperimente	132

2.9.4. Telemetrische Erfassung elektroenzephalographischer (EEG) Signale bei Mäusen	134
2.9.4.1. Versuchstiere und Haltung	134
2.9.4.2. Intraperitoneale Implantation	134
2.9.4.3. Subkutane Pouch-Implantation	136
2.9.4.4. Elektrokortikogramm (ECoG) – Oberflächenelektroden	138
2.9.4.5. Tiefe intrazerebrale (intrahippokampale) Ableitungen	138
2.9.5. Jugularvenenkatheterisierung der Maus	140
3.9.5.1. Injektion physiologischer Kochsalzlösung	144
2.9.5.2. Injektionsexperimente mit Isoproterenol	145
2.9.5.3. Injektionsexperimente mit SNX-482	145
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>146</b>
3.1. Detektion von Ca <sub>v</sub> 2.3 im Herzen auf Proteinebene	146
3.2. Histochemische Untersuchungen an Kontroll- und Ca <sub>v</sub> 2.3(-/-) Herzen	147
3.3. Detektion von Ca <sub>v</sub> 2.3-Splicevarianten im Herzen	150
3.3.1. Ca <sub>v</sub> 2.3-Transkripte in C57Bl/6 Mäusen	150
3.3.2. Analyse weiterer spannungsgesteuerter Kalziumkanäle in Herzen Ca <sub>v</sub> 2.3 defizienter Mäuse	159
3.3.3. Nachweis von Ca <sub>v</sub> 2.3 im Schweineherzen	159
3.3.4. Nachweis von Ca <sub>v</sub> 2.3 im Herzen des Menschen	160
3.4. Patch-Clamp Untersuchungen	161
3.4.1. Datenanalyse und biophysikalische Vorbetrachtungen	161
3.4.2. Grundlegende biophysikalische Charakterisierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion	161
3.4.2.1. Dosis-Wirkungs-Beziehungen	161
3.4.2.2. Das Rezeptormodulationsmodell (modulated receptor model) und seine mathematische Beschreibung	166
3.4.3. Biophysikalische Beschreibung und zelluläre Realität	168
3.4.4. Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses von Isradipin Tetrodotoxin auf Ca <sub>v</sub> 2.3d und Ca <sub>v</sub> 2.3e	169

3.5. Elektrokardiographische Untersuchungen an $Ca_v2.3(+ +)$ - und $Ca_v2.3$ defizienten Mäusen	173
3.5.1. Grundlegende physiologische Parameter der Maus	173
3.5.2. Postoperative Erholung nach intraperitonealer Implantation des Radiofrequenztransmitters	176
3.5.3. Elektrokardiographische Aufzeichnungen bei Mäusen	177
3.5.4. Das Elektrokardiogramm (EKG) einer Wildtyp-Maus	178
3.5.5. Qualitative Analyse des Elektrokardiogramms $Ca_v2.3$ defizienter sowie $Ca_v2.3(+ +)$ Mäuse	181
3.5.6. Quantitative Analyse des Elektrokardiogramms – Herzfrequenzvariabilität	189
3.5.6.1. Allgemeine Grundlagen	189
3.5.6.2. Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität (time domain analysis of heart rate variability)	189
3.5.7. Qualitative und quantitative Analyse pharmakologischer Injektionsexperimente	192
3.5.8. Pharmakologische autonome Denervation (autonomer Block) mittels Atropin und Propranolol	193
3.5.9. Barorezeptorreflex-Aktivierung und Testung des para- sympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Methoxamin	196
3.5.10. Inhibition des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Propranolol	198
3.5.11. Stimulation des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Isoproterenol	200
3.5.12. Frequenzbreite und Herzreserve - Bestimmung kardiovasku- lärer Flexibilität in $Ca_v2.3$ defizienten Mäusen und Kontrolltieren	212
3.5.13. Laufradexperimente	213
3.5.14. Jugularvenenkatheterisierung der Maus und SNX-482- Applikation	215
3.6. Elektroenzephalographische (EEG) Aufzeichnungen bei C57Bl/6 Mäusen	218
3.6.1. Vorbetrachtung	218
3.6.2. Postoperative Erholung	218

3.6.3. Signal/Rausch-Verhältnis	219
3.6.4. EEG-Aufzeichnungen nach subkutaner Pouch-Implantation	219
3.6.5. Elektrokortikogramm (ECoG)	219
3.6.6. ECoG nach Applikation von R/S-Baclofen und Bicucullin	220
3.6.7. ECoG nach Applikation von 4-Aminopyridin	220
3.6.8. Tiefe intrazerebrale Ableitung	221
3.6.9. Elektromyographische und elektroenzephalographische Kontamination des Elektroenzephalogramms	222
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b><u>227</u></b>
4.1. Transgene Mäuse als Krankheitsmodelle in der Medizin	227
4.2. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle im Herzen	228
4.3. Ca <sub>v</sub> 2.3 im kardiovaskulären System der Ratte	228
4.4. Ca <sub>v</sub> 2.3 im kardiovaskulären System der Maus	229
4.5. Ca <sub>v</sub> 2.3-Nachweis in pränatalen Mausherzen und funktionelle Implikationen	231
4.6. Kardiale Phänotypisierung und autonome kardiovaskuläre Modula- tion in adulten Ca <sub>v</sub> 2.3 defizienten Mäusen	233
4.7. Ausblick	240
<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	<b><u>241</u></b>
<b><u>6. Literatur</u></b>	<b><u>243</u></b>
<b><u>7. Danksagung</u></b>	<b><u>274</u></b>
<b><u>8. Erklärung</u></b>	<b><u>275</u></b>
<b><u>9. Publikationen</u></b>	<b><u>276</u></b>
<b><u>10. Lebenslauf</u></b>	<b><u>283</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CNBP	<i>cyclic nucleotide binding protein</i>
Cx	Connexin
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HR	<i>heart rate</i>
HVA	<i>high-voltage activated</i>
ID	<i>inner diameter</i>
ip.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
KB-Medium	Kraftbrühe-Medium
LTCS	<i>low-threshold calcium spike</i>
LVA	<i>low-voltage activated</i>
MDP	maximale diastolische Depolarisation
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MW	Molekulargewicht
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NNR	Nebennierenrinde
OD	<i>outer diameter</i>
p.a.	pro analysis
p.c.	post coitum
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Reverse Transkriptase
SAN	<i>sinoatrial node</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan
u.U.	unter Umständen
VES	ventrikuläre Extrasystole
v	Volumen
WCR	<i>whole cell recording</i>
ZNS	Zentralnervensystem

*Nur der Erkennende lebt.*

*Christian Morgenstern (1871 - 1914)*



*De Humani Corporis Fabrica –*

*Andreas Vesalius (1514 - 1564)*

## Abstract

Voltage-gated calcium channels are key components in cardiac electrophysiology. Here we demonstrate that  $Ca_v2.3$  is expressed in mouse and human heart and that mice lacking the  $Ca_v2.3$  voltage-gated calcium channel exhibit severe alterations in cardiac function. Amplified cDNA fragments from total murine heart and single cardiomyocytes reveal the expression of various  $Ca_v2.3$  splice variants ( $Ca_v2.3d-f$ ). The ablation of  $Ca_v2.3$  was found to be accompanied with a compensatory upregulation of the  $Ca_v3.1$  T-type calcium channel, while other voltage-gated calcium channels remained unaffected. Telemetric ECG recordings from  $Ca_v2.3$  deficient mice displayed altered atrial activation patterns, atrioventricular conduction disturbances and alteration in QRS-morphology. Furthermore, time domain analysis of heart rate variability in  $Ca_v2.3(-/-)$  mice exhibited significant increase in heart rate as well as in the coefficient of variance compared to control mice. Administration of atropin and propranolol revealed that the increased heart rate was due to enhanced sympathetic tone and that partial decrease of the coefficient of variance in  $Ca_v2.3(-/-)$  mice after autonomic block was in accordance with a complete abolishment of 2<sup>nd</sup> degree atrioventricular block. However, atrial activation disturbances and QRS-dysmorphology remained unaffected, indicating that these are intrinsic cardiac features in  $Ca_v2.3(-/-)$  mice. Systemic administration of isoproterenol resulted in a significant reduction in interbeat-interval in both genotypes, whereas  $Ca_v2.3(-/-)$  mice remained unaffected by selective inhibition of the sympathetic limb using propranolol. In addition, physical performance, heart rate range and heart rate reserve are reduced in  $Ca_v2.3(-/-)$  mice, indicating that the expression of  $Ca_v2.3$  is essential not only for normal impulse generation and propagation in the murine heart, but also for autonomic regulation and cardiovascular functional capability in mice. Amplification of  $Ca_v2.3$  in human heart indicates that this channels might also be involved in human cardiac (patho)physiology. Electrophysiological (patch-clamp) studies will elucidate role of  $Ca_v2.3$  on the cellular level in the future.

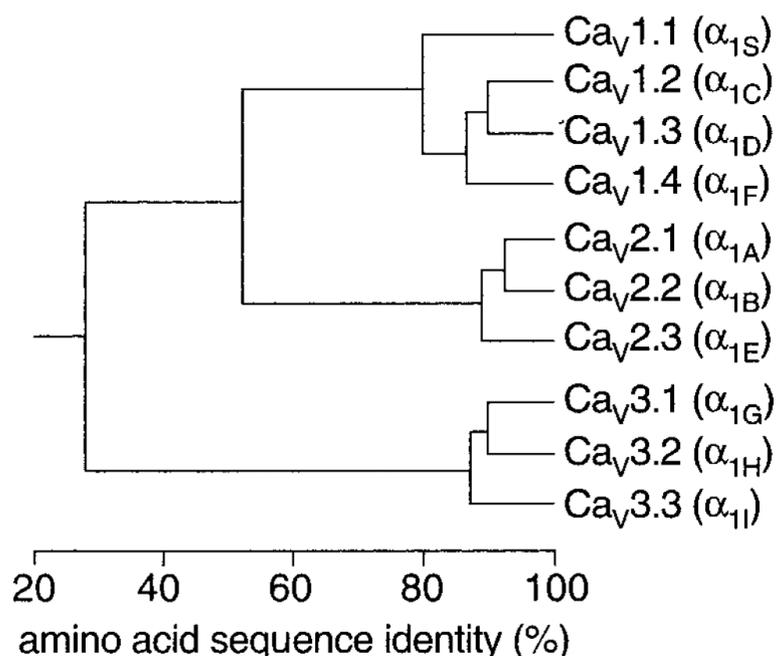
# 1. Einleitung

## 1.1. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle – strukturelle und funktionelle Charakteristika

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle haben eine Schlüsselfunktion bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. der Exzitations-Sekretions-Koppelung im Rahmen der Hormon- und Neurosekretion, der Exzitations-Kontraktions-Koppelung in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur sowie der Genregulation (Hofmann et al., 1999; Striessnig, 1999; Perez-Reyes, 2003; Bers and Perez-Reyes, 1999; Yunker, 2003; Yunker and McEnery, 2003). Für die normotope kardiale Erregungsbildung und orthograde Erregungsausbreitung im Herzen sind sie essentiell (Bers, 2002).

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sind Teil der Superfamilie spannungsgesteuerter Ionenkanäle, die u.a. auch spannungsgesteuerte Natrium-, Kalium- und Chloridkanäle umfasst. Kalziumkanäle stellen einen ubiquitären Bestandteil erregbarer Membranen dar und sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert. Im Gegensatz zu spannungsgesteuerten Natriumkanälen, mit denen sie strukturelle Homologien aufweisen, inaktivieren spannungsgesteuerte Kalziumkanäle insgesamt wesentlich langsamer, so dass im Gegensatz zu Natriumionen hier ein längerer Kalziumeinstrom als Antwort auf einen Depolarisationsschritt erfolgen kann. Auf diese Weise gewinnen spannungsgesteuerte Kalziumkanäle u.a. eine entscheidende Bedeutung in sekretorisch aktiven Drüsen sowie endokrinen Organen. Weiterhin spielen sie eine entscheidene Rolle bei kardialen, skelett- und glattmuskulären Kontraktionsprozessen. Kalziumkanäle kontrollieren somit eine große Zahl zellulärer Prozesse, da sie nicht nur für die zelluläre Exzitabilität, sondern auch für biochemische, d.h. metabolische Vorgänge und Signaltransduktionswege von entscheidender Bedeutung sind. Da die normale intrazelluläre Kalziumkonzentration mit ca.  $10^{-7}$  M sehr niedrig ist, reichen schon geringe Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration aus, zelluläre Mechanismen wie Kontraktion und Sekretion, aber auch unterschiedliche Signaltransduktionswege in Gang zu setzen. Dabei interagieren zellmembranständige spannungsgesteuerte Kalziumkanäle auch mit intrazellulären (ligandengesteuerten) Kalziumkanälen, wie beispielsweise dem  $IP_3$ -Rezeptor oder auch dem Ryanodinrezeptor (RyR) und bedingen auf diese Weise, z.T. zellspezifisch,  $Ca^{2+}$ -getriggerte zelluläre Reaktionen.

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sind heteromultimere Komplexe bestehend aus einer zentralen, porenbildenden und ionenleitenden  $\alpha_1$ -Untereinheit sowie einer Reihe von Hilfsuntereinheiten, der  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit. Zehn verschiedene  $\alpha_1$ -Untereinheiten wurden bis zum heutigen Zeitpunkt kloniert und können gemäß ihrer pharmakologischen wie auch elektrophysiologischen Charakteristika in sog. hochspannungsaktivierte (*high-voltage activated*, HVA-) Kanäle und niederspannungsaktivierte (*low-voltage-activated*, LVA-) Kanäle differenziert werden. Die hochspannungsaktivierten Kalziumkanäle lassen sich weiterhin in L-Typ („L“ für „*long-lasting*“) Kalziumkanäle ( $Ca_v1$ ) sowie Non-L-Typ-Kanäle ( $Ca_v2$ ) unterteilen. Die L-Typ-Kalziumkanäle umfassen die porenbildenden Untereinheiten  $Ca_v1.1$  ( $\alpha_{1S}$ ),  $Ca_v1.2$  ( $\alpha_{1C}$ ),  $Ca_v1.3$  ( $\alpha_{1D}$ ) und  $Ca_v1.4$  ( $\alpha_{1F}$ ), die Non-L-Typ-Kanäle  $Ca_v2.1$  ( $\alpha_{1A}$ ),  $Ca_v2.2$  ( $\alpha_{1B}$ ) sowie  $Ca_v2.3$  ( $\alpha_{1E}$ ) (Hofmann et al., 1999, Striessnig, 1999; Perez-Reyes, 2003; Catterall et al., 2003).



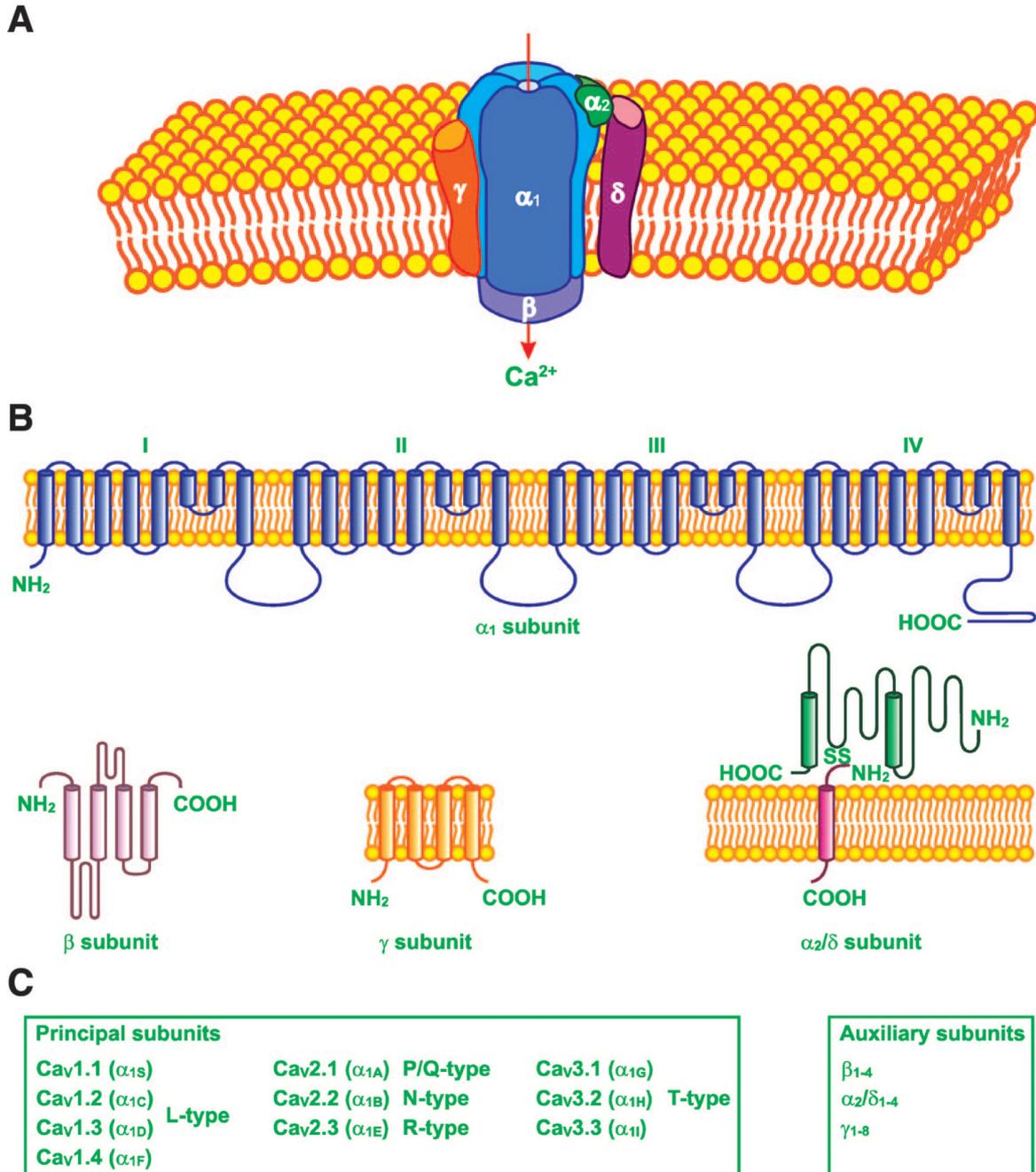
**Abb. 1.1: Strukturelle Verwandtschaft spannungsgesteuerter Kalziumkanäle.**

Nur die transmembranären Komponenten sowie die porenbildenden Schleifen gingen in die Berechnung des Verwandtschaftsgrades mit ein. Drei Hauptäste, für die L-Typ ( $Ca_v1$ ), Non-L-Typ ( $Ca_v2$ ) sowie T-Typ ( $Ca_v3$ ) Kanäle sind sichtbar, innerhalb derer sich Übereinstimmungen  $> 80\%$  finden. Basierend auf einer definierten Konsensussequenz findet sich zwischen  $Ca_v1$  und  $Ca_v2$  eine etwa  $52\%$ ige, zwischen  $Ca_v3$  und  $Ca_v1/2$  eine ca.  $28\%$ ige Identität. Die drei Hauptäste entsprechen in obiger Reihenfolge den in *C. elegans* gefundenen Klonen C48a7, unc2 und C54d2 (Catterall et al., 2003)

Channel type	Ca <sub>v</sub> name	α1 subunit	Gene name	Chromosomal location	Accession number
High voltage activated (HVA)					
L	Ca <sub>v</sub> 1.1	α1S	CACN1S	1q31-q32	NM_000069
L	Ca <sub>v</sub> 1.2	α1C	CACN1C	12p13.3	NM_000719
L	Ca <sub>v</sub> 1.3	α1D	CACN1D	3p14.3	NM_000720
L	Ca <sub>v</sub> 1.4	α1F	CACN1F	Xp11.23	NM_005183
P/Q	Ca <sub>v</sub> 2.1	α1A	CACN1A	19p13.1-q13.2	NM_000068
N	Ca <sub>v</sub> 2.2	α1B	CACN1B	9q34	NM_000718
E*	Ca <sub>v</sub> 2.3	α1E	CACN1E	1q25-q31	NM_000721
Low voltage activated (LVA)					
T	Ca <sub>v</sub> 3.1	α1G	CACN1G	17q22	NM_018896
T	Ca <sub>v</sub> 3.2	α1H	CACN1H	16p13.3	NM_021098
T	Ca <sub>v</sub> 3.3	α1I	CACN1I	22q12.3-q13.2	NM_021096

**Tab. 1.1: Einteilung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle nach elektrophysiologischen Kriterien.** Zehn verschiedene porenbildende α1-Untereinheiten sind bislang kloniert. (\*) Die Ca<sub>v</sub>2.3 Untereinheit wird verschiedentlich (aus historischen Gründen) auch als R-Typ bezeichnet unter Berücksichtigung elektrophysiologischer und z.T. älterer pharmakologischer Erkenntnisse. Genbezeichnung, chromosomale Lokalisation und *Accession number* gelten für den Menschen. In der obiger Darstellung findet sich daher der aktualisierte Terminus E-Typ anstelle von R-Typ (Kamp et al., 2005).

Die molekularen Grundlagen der niederspannungsaktivierten Kalziumkanäle sind in den Jahren 1998/99 in der Gruppe um Prof. Dr. Edward Perez-Reyes aufgeklärt worden und umfassen Ca<sub>v</sub>3.1 (α1G), Ca<sub>v</sub>3.2 (α1H) sowie Ca<sub>v</sub>3.3 (α1I) als ionenleitende Untereinheit. Sie folgt der offiziellen Nomenklatur spannungsgesteuerter Kalziumkanäle (Ertel et al., 2000; Catterall et al., 2003). Die in Klammern angeführten Termini entsprechen der älteren Nomenklatur. Auf die spezifischen elektrophysiologischen wie pharmakologischen Charakteristika der einzelnen α1-Untereinheiten wird in Tab. 1.3 und 1.4 im Detail eingegangen.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der porenbildenden, ionenleitenden  $\alpha_1$ -Untereinheit mit ihren vier Domänen aus jeweils sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices sowie je einer Schleife für die Porenregion zwischen Insertionssegment 5 und 6 (Yang and Berggren, 2005). A) Schematische Darstellung der Kalziumkanaluntereinheiten in der Plasmamembran. B) Schema der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit, der intrazellulär lokalisierten  $\beta$ -Untereinheit (1 - 4), der membranassoziierten  $\alpha_2$ - $\delta$  (1 - 4)- sowie der membranständigen  $\gamma$ -Untereinheit (1 - 8). Diese akzessorischen Untereinheiten vermögen die electrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der  $\alpha_1$ -Untereinheit in vielfältiger Weise zu modifizieren.**

Subunit	Gene name	Chromosomal location	Accession number
$\alpha_2\delta_1$	CACNA2D1	7q21-q22	NM_000722
$\alpha_2\delta_2$	CACNA2D2	3p21.3	NM_006030
$\alpha_2\delta_3$	CACNA2D3	3p21.1	NM_018398
$\alpha_2\delta_4$	CACNA2D4	12p13.33	NM_172364
$\beta_1$	CACNB1	17q11.2-q22	NM_000723
$\beta_2$	CACNB2	10p12	NM_000724
$\beta_3$	CACNB3	12q13	NM_000725
$\beta_4$	CACNB4	2q22-q23	NM_000726
$\gamma_1$	CACNG1	17q24	NM_000727
$\gamma_2$	CACNG2	22q13.1	NM_006078
$\gamma_3$	CACNG3	16p12-p13.1	NM_006539
$\gamma_4$	CACNG4	17q24	NM_014405
$\gamma_5$	CACNG5	17q24	NM_145811
$\gamma_6$	CACNG6	19q13.4	NM_031897
$\gamma_7$	CACNG7	19q13.4	NM_031896
$\gamma_8$	CACNG8	19q13.4	NM_031895

**Tab. 1.2: Darstellung der verschiedenen Hilfsuntereinheiten spannungsgesteuerter Kalziumkanäle** (mit Genbezeichnung, chromosomaler Lokalisation und *Accession number* für den Menschen). Vier  $\alpha_2\delta$ -, vier  $\beta$ - und acht  $\gamma$ -Untereinheiten sind bislang beschrieben. (Kamp et al., 2005).

Ca <sup>2+</sup> Current Type	Biophysical Property				Blocker		Localization & Function	
	Activation	Inactivation	Single-channel conductance	Single-channel opening	Relative conductance	Inorganic divalent		Small organic & peptide
L	Positive to -30 mV	Very slow $\tau > 500$ ms	25 pS	Continual reopening	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> > Ni <sup>2+</sup>	DHP	Excitation-contraction coupling (muscles) Hormone secretion (endocrine cells) Tonic neurotransmitter release (retina) Gene expression
P/Q HVA	Positive to -20 mV	Partial $\tau \approx 50-80$ ms	13 pS	Long burst	Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> > Ni <sup>2+</sup>	$\omega$ -Aga IVA	Neurotransmitter release (nerve terminals) Dendritic Ca <sup>2+</sup> transients (dendrites)
N							$\omega$ -CTX GVIA	Neurotransmitter release (nerve terminals) Dendritic Ca <sup>2+</sup> transients (dendrites)
R							SNX 482	Ca <sup>2+</sup> dependent action potentials (cell bodies & dendrites) Neurotransmitter release (nerve terminals)
LVA T	Positive to -70 mV	Complete $\tau \approx 20-50$ ms	8 pS	Brief burst, inactivated	Ba <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup> > Cd <sup>2+</sup>		Repetitive firing (neurons, cardiac and smooth muscles)

**Tab. 1.3: Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und ihre wichtigsten biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften.** L-Typ und Non-L-Typ Kalziumkanäle aktivieren bei Potentialen von -30 mV bis -20 mV. Die Einzelkanalleitfähigkeiten der HVA Kalziumkanäle liegen mit 13 – 25 pS im Vergleich zu den niederspannungsaktivierten Kalziumkanälen (8 pS) deutlich höher. Die Einzelkanalleitfähigkeit variiert dabei z.T. stark in Abhängigkeit von der betrachteten  $\alpha 1$ -Untereinheit. Gewöhnlich wird die Einzelkanalleitfähigkeit mittels Barium als Ladungsträger bestimmt, da dieses Ion für Kalziumkanäle permeabel ist, Kaliumkanäle hingegen blockiert und, anders als Ca<sup>2+</sup>, nicht zur Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Inaktivierung beiträgt.

## 1.2. Niederspannungsaktivierte Kalziumkanäle (low-voltage activated calcium channels, LVA)

Die Entdeckung wie auch die elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung der T-Typ-Kalziumkanäle in den letzten sieben Jahren spiegelt einen aufregenden Abschnitt in der Ionenkanalforschung wieder. Im Jahre 1975 detektierte Hagiwara in Seestern-Eiern eine Kalziumstromkomponente, die sich im weiteren Verlauf der Forschung als niederspannungsaktiviert herausstellte und, wie v.a. durch intensive Arbeiten von Llinas gezeigt, für die Generierung sog. *low-threshold calcium spikes* (LTCS) von entscheidender Bedeutung ist. Diese LTCS sind physiologisch und pathophysiologisch von zentraler Bedeutung für oszillatorische Prozesse innerhalb des ZNS und wahrscheinlich in einer Vielzahl anderer Gewebe. Die ganze Bandbreite wissenschaftlicher Erkenntnis zu den T-Typ-Kanälen übersteigt den Rahmen dieser Darstellung. Es seien daher nur einige Schwerpunktthemen gesondert hervorgehoben.

Niederspannungsaktivierte Kalziumkanäle haben ein ausgedehntes Expressionsmuster innerhalb des Säugerorganismus. So findet man sie, in unterschiedlicher Distribution ihrer einzelnen Subtypen,  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  und  $Ca_v3.3$ , beispielsweise im Herzen, der Niere, der glatten Muskulatur, einer Vielzahl endokriner Organe und v.a. auch im Zentralnervensystem. Der T-Typ vermittelte Kalziumeinstrom in die Zelle ist an einer Reihe entscheidender physiologischer Prozesse, wie Hormonsekretion, glattmuskulärer Kontraktion, Myoblastenfusionsvorgängen, Fertilisation und der Modulation neuronaler Aktivitätsmodi beteiligt.

Letztere Eigenschaft ist innerhalb des Zentralnervensystems von entscheidender Bedeutung, da unter Mitwirkung niederspannungsaktivierter Kalziumkanäle Prozesse wie Schlaf- und Aufwachreaktion oder die Weiterleitung somatosensorischer Informationen über den Thalamus zum Neocortex erfolgen (Kim et al., 2001; Anderson et al., 2005). Störungen in diesem System, die auch als thalamokortikale Dysrhythmien bezeichnet werden, stehen in Beziehung zu einer Vielzahl neurologischer Krankheitsbilder, wie dem Ruhetremor (z.B. bei Morbus Parkinson), Tinnitus, neuropsychiatrischen Störungen, neurogenen Schmerzen und der *Absencen*-Epilepsie. Ein Überblick über die wichtigsten elektrophysiologischen und pharmakologischen Parameter der T-Typ-Kalziumkanäle findet sich in Tab. 1.4.

**Tab. 1.4: Pharmakologie und Elektrophysiologie der T-Typ-Kalziumkanäle Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 und Ca<sub>v</sub>3.3**

(modifiziert nach Perez-Reyes E, 2003)

	<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	<b>Ca<sub>v</sub>3.2</b>	<b>Ca<sub>v</sub>3.3</b>	<b>Zitation</b>
<b>Nomenklatur (alternativ)</b>	α1G, Ca <sub>v</sub> T.1	α1H, Ca <sub>v</sub> T.2	α1I, Ca <sub>v</sub> T.3	Lory et al., 1997
<b>Gen</b>	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1I	Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999; Perez-Reyes et al., 1998a/b)
<b>Lokalisation</b>	17q22	16p13.3	22q12.3-13.3	
<b>Gewebsverteilung</b>	ZNS, Ovarien, Placenta, Herz	Niere, Leber, NNR, ZNS, Herz	ZNS	Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999; Monteil et al., 2000; Perez-Reyes et al., 1998a/b)
<b>Elektrophysiologie*</b>				
Schwellenpotential (mV)	-70	-70	-70	Klößner et al., 1999
IV-Peak (mV)	-30	-30	-30	Klößner et al., 1999
Aktivierungskinetik (ms)	1	2	7	Klößner et al., 1999
Inaktivierungskinetik (ms)	11	16	69	Klößner et al., 1999
Deaktivierungskinetik (ms)	3.0	2.2	1.1	Klößner et al., 1999
Halbmaximales Inaktivierungspotential (mV)	-72	-72	-72	Klößner et al., 1999

**Tab. 1.4: Pharmakologie und Elektrophysiologie der T-Typ-Kalziumkanäle Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 und Ca<sub>v</sub>3.3 (Fortsetzung)**

(modifiziert nach Perez-Reyes, 2003)

	Ca <sub>v</sub> 3.1	Ca <sub>v</sub> 3.2	Ca <sub>v</sub> 3.3	Zitation
<b>Elektrophysiologie*</b>				
Deinaktivierungskinetik (ms)	117	395	352	Klöckner et al., 1999
Leitfähigkeit (pS, Ba <sup>2+</sup> )	7.5	9	11	Lee et al., 1999; Perez-Reyes et al., 1998a/b; Williams et al., 1999
<b>Pharmakologie*</b>				
Nickel (IC <sub>50</sub> , μM)	250	12	216	Lee et al., 1999
Mibefradil (IC <sub>50</sub> , μM) in 10 mM Ba <sup>2+</sup>	1.2	1.1	1.5	Martin et al., 2000
Mibefradil (IC <sub>50</sub> , μM) in 2 mM Ca <sup>2+</sup>	0.27	0.14	-	Martin et al., 2000

\*Anmerkung:

Die Leitfähigkeitswerte wurden in 110 mM Ba<sup>2+</sup>-Lösung bestimmt, während die übrigen Parameter in 1,25 mM Ca<sup>2+</sup> ermittelt wurden. Angaben zur Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik sind das Ergebnis eines Testpotentials auf -10 mV. Die Deaktivierungskinetik wurde bei -90 mV bestimmt. Die Ermittlung der pharmakologischen Parameter zur Nickel- und Mibefradil-Empfindlichkeit erfolgte in 10 mM BaCl<sub>2</sub> (für Nickel) bzw. 10 mM BaCl<sub>2</sub> und 2 mM CaCl<sub>2</sub> (für Mibefradil).

### 1.3. Kardiale Elektrophysiologie - eine grundlegende Vorbetrachtung

Das Herz teilt mit einigen Zentren des ZNS, wie z.B. spezifischen Thalamuskernen, eine exklusive Eigenschaft: die Automtizität bzw. Rhythmizität. Beim Säugerherzen handelt es sich hierbei um eine myogene Automtizität, während bei anderen Tierklassen (z.B. Crustaceae) auch eine neurogene kardiale Automtizität vorliegen kann.

Im Säugerherzen finden sich spontan aktive Schrittmacherzellen, die in ihrer Priorität und Aktivität hierarchisch gestaffelt sind und sowohl durch neuronale (z.B. autonome) als auch humorale Einflüsse in ihrer eigenständigen Grundaktivität modifiziert werden können. Auch die Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems sind wie das Arbeitsmyokard myogenen Ursprungs, haben aber im Laufe der ontogenetischen Ausdifferenzierung eine signifikante strukturelle und damit auch funktionelle Modifikation erfahren, die sie für ihre besondere Funktion prädestinieren.

Der primäre Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten (Nodus sinuatrialis, Keith-Flack-Knoten), der aus einigen hundert Zellen unterschiedlicher Morphe (*spindle cells*, *spider cells*, *elongated cells* etc.) besteht und an der Hinterwand des Atrium dextrum im Bereich des Confluens sinuum der Vena cava superior und Vena cava inferior lokalisiert ist. Er stellt eine phylogenetische Remineszenz an den bei geringer differenzierten Tieren (z.B. den Knorpelfischen) vorzufindenden Sinus venosus dar, der in seiner „reduzierten“ Form zum Sinusknoten des Säugerherzens wurde. Die hier entstehende Erregung wird über das Vorhofmyokard auf den AV-Knoten übergeleitet. Häufig liegen distinkte Leitungsbahnen für den Erregungstransfer über die Vorhöfe vor, wie z.B. das sog. Kent-, James-, Bachmann- oder Mahaim-Bündel. Diese anatomischen Strukturen können ursächlich für das Entstehen von sog. Präexzitationssyndromen beim Menschen sein, wie z.B. das Wolf-Parkinson-White-Syndrom (WPW-Syndrom, Kent-Bündel) und das Lown-Genong-Lewine-Syndrom (James-Bündel). Der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten, Nodus atrioventricularis, Aschoff-Tawara-Knoten) ist auf der rechten Seite des Septum interatriale am Übergang zwischen Vorhof und Ventrikel lokalisiert. Hierbei stellt der AV-Knoten bei nicht Vorhandensein von akzessorischen Leitungsbahnen die einzige elektrisch leitende Verbindung über die sog. Ventilebene dar. Bei letzterer handelt es sich um die bindegewebige Trennschicht (funktioneller Isolator) zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln. Im oberen Septum interventriculare entspringt aus

dem Nodus atrioventricularis das His-Bündel (Truncus fasciculi atrioventricularis). Dieses überwindet die Barriere der Ventilebene und leitet die AV-Knotenerregung auf die Ventrikel über. Nodus atrioventricularis und His-Bündel werden auch zusammenfassend als Fasciculus atrioventricularis bezeichnet. Das His-Bündel teilt sich im Folgenden in einen rechten und einen linken Schenkel (Kammerschenkel, rechter und linker Tawara-Schenkel, Crus dextrum et sinistrum), wobei der linke Tawara-Schenkel sich weiter in ein vorderes und ein hinteres Hauptbündel (Pars anterior et posterior) aufzweigt. Es schliesst sich die terminale Feinverzweigung in die sog. Purkinjefasern an, die die Erregung auf das Arbeitsmyokard (*working myocardium*), und zwar zunächst auf die Innenschichten des Ventrikelmyokards, übertragen.

Wie bereits oben erwähnt, sind die Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems myogenen Ursprungs; dennoch zeigen sie aufgrund ihrer funktionellen Differenzierung morphologisch und auf subzellulärer Ebene deutliche Unterschiede. Das Vorhandensein kontraktile Elemente (Sarkomere) ist begrenzt; ähnliches gilt für das T-Tubuli-System sowie die Mitochondrien. Der Glykogengehalt ist dagegen verhältnismässig hoch und die Enzymausstattung des anaeroben Stoffwechsels höher als beim Arbeitsmyokard. Purkinje-Fasern, die über grosse Glykogenspeicher verfügen und u.a. ihrem Nachweis dienen können, sind an der myoendokrinen Funktion des Herzens beteiligt, da sie in kernnahen Granula atriales natriuretisches Peptid (ANP, atriales natriuretisches Faktor, ANF) speichern. Wahrscheinlich findet sich auch der hirnspezifische natriuretische Faktor (*brain natriuretic peptide*, BNP) im Herzen, allerdings vornehmlich im Ventrikel und so gut wie nicht in den Atrien. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass das Herz nicht nur autokrine und parakrine Funktionen ausübt, sondern über seine ANP-Freisetzung eine Reihe wichtiger kardiovaskulärer Kontrollmechanismen modulieren kann. So führt die Dehnung der Vorhöfe, wahrscheinlich über die Aktivierung von dehnungssensitiven Mechanorezeptoren, zu einer Freisetzung des ANP und sodann zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von NaCl (natriuretische Wirkung) und Wasser. Die Volumenreduktion resultiert sodann in eine Reduktion des Blutdrucks. Auf Vorhofebene spricht man dann vom sog. Bainbridge-Reflex und auf Ebene des linken Ventrikels vom Bezold-Jarisch-Reflex. Eine Aktivierung von Vorhofdehnungsrezeptoren kann aber auch eine Senkung der Adiuiretinfreisetzung (Antidiuretisches Hormon (ADH), Vasopressin) zur Folge haben. Man spricht dann

vom Gauer-Henry-Reflex. Auch unter pathophysiologischen Gesichtspunkten spielt ANP eine wichtige Rolle, z.B. bei der AV-Knoten-*Reentry*-Tachykardie. Im Rahmen der Tachykardie und Hypertonie kommt es zu einer vermehrten ANP-Freisetzung mit Natriuresis und nachfolgend charakteristischem Harndrang.

Um eine geordnete, koordinierte Erregung des Arbeitsmyokards zu gewährleisten, ist eine schnelle Ausbreitung der Exzitationsfront essentiell. Da dies über chemische Synapsen nicht zu bewerkstelligen ist, verfügt der Herzmuskel über eine sog. elektrische Kopplung mittels *gap junctions* (Connexone, Maculae communicantes) im Bereich der *Disci intercalati* (Glanzstreifen). *Gap junctions* entstehen durch die Aneinanderlagerung zweier transmembranärer porenförmiger Proteinkomplexe (Connexine, Cx) zweier benachbarter Zellen. Sie besitzen eine hohe elektrische Leitfähigkeit (geringen elektrischen Widerstand), was eine extrem schnelle Erregungsüberleitung von einer Zelle zur nächsten gewährleistet. Das Myokard verhält sich damit wie ein funktionelles Synzytium. Heute weiss man, dass eine Vielzahl von verschiedenen Connexinen im Herzen exprimiert wird. So finden sich im Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des menschlichen Herzens vornehmlich Cx40 und Cx43, im ventrikulären Arbeitsmyokard Cx43 und Cx45 sowie im Vorhof alle drei Varianten. Im Erregungsleitungssystem ist die Dichte der *gap junctions* besonders hoch, mit maximalen Werten in Purkinjefasern. Untersuchungen an transgenen Mäusen haben eindrucksvoll gezeigt, welche funktionelle Bedeutung die Connexone spielen. So zeigen Cx40 defiziente Mäuse eine Vielzahl von Rhythmusstörungen, wie z.B. Vorhoffarrhythmien, sinuatriale Blockierungen, atriale Extrasystolen, AV-Blöcke etc. (Simon et al., 1998; Hagendorff et al., 2001).

Die myogenen kardialen Automtizitätszentren unterliegen einer klaren Hierarchie, deren funktionelle Grundlage ihre intrinsische Frequenz darstellt. Der Sinusknoten ist mit einer Eigenfrequenz von 60 - 80/min der primäre Schrittmacher und damit Taktgeber. Fällt er aus pathophysiologischen Gründen aus, können untergeordnete Schrittmacherzentren seine Funktion übernehmen wie z.B. der AV-Knoten (40 - 50/min Eigenfrequenz) als sekundärer Schrittmacher oder auch das His-Bündel oder die Tawara-Schenkel als tertiäre Schrittmacher mit einer Eigenfrequenz von 30 - 40/min. Diese Schrittmacher bezeichnet man unabhängig ihrer hierarchischen Stellung als sog. normotope Schrittmacher. Die Eigenaktivität sekundärer und tertiärer Schrittmacher wird aber durch den höherfrequenten primären Schrittmacher unter physiologischen Bedingungen unterdrückt, ein Vorgang der als *overpacing*

oder auch als sog. myotone (elektrotonische) Depression bezeichnet wird. Den normotopen Schrittmachern stellt man die unter pathologischen Bedingungen auftretenden ektope Schrittmacher gegenüber. Bei letzteren handelt es sich i.d.R. nicht um Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems, sondern um Arbeitsmyokardzellen, die als Ausdruck einer pathologischen kardialen Situation (z.B. Zustand nach Myokardinfarkt, Myokarditis, Hypertrophie etc.) kein stabiles Ruhepotential mehr aufweisen und damit ein potentiell Automtizitätszentrum darstellen können. In solchen Fällen können sich ektope Vorhof- und Kammererregungen bilden, die sich im EKG morphologisch meist deutlich von der orthograden Erregungsausbreitung unterscheiden.

Wesentliche funktionelle Charakteristika des Herzens können durch das autonome Nervensystem, also den Sympathikus und den Parasympathikus in Grenzen moduliert werden. Die sympathischen Fasern, die das Herz erreichen, nehmen ihren Ursprung in den Thorakalsegmenten Th2 - Th4. Hier liegen im Seitenhorn (Cornu laterale) die Somata der präganglionären sympathischen Neuronen, wobei die Umschaltung auf das zweite postganglionäre Neuron im Grenzstrang (Truncus sympathicus, Truncus paravertebralis) erfolgt. Von hier aus ziehen die sympathischen Nervi cardiaci zum Plexus cardiacus. Dessen Fasern erreichen mit ihren Varikositäten, die vornehmlich Noradrenalin (NA), aber auch eine Reihe von Peptidhormonen (wie Neuropeptid Y) freisetzen, nahezu alle Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstrukturen, wie Sinusknoten, AV-Knoten, das ventrikuläre Erregungsleitungssystem, aber auch das Arbeitsmyokard von Atrien und Ventrikeln. Auch die Koronargefäße unterliegen dieser sympathischen Innervation. Die sympathischen Effekte am Herzen lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1) Anstieg der Spontanfrequenz (positiv chronotrope Wirkung), 2) Erhöhung der atrioventrikulären Überleitungsgeschwindigkeit (positiv dromotrope Wirkung), 3) Erhöhung der Kraftentwicklung im Vorhof- und v.a. Kammermyokard (positiv inotrope Wirkung), 4) Beschleunigung der Myokardrelaxation während der Diastole (positiv lusitrope Wirkung). Diese Effekte an den Myokardzellen werden primär über  $\beta_1$ -Adrenozeptoren vermittelt, während die vasodilatatorischen Effekte an den Koronargefäßen vornehmlich über  $\beta_2$ -Rezeptoren vermittelt werden.

Die parasympathische Versorgung des Herzens erfolgt über den Nervus vagus. Der Vagus, dessen 1. Ganglienzellen im Nucleus dorsalis nervi vagi in der Medulla oblongata ihren Ausgang nehmen, werden herznah auf das zweite Neuron

umgeschaltet. Kardiale Rezeptoren des parasympathischen Transmitters Azetylcholin sind die ionotropen muskarinischen Azetylcholin-Rezeptoren M2 und M4. Die Auswirkungen des Parasympathikus betreffen im Gegensatz zum Sympathikus primär die Vorhofebene, den Sinus- und den AV-Knoten. Die Wirkung des Parasympathikus lässt sich wie folgt charakterisieren: 1) negativ chronotrope Wirkung, 2) negativ dromotrope Wirkung sowie 3) negativ inotrope Wirkung.

## 1.4. Ionale Grundlagen der myogenen Automtizität im Herzen

### 1.4.1. Vorbetrachtung

Aus der Familie der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle sind in der Vergangenheit die L-Typen  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$  sowie die T-Typen  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  im Herzen nachgewiesen worden. Bevor auf deren funktionelle Relevanz und die Bedeutung des R/E-Typs  $Ca_v2.3$  im kardiovaskulären System näher eingegangen wird, soll zunächst die Ionenverteilung im Erregungsbildungs- und Leitungssystem und damit die ionalen Grundlagen kardialer Automtizität, Rhythmizität und Erregungsfortleitung im Detail erörtert werden. Die koordinierte Kontraktion und Relaxation der Herzvorhöfe und Ventrikel im Rahmen des Herzzyklus garantiert die regelrechte Pumpfunktion des Herzens. Dies setzt eine präzise Erregung des Myokards in einem bestimmten zeitlichen Muster voraus, was v.a. durch das Erregungsbildungs- und Leitungssystem gewährleistet wird. Aktionspotentiale des Herzens zeigen eine unterschiedliche Morphologie in Abhängigkeit vom Zelltyp, der sie generiert. Eine normale kardiale Erregungswelle hat ihren Erregungsursprung im Sinusknoten, breitet sich sodann über die Atrien aus und gelangt zum AV-Knoten. Über das His-Bündel und den rechten und linken Tawara-Schenkel erfolgt letztlich die terminale Ramifikation in das Purkinjefaser-System. Da die Maus zentrales kardiovaskuläres Forschungsobjekt ist, orientiert sich die folgende Darstellung primär an der Herzanatomie und Physiologie der Maus, wobei relevante Unterschiede zum Menschen hervorgehoben werden.

### 1.4.2. Sinusknoten (Nodus sinuatrialis, Keith-Flack-Knoten)

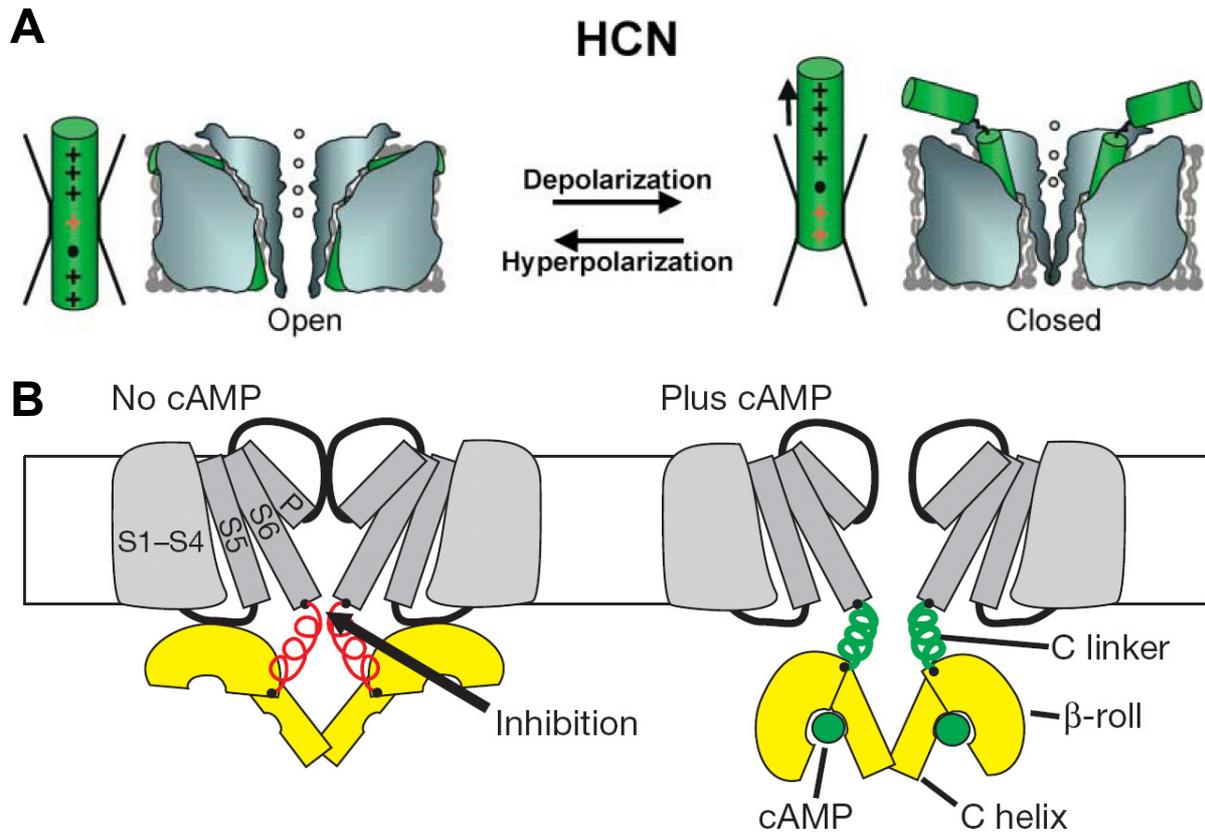
Der Sinusknoten (SAN) findet sich bei der Maus zwischen der Einmündung der Vena cava superior und Vena cava inferior sowie lateral der Crista terminalis. Der

Sinusknoten stellt den primären Schrittmacher dar. Beim Menschen beträgt seine Ruheaktivität 60 - 70 /min, bei der Maus etwa das 10-fache. Die Kontrolle der Herzfrequenz und damit auch die Adaptationsmöglichkeiten an unterschiedliche physiologische Anforderungen erfolgt über die beiden Äste des autonomen Nervensystems, den Sympathikus und den Parasympathikus.

Sinusknotenzellen gehören zu einer Gruppe einzigartiger Zellen in der Natur, da sie über die Fähigkeit der Autorhythmizität verfügen, eine Eigenschaft, die sie nur mit wenigen anderen Zellen, v.a. im Zentralnervensystem teilen. Die Ursache für diese bemerkenswerte Eigenschaft ist in der Ausstattung der Zellen mit einer Vielzahl spannungsgesteuerter und z.T. auch ligandengesteuerter Ionenkanäle begründet. Der Sinusknoten zeigt eine Gliederung in verschiedene, annähernd konzentrische Zonen und geht schließlich in das typische atriale Arbeitsmyokard über. Aktionspotentiale der längsten Dauer finden sich im Zentrum des Sinusknotens, wodurch u.a. die Einflussnahme ektooper Schläge minimiert wird und die Dominanz des Sinusknotens als primärer Schrittmacher gewährleistet wird. Störungen der Sinusknotenfunktion können zu Bradyarrhythmien, zu Kombinationen von Bradykardien und Tachykardien (*Sick Sinus Syndrome*, SSS) und Synkopen führen (Rubenstein et al., 1972).

Im Sinusknoten finden sich unterschiedliche Zelltypen, sog. *spider cells*, *spindle cells* und elongierte Zellen (Wu et al., 2001). Diese Zellen erfahren einen cholinergen und  $\beta$ -adrenergen *Input*, wodurch die Spontanaktivität der Sinusknotenzellen modifiziert werden kann. Welche ionalen Mechanismen liegen nun der elektrischen Aktivität des Sinusknotens zugrunde? Wie Abb. 1.5, 1.6, 1.8 und 1.9 zeigen, steuern eine Vielzahl von spannungsgesteuerten und ligandengesteuerten Ionenkanälen zur Schrittmacherfunktion bei. Eine wesentliche, wenn nicht zentrale Rolle spielen die Hyperpolarisations- und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (HCN1 - 4), die erst kürzlich detektiert und kloniert worden sind und deren Subtypen im Herzen verschiedener Spezies in unterschiedlichen Dichten exprimiert werden (Moosmang et al., 2001; Moroni et al., 2001; Wainger et al., 2001; Biel et al., 2002; Stieber et al., 2003). Sie bilden die strukturelle Grundlage für die nicht-selektive Kationen-Stromkomponente  $I_f$  (f: funny; auch  $I_q$  genannt). Die  $I_f$  Stromdichte ist ca. 70 % höher in *spider*- als in *spindle*-Zellen. Um ihrer Bedeutung gerecht zu werden, wurden sie auch als Schrittmacherkanäle bezeichnet (Baruscotti and DiFrancesco, 2004; Rosenbaum and Gordon, 2004). Mit Ivabradin zeichnet sich derzeit auch ein erster

Blocker ab, der therapeutisch zum Einsatz kommen könnte (DiFrancesco and Camm, 2004).

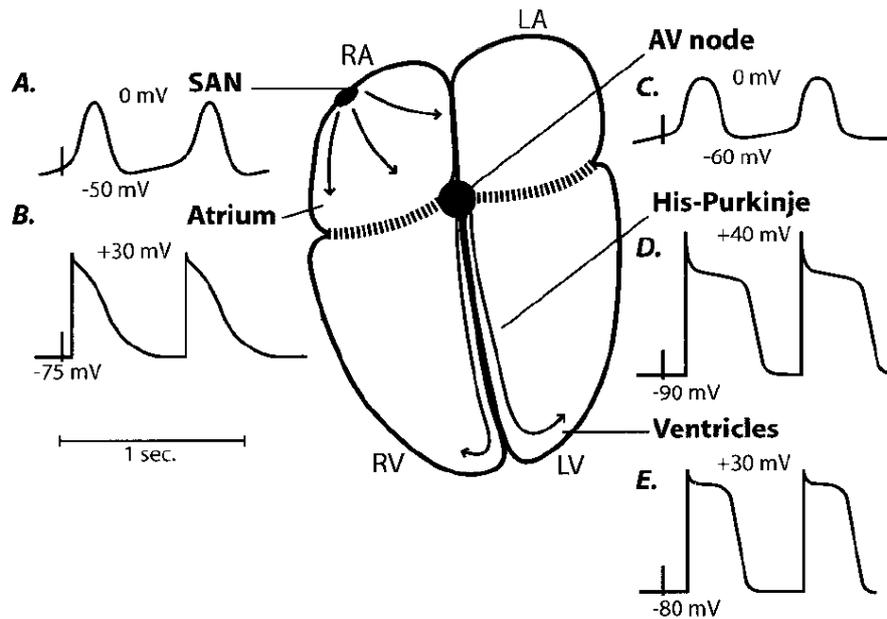


**Abb. 1.3: Struktur Hyperpolarisations- und zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanäle (HCN-Kanäle).** Es handelt sich um homomere Komplexe aus vier Untereinheiten mit jeweils 6 transmembranären Helices (S1 - S6). A) Wie bei spannungsgesteuerten Kalziumkanälen fungieren S4-Segmente als Spannungssensoren, da sie reich an positiv geladenen Aminosäuren sind. Bei Depolarisation verlagern sich diese S4-Segmente in Richtung der Membranaussenseite und es kommt konformationsbedingt zu einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit, der Kanal „schließt“. B) Eine Linkerstruktur am C-Terminus verknüpft diese mit der zyklisch-Nukleotid bindenden Domäne (CNBD), welche eine  $\beta$ -roll sowie C-Helix beinhaltet. Die Bindung von cAMP an die CNBD führt über eine Konformationsänderung zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Rosenbaum and Gordon, 2004).

Zur langsamen diastolischen Depolarisation tragen weiterhin eine L-Typ-Stromkomponente ( $I_{Ca,L}$ ), getragen durch  $Ca_v1.3$  ( $\alpha1D$ ) sowie eine T-Typ Stromkomponente ( $I_{Ca,T}$ ) dar, die durch  $Ca_v3.1$  ( $\alpha1G$ ) und  $Ca_v3.2$  ( $\alpha1H$ ) getragen wird. Quantifizierende in situ Hybridisierungsexperimente an der Maus haben dabei

gezeigt, dass das Transkriptniveau für  $Ca_v3.1$  ( $\alpha1G$ ) innerhalb des Erregungsbildungs- und Leitungssystems wesentlich höher ist als für  $Ca_v3.2$  ( $\alpha1H$ ). Weiterhin ist die Transkriptmenge für  $Ca_v3.1$  im Sinusknoten der Maus etwa 30-fach höher als im Mausatrium (Bohn et al., 2000). Obwohl die  $Ca_v3.2$  Transkriptmenge generell geringer als für  $Ca_v3.1$  ist, sind auch für  $Ca_v3.2$  die Transkriptmengen im Sinusknoten höher als im Atrium (Bohn et al., 2000). Während  $Ca_v1.3$  ( $\alpha1D$ ) an der langsamen diastolischen Depolarisation partizipiert, bewerkstelligt der L-Typ  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) den Aufstrich (*upstroke*) des Sinusknotenaktionspotentials (Irisawa et al., 1993; Guo et al., 1997). Auch der verzögerte Kaliumgleichrichterstrom ( $I_{Kr}$ ) beeinflusst die Schrittmacheraktivität. Eine nicht unwesentliche Kontroverse ist über den Charakter einer Hintergrundstromkomponente (*sustained inward current* ( $I_{st}$ )) entbrannt, die eine Permeabilität für  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  zeigt und an der Sinusknotenzellen-Depolarisation mit beteiligt sein soll (Verheijck et al., 1999). Das Fehlen einer einwärts gleichrichtenden Kalium-Stromkomponente ( $I_{Kl}$ ) erklärt das verhältnismäßig positive maximale diastolische Potential (MDP) der Sinusknotenzellen.

Sinusknotenzellen verfügen somit im Gegensatz zu anderen erregbaren Zellen über kein stabiles Ruhepotential. Ausgehend von einem vergleichsweise positiven maximalen diastolischen Potential (-50 mV) vermitteln die oben angeführten Ionenkanalentitäten die langsame diastolische Depolarisation (Phase 4) bis zum Erreichen der Aktivierungsschwelle für den spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$ . Die Potentialänderung während der Aufstrichphase (Phase 0) ist gering ( $V_{max} < 2$  V/s) (Bleeker et al., 1980).

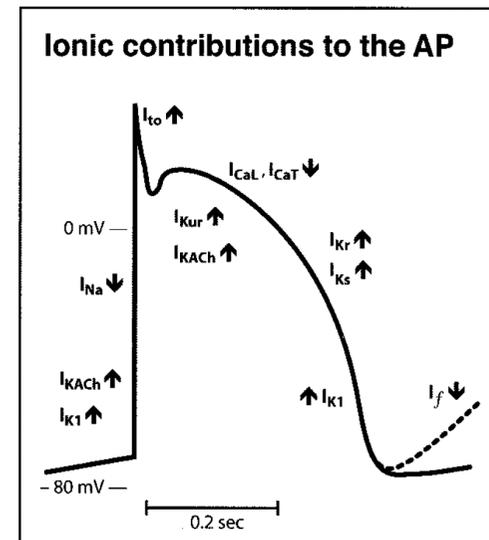


**Abb. 1.4: Elektrische Einzelzellaktivität in den verschiedenen Regionen des Herzens.** Primäre (Sinusknoten, SAN) und sekundäre (AV-Knoten) Schrittmacherzentren weisen kein stabiles Ruhepotential auf. Das maximale diastolische Potential liegt bei -50 bis -60 mV. Das His-Purkinje-System, atriale und ventrikuläre Arbeitsmyokardzellen zeigen ein deutliches Plateau, das dem HVA L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$  zuzurechnen ist (Schram et al., 2002).

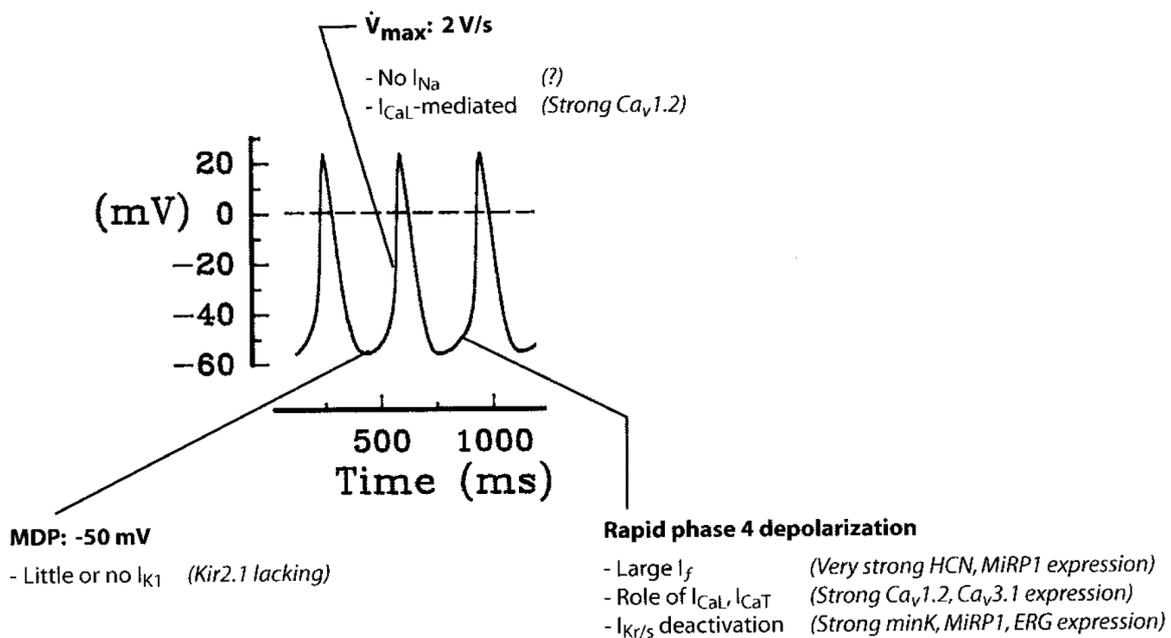
**Abb. 1.5: Überblick über die kardialen Ionenkanal-Untereinheiten, die zugrunde liegenden Ströme sowie deren Funktion und Lokalisation (siehe folgende Seite).** Diese Auflistung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Für eine Vielzahl von Stromkomponenten ist die Zuordnung zu einer oder mehreren definierten Kanaluntereinheiten noch unklar. Inset: Veranschaulichung der einzelnen Stromkomponenten und deren Beitrag zu einem Aktionspotential, wie man es z.B. bei einer His- oder Purkinjefaser findet. Auswärtsströme sind durch nach oben gerichtete, Einwärtsströme durch nach unten gerichtete Pfeile gekennzeichnet (Schram et al., 2002).

Subunit	Corresponding Current	Primary Function	Demonstrated Localization
HCN	$I_f$ (pacemaking)	Diastolic depolarization	SAN>>PF>A~V
Kir2.1	$I_{K1}$	Resting potential, terminal repolarization	V>A>>SAN
Kir3.1/3.4	$I_{KACh}$	Mediates acetylcholine effects	SAN~A>>V
ERG	$I_{Kr}$ ( $\alpha$ -subunit)	Phase-3 repolarization	Present in all tissues. LA>RA; ?V>PF
MiRP1	Modulates $I_{Kr}$ , $I_f$ , $I_{to}$	?	SAN>>A>V
KvLQT1	$I_{Ks}$ ( $\alpha$ -subunit)	Phase-3 repolarization (esp. with $\beta$ -adrenergic stimulation, $I_{Kr}$ inhibition)	Abundant in A and V. ?V>PF. ?Dominant-negative isoform in M-cells>epi or endo
minK	$I_{Ks}$ ( $\beta$ -subunit)	Necessary to form $I_{Ks}$ with KvLQT1.	SAN>>A~V
Kv4.2/4.3	$I_{to}$ ( $\alpha$ -subunit)	Early (phase-1) repolarization	Present in A and V. Species-specific. ?V>PF.
Kv1.4	$I_{to}$ ( $\alpha$ -subunit)	Early (phase-1) repolarization	Important in some species (rabbit). ?Endo dominance (ferret).
KChIP2	$I_{to}$ ( $\beta$ -subunit)	Necessary to form $I_{to}$ .	Epi>endo in man and dog.
Kv1.5/3.1	$I_{Kur}$	Phase 1-2 repolarization.	Atrial-specific. (Kv1.5 man; Kv3.1 dog).
$Ca_v1.2$	$I_{CaL}$ ( $\alpha$ -subunit)	Maintenance of plateau. Electromechanical coupling. Automaticity, conduction SAN, AVN	SAN>A. ?V>PF.
$Ca_v1.3$	$I_{CaL}$ component	Role in SAN function in mice.	?Weakly expressed in SAN, A.
$Ca_v3.1-3.3$	$I_{CaT}$	?Role in pacemaking	SAN>>A. ?PF>V.
$Na_v1.5$	$I_{Na}$	Conduction A, V, PF	Strong in A, V. Absent in compact AVN.
Cx40,43,45	$I_{GJ}$	Intercellular conduction	Cx43 strong in A, V, PF; absent in central SAN, AVN. Cx40 strong in central SAN, also present in A. Cx45 in peripheral SAN, central AVN, PF.

**Abbreviations: Subunits:** HCN=hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide binding channel subunit; Kir=Inward-rectifier K<sup>+</sup>-channel subunit; ERG=ether-a-go-go related channel subunit; MiRP1=minK-related channel subunit-1; KvLQT1=Long-QT Syndrome-1 related channel subunit; minK=minimal K<sup>+</sup>-channel subunit; Kv=voltage-gated K<sup>+</sup>-channel subunit; KChIP2=Kv-channel interacting subunit-2;  $Ca_v$ =voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channel subunit;  $Na_v$ =voltage-gated Na<sup>+</sup>-channel subunit; Cx=connexin hemichannel subunit. **Currents:**  $I_f$ =“funny” current (also called “ $I_h$ ” or hyperpolarization-activated current);  $I_{K1}$ =inward-rectifier K<sup>+</sup>-current;  $I_{KACh}$ =acetylcholine-dependent current;  $I_{Kr}$ =rapid component of delayed-rectifier current ( $I_K$ );  $I_{Ks}$ =slow component of  $I_K$ ;  $I_{to}$ =transient outward K<sup>+</sup>-current;  $I_{Kur}$ =ultrarapid  $I_K$ ;  $I_{CaL}$ =L-type Ca<sup>2+</sup>-current;  $I_{CaT}$ =T-type Ca<sup>2+</sup>-current;  $I_{Na}$ =Na<sup>+</sup>-current;  $I_{GJ}$ =gap-junctional current. **Tissues:** SAN=sinoatrial node; AVN=atrioventricular node; V=ventricle, A=atrium; PF=Purkinje fibre; LA=left atrium; RA=right atrium; epi=epicardium; endo=endocardium.



## SA Node



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung einer Aktionspotentialfolge einer Sinusknotenzelle.** Darstellung der wichtigsten elektrophysiologischen Parameter: Das maximale diastolische Potential liegt mit -50 mV deutlich positiver als das anderer Kardiomyozyten. Eine Vielzahl von Ionenkanalentiäten sowie die zugehörigen Ionenstromkomponenten wurden in den letzten Jahren entdeckt und kloniert. Man beachte, dass es sich um ein rein  $\text{Ca}^{2+}$ -getragenes Aktionspotential handelt. (Wu et al., 2001; Schram et al., 2002). Siehe auch Abkürzungsverzeichnis in Abb. 1.5.

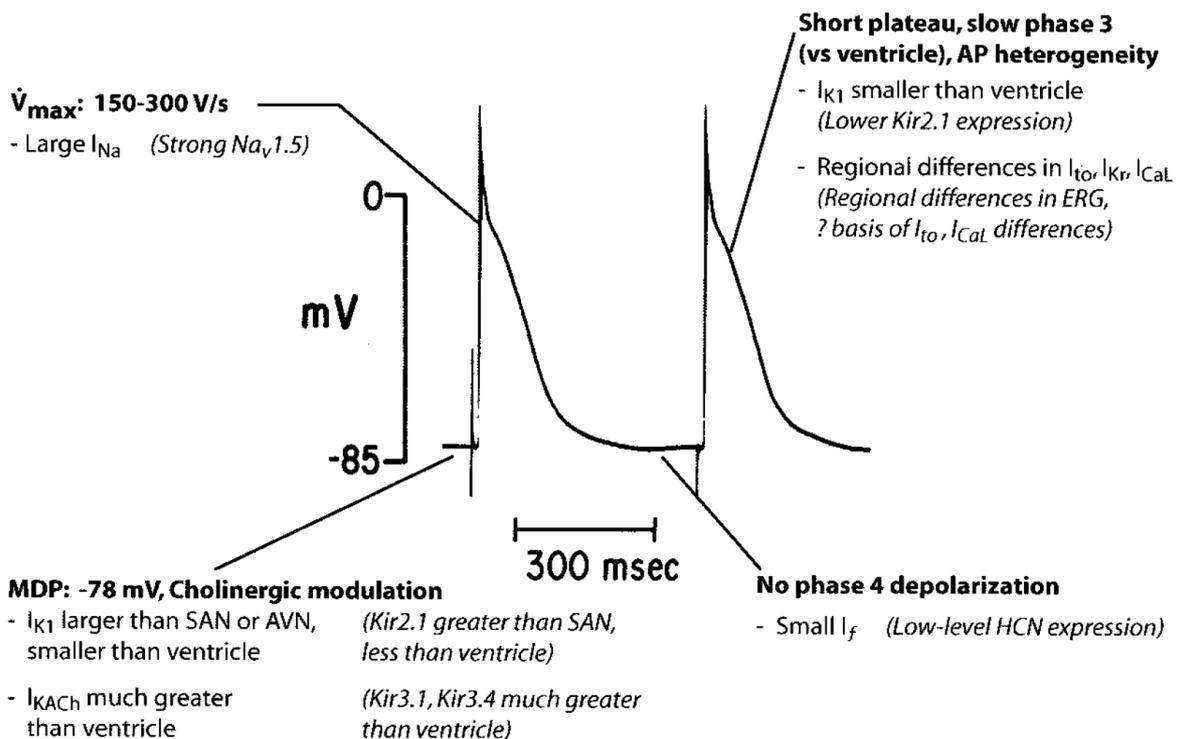
### 1.4.3. Atriales Arbeitsmyokard

In atrialen Arbeitsmyokardzellen liegt, im Vergleich zu Sinusknotenzellen, ein deutlich negativeres maximales diastolisches Potential von ca. -70 bis -80 mV vor (Wang et al., 1990; Yamashita et al., 1995; Yue et al., 1997; Li et al., 2001). Dennoch ist das maximale diastolische Potential in ventrikulären Arbeitsmyokardzellen nochmal 5 - 10 mV negativer als in atrialen (s.u.). Eine Phase 4 Spontandepolarisation findet sich nur in geringem Ausmaß oder gar nicht. Weiterhin zeigt sich durchaus eine elektrophysiologische Heterogenität, z.B. hinsichtlich der Aktionspotentialdauer zwischen unterschiedlichen Vorhofregionen, eine Beobachtung, die eine wichtige Rolle bei atrialen *Reentry*-Arrhythmien zu spielen scheint (Hogan et al., 1968; Spach et al., 1989; Feng et al., 1998; Fareh et al., 1998). So nimmt die Aktionspotentialdauer von der Crista terminalis in Richtung der Musculi pectinati ab,

was die koordinierte Erregungsausbreitung vom Sinusknoten zum AV-Knoten fördert (Spach et al., 1989).

Tiermodelle und klinische Studien deuten darauf hin, dass das linke Atrium eine wichtige Rolle bei der Genese atrialer Fibrillationen spielt (Morillo et al., 1995; Harada et al., 1996; Roithinger et al., 1999; Mandapati et al., 2000). Auch elektrische Aktivität, die ihren Ursprung in den Pulmonalvenen zu haben scheint, kann atriale Fibrillation triggern (Haissaguerre et al., 1998). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass parasymphatische Stimulation zu einer unterschiedlich starken Verkürzung des atrialen Aktionspotentials führen und damit einen profibrillatorischen Effekt haben kann (Ninomiya, 1966; Liu and Nattel, 1997).

## ATRIUM



**Abb. 1.7: Aktionspotentiale atrialer Myozyten.** Darstellung der wichtigsten Eigenschaften des atrialen Aktionspotentials sowie der zugrunde liegenden Ionenstromkomponenten (Spach et al., 1989). Die Repolarisationsphase (Phase 3) zeigt z.T. starke lokalisationsabhängige Schwankungen (Schram et al., 2002). Siehe auch Abkürzungsverzeichnis in Abb. 1.5.

Auch in atrialen Kardiomyozyten sind Kalziumströme vorhanden. So fanden sich im Atrium der Maus Transkripte für  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$ , was mit der Messung von T-Typ-

Strömen korreliert (Yue et al., 1997; Bohn et al., 2000). Weiterhin finden sich  $Ca_v1.2$  Transkripte in großer Zahl in den Vorhöfen.

#### 1.4.4. AV-Knoten

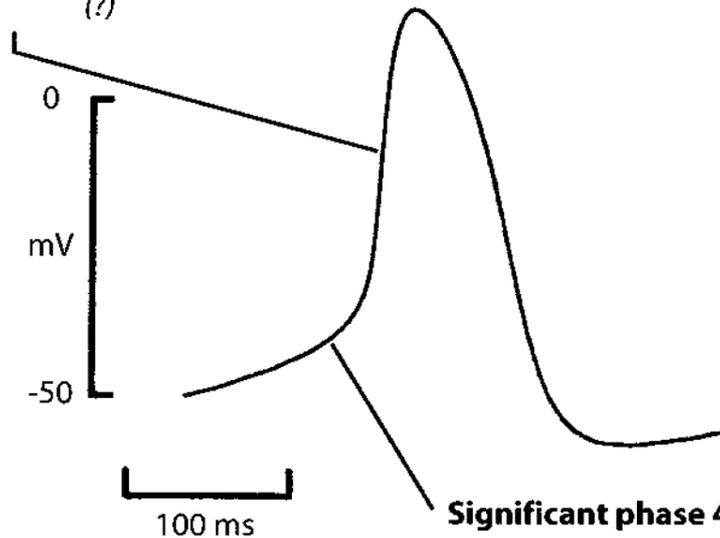
Der AV-Knoten hat eine wichtige Stellung innerhalb des Erregungsleitungssystems inne, indem er die Impulsüberleitung von den Atrien auf die Ventrikel kontrolliert, eine Eigenschaft, die im wesentlichen auf einer geringeren Exzitabilität und einer längeren Postrepolarisations-Refraktärzeit beruht (Merideth et al., 1968). Unter elektrophysiologischen Gesichtspunkten fällt auf, dass die Steigung des Aufstrichs (Phase 0) wie auch die Amplitude gering sind (Hoffman et al., 1959). Das maximale diastolische Potential liegt bei ca. -64 mV und  $V_{max} < 20$  V/s (Billette, 1987). Die Morphologie des AV-Knotens ist komplex. Man unterscheidet sog. N-Zellen im kompakten Bereich des AV-Knotens und NH-Zellen im Übergangsbereich zum His-Bündel (Billette, 1987). Heute wird der AV-Knoten in vier Zonen untergliedert: *transitional cell area*, *compact node*, *posterior nodal extension*, *lower nodal cell bundle* (Medkour et al., 1998). AV-Knotenzellen haben das Potential zur Schrittmacherzelle (sekundärer Schrittmacher), vor allem in den unteren Knotenregionen (Watanabe et al., 1968; Tse, 1973; Munk et al., 1996). Unter physiologischen Bedingungen wird diese inhärente Fähigkeit zur Spontanaktivität allerdings durch elektrotonisch-depressive Einflüsse der Atrien unterbunden (Kirchhof et al., 1988). Pathophysiologisch ist der AV-Knoten u.a. für die sog. AV-Knoten *Reentry*-Tachykardien verantwortlich. Hierfür scheinen zwei Fasertypen verantwortlich zu sein, ein schnell leitender Fasertyp mit langer Refraktärzeit und ein langsam leitender mit kurzer Refraktärzeit (Mendez and Moe, 1966a/b; Denes et al., 1973).

Neueste Untersuchungen zu T-Typ-Kalziumkanälen haben gezeigt, dass  $Ca_v3.1$  getragene Kalziumströme einen wichtigen Beitrag zur langsamen diastolischen Depolarisation (Phase 4) in AV-Knoten-Zellen der Maus liefern (Mangoni et al., 2005). Hierauf wird im Detail noch weiter unten eingegangen.

## AVN (ovoid, N-cells)

$\dot{V}_{\max}$ : 20 V/s

- $I_{Na}$  often absent (Little or no  $Na_v1.5$ )
- $I_{CaL}$  mediated (?)



### Significant phase 4 depolarization

- Large  $I_f$  (?)
- Significant  $I_{CaL}$  (?)
- $I_{Kr}$  deactivation (?)

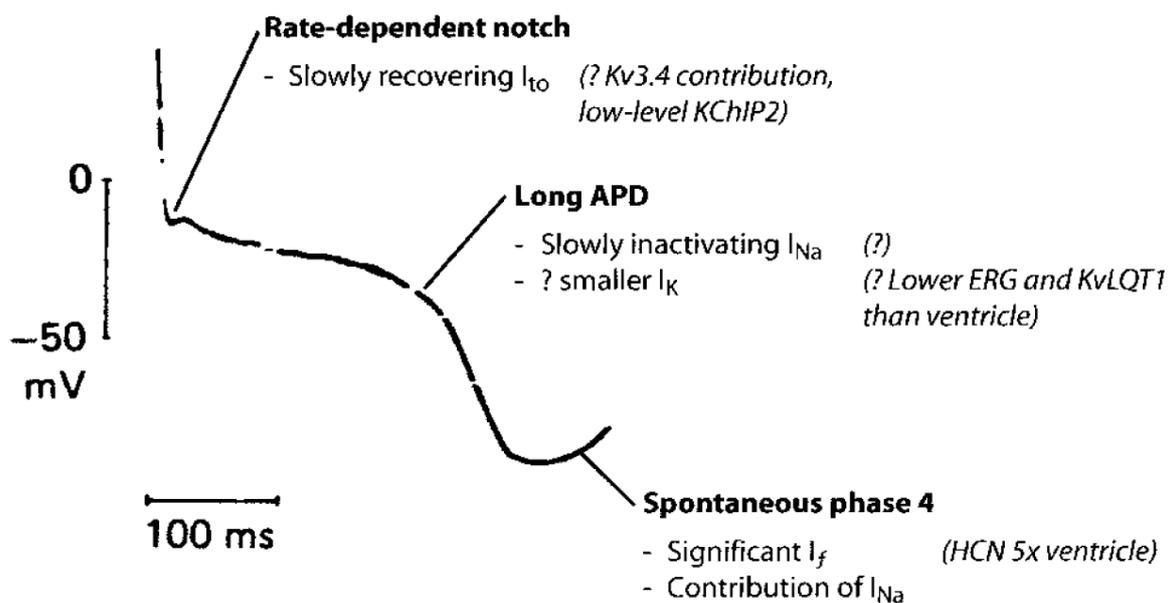
**Abb. 1.8: Aktionspotential einer AV-Knotenzelle.** Darstellung der wichtigsten elektro-physiologischen Parameter und Ionenstromkomponenten. Der AV-Knoten besitzt die Fähigkeit zur myogenen Automatizität und stellt damit einen orthotopen, sekundären Schrittmacher dar, der z.B. bei Sinusarrest die Schrittmacherfunktion übernimmt (Munk et al., 1996; Schram et al., 2002). Siehe auch Abkürzungsverzeichnis in Abb. 1.5.

### 1.4.5. His-Purkinje-System

Das Purkinjenzellsystem ist auf die schnelle Ausbreitung der Erregung über die Ventrikel spezialisiert. Das maximale diastolische Potential (MDP) ist mit durchschnittlich ca. -90 mV etwa 5 - 10 mV negativer als das ventrikulärer Arbeitsmyokardzellen (Davis and Temte, 1969; Kus and Sasyniuk, 1975). Der Aufstrich weist Steigungen von ca. 400 - 800 V/s auf und ist damit noch höher als bei ventrikulären Arbeitsmyokardzellen (150 - 300 V/s); weiterhin ist das Plateaupotential in Purkinjefasern niedriger als in Arbeitsmyokardzellen (Davis and Temte, 1969; Kus and Sasyniuk, 1975). Es ist wichtig hervorzuheben, dass Purkinjefasern kein stabiles Ruhepotential aufweisen (Abb. 1.9), sondern eine deutliche Phase 4 Depolarisation zeigen und damit das Potential zur Generierung eines ventrikulären Ersatzrhythmus haben (Callewaert et al., 1984).

In Purkinjefasern finden sich sowohl L- wie auch T-Typ Ströme, wobei dem T-Typ vermittelten Kalziumeinstrom eine wichtige Bedeutung zukommt (Hirano et al., 1989; Tseng and Boyden, 1989). Die L-Typ Stromdichte in Purkinjefasern ist geringer als in ventrikulären Arbeitsmyokardzellen und korreliert mit ihrer weniger positiven Plateauphase (Phase 2) (Verkerk et al., 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des T-Typ-Stromes in Purkinjefasern deren Automatizität nicht beeinflusst, was nahe legt, dass T-Typ-Kalziumkanäle für die Schrittmacherfunktion in diesen Zellen keine oder eine nur untergeordnete Rolle spielen (Pinto et al., 1999). Die Transkriptlevel von  $Ca_v1.2$  in Purkinjefasern sind niedriger als im Arbeitsmyokard, was mit der Stromdichte korreliert (Verkerk et al., 1999; Han et al., 2001). Dagegen scheint die Expression der T-Typ-Kanäle im Purkinjefaser-System größer zu sein als im Arbeitsmyokard (Han et al., 2001).

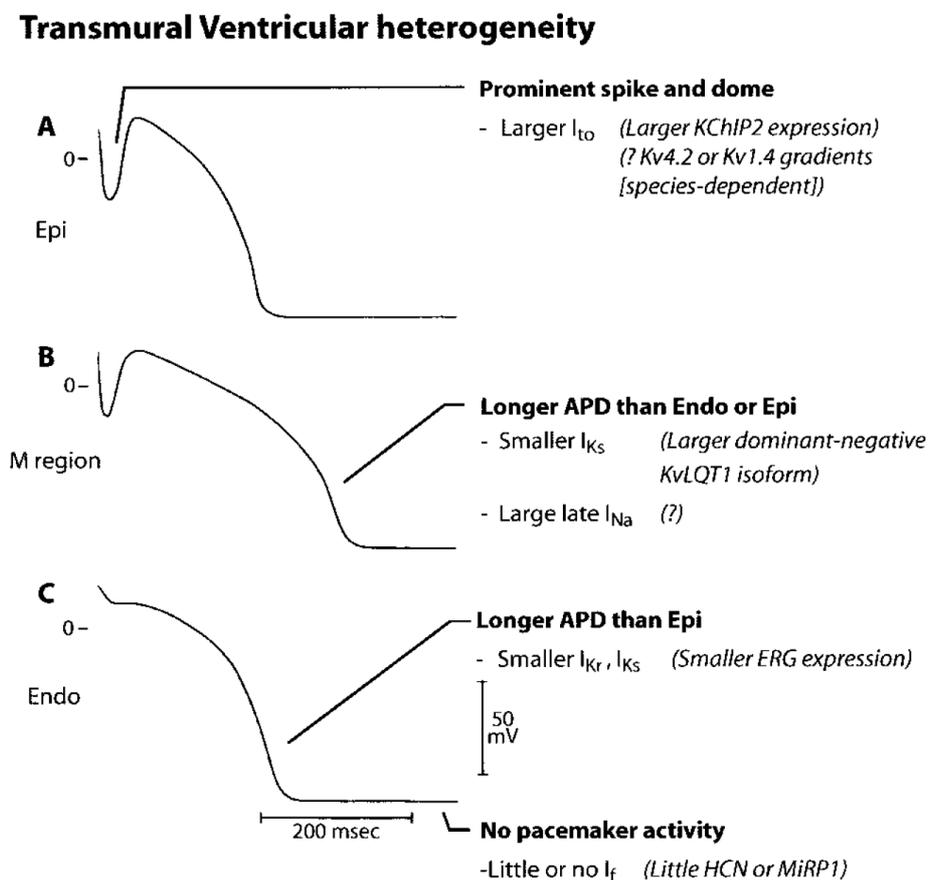
## Purkinje cells



**Abb. 1.9: Elektrophysiologische Charakteristika und ionale Grundlagen des Purkinjenzell-Aktionspotentials** (ohne Phase 0). Auch Purkinjefasern besitzen die Fähigkeit zur Automatizität, wenngleich die Phase 4 -Depolarisationsrate gering ist. Bei einem AV-Block 3. Grades können sie, ähnlich wie His-Zellen, als orthotoper, tertiärer Schrittmacher zur niederfrequenten Ventrikelaktivierung führen. Es liegt dann eine komplette AV-Dissoziation vor, Vorhöfe und Ventrikel schlagen unabhängig voneinander (Callewaert et al., 1984; Schram et al., 2002).

### 1.4.6. Ventrikuläres Arbeitsmyokard

Auf das ventrikuläre Arbeitsmyokard sei an dieser Stelle nur kurz eingegangen. Das maximale diastolische Potential liegt bei ca. -85 mV (Davis and Temte, 1969; Kus and Sasyniuk, 1975; Litovsky and Antzelevitch, 1989), das Plateau ist recht positiv mit Werten um 10 - 20 mV. Weiterhin ist die Phase 3 Repolarisation schnell. Eine relevante Phase 4 Depolarisation gibt es nicht, so dass die Zellen nicht über ein rhythmogenes Potential verfügen. In Abhängigkeit von der Lokalisation gibt es Unterschiede in der Aktionspotentialdauer, der Steilheit des Aufstriches (Phase 0) etc. Die dominante Kalziumstromkomponente ist der L-Typ-Strom, vermittelt durch  $Ca_v1.2$  (Hullin et al., 1999).

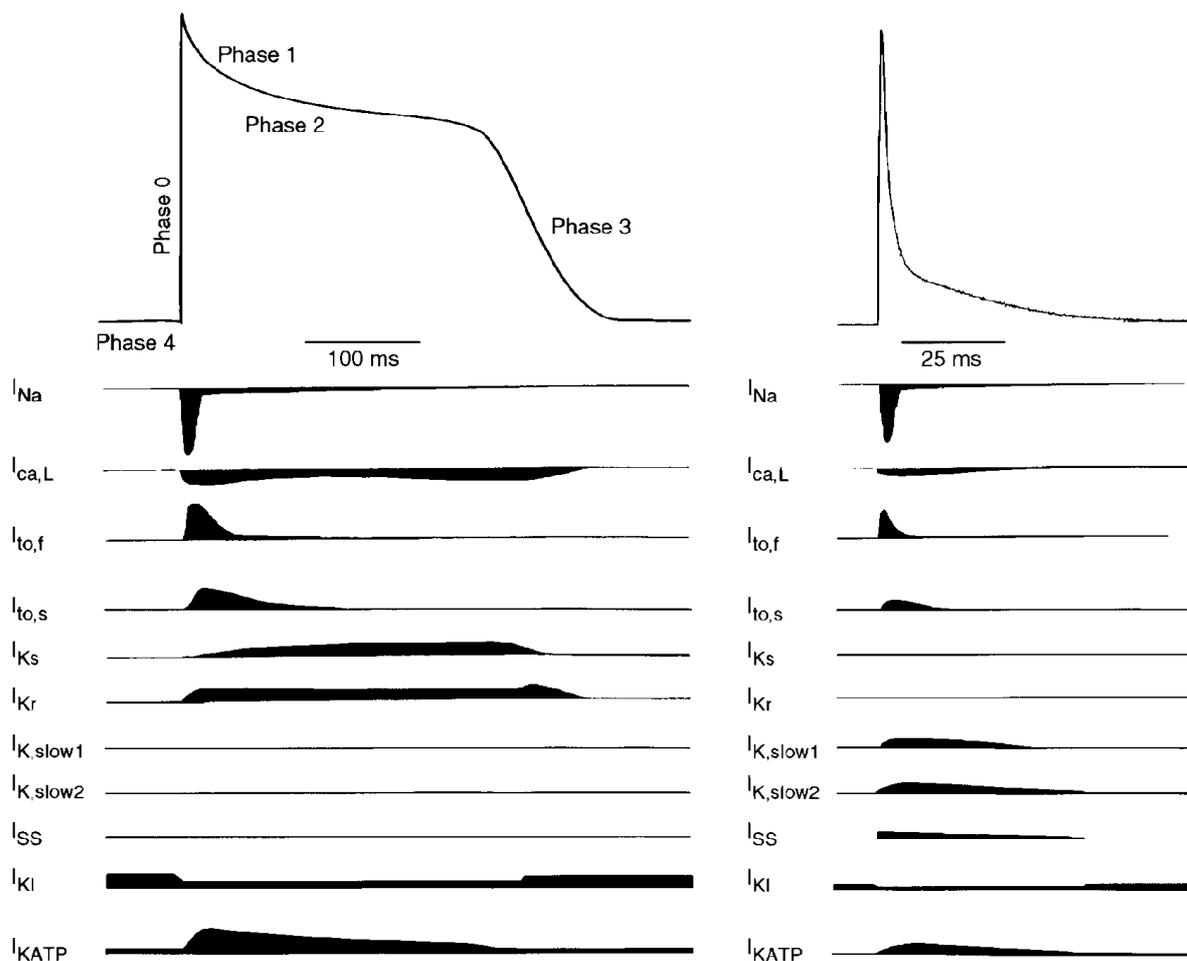


**Abb. 1.10: Elektrophysiologische Charakteristika des ventrikulären Arbeitsmyokards in unterschiedlichen Regionen (epikardial, intramural und endokardial, ohne Phase 0).** Arbeitsmyokardzellen haben ein stabiles Ruhepotential. Im Rahmen pathologischer kardiovaskulärer Veränderungen kann ein modifiziertes Ionenkanalexpressionsmuster zu ektopter Schrittmacheraktivität führen (Sicouri and Antzelevitch, 1991; Schram et al., 2002).

## 1.5. Das Herzmuskelaktionspotential von Mensch und Maus - ein Vergleich

Hinsichtlich der Morphologie des Aktionspotentials gibt es markante Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, aber auch zwischen den verschiedenen Herzarealen selbst. So ist das Aktionspotential ventrikulärer und atrialer Mausmyozyten und auch die elektrophysiologischen Eigenschaften des intakten Mausherzens in einigen Aspekten verschieden vom dem größerer Säugetiere, wie beispielsweise des Menschen. Auch die Grundfrequenz ist mit 600 - 700 Schlägen pro Minute etwa 10-fach höher als beim Menschen. Bei humanen ventrikulären Myozyten werden charakteristischerweise fünf verschiedene Phasen unterschieden: Phase 0, der sogenannte Aufstrich (*upstroke*), der durch einen schnellen Natriumeinwärtsstrom vermittelt wird; Phase 1, die transiente Repolarisation; Phase 2, die Plateau-Phase, Phase 3, die zweite, schnelle Phase der Repolarisation und Phase 4, bei der es sich, abhängig vom Zelltyp, um das Ruhemembranpotential oder die langsame diastolische Depolarisation handelt. In ventrikulären Mausmyozyten findet sich keine eindeutige Plateauphase und der Repolarisationsprozess vollzieht sich außerordentlich schnell. Neben den spannungsgesteuerten Natrium- und Kalziumkanälen, auf die weiter unten im Detail eingegangen werden soll, weisen die Kaliumkanäle die höchste Diversität auf; allerdings finden sich bei Mensch und Maus vergleichbare Kanaltypen. Eine große Zahl von porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten der Kaliumkanäle als auch akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten wurden bis jetzt beschrieben und transgene Mausmodelle haben einen großen Beitrag dazu geleistet, deren funktionelle Relevanz im kardiovaskulären System zu eruieren. Zwei Typen repolarisierender spannungsgesteuerter Kaliumkanäle ( $K_v$ ) lassen sich im Herzen finden: ein transienter Kalium-Auswärtsstrom ( $I_{(to)}$ ) sowie ein verzögerter  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter ( $I_K$ ). Diese Unterscheidung ist zunächst recht grob. So lässt sich die transiente Auswärtsstromkomponente, die der Phase 1 zugrunde liegt, auf eine schnelle und eine langsame transiente Komponente zurückführen ( $I_{to,fast}$  ( $I_{to,f}$ ) und  $I_{to,slow}$  ( $I_{to,s}$ )), die sich durch spezifische elektrophysiologische und pharmakologischen Eigenschaften von einander differenzieren lassen.  $I_{to,f}$  fand sich im rechten und linken Ventrikel sowie im Septum,  $I_{to,s}$  hingegen nur im Septum. Heute weiss man, dass der  $I_{to,f}$ -Komponente die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle  $K_v4.2$  und  $K_v4.3$  und  $I_{to,s}$  der Kanal  $K_v1.4$  zugrunde liegt. Eine Vielzahl von  $I_K$ -Komponenten konnte in der Vergangenheit unterschieden werden. Beim

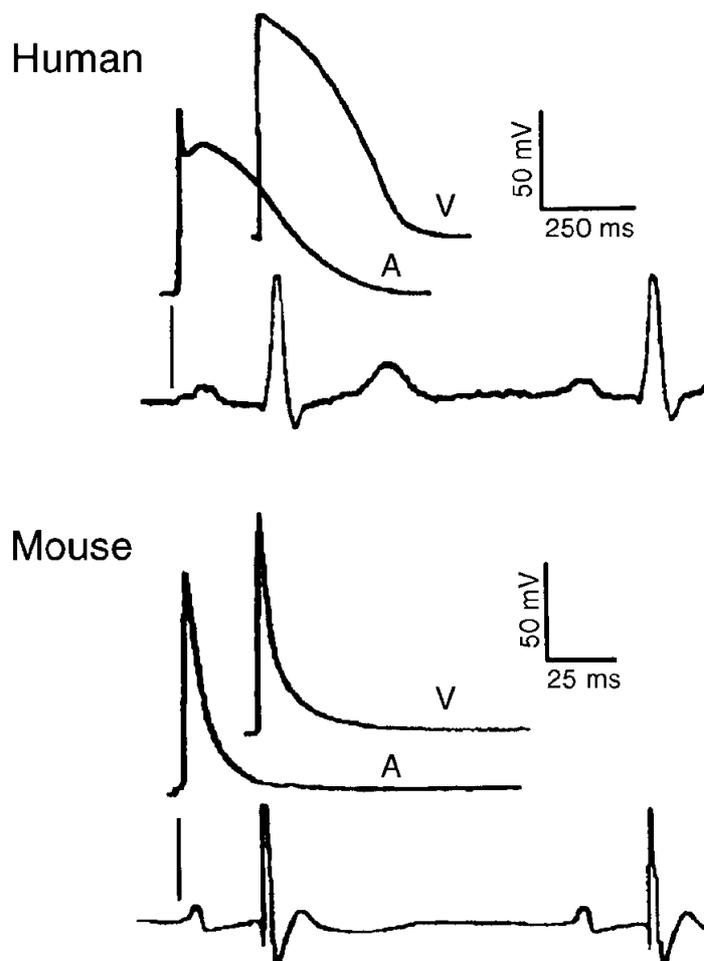
Menschen finden sich zwei dominante verzögerte Gleichrichter,  $I_{Kr}$  (erg1) und  $I_{Ks}$  (KvLQT1, Mink) (Li et al., 1996), die jedoch bei der Repolarisation im Mauserzen keine Rolle zu spielen scheinen (Xu et al., 1999). Die Repolarisation im Mauserzen wird hier durch drei andere verzögert gleichrichtende Ströme vermittelt,  $I_{K,slow1}$ ,  $I_{K,slow2}$  und  $I_{SS}$ , die wiederum beim Menschen keine funktionelle Relevanz zu haben scheinen (Xu et al., 1999; Zhou et al., 2003). Für ausführliche Angaben siehe auch Abb. 1.11.



**Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Aktionspotentials und der zugrundeliegenden Ionenstromkomponenten im adulten Herzen des Menschen (links) bzw. der Maus (rechts).** Das ventrikuläre Aktionspotential von Maus und Mensch unterscheidet sich deutlich voneinander. Besonders augenfällig ist das Fehlen der Plateau-Phase im Maus-AP (Nerbonne, 2004).

Zuletzt sei auf die Gruppe der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle näher eingegangen. Auch diese tragen nicht unerheblich zur Repolarisation des

myokardialen Aktionspotentials bei (Babenko et al., 1998; Flagg and Nichols 2001, Lopatin and Nichols, 2001) und werden durch eine Untergruppe, die Kir kodiert. Der einwärtsgerichteten Komponente  $I_{K1}$  liegen dabei die Kanäle Kir2.1 und Kir2.2 zugrunde, während Kir6.2 den schwach einwärtsgerichteten  $I_{KATP}$ -Strom vermittelt (Lopatin and Nicols, 2001; Babenko et al., 1998, Bolli and Marban 1999; Flagg and Nicols, 2001). Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen basiert das Ruhemembranpotential im wesentlichen auf  $I_{K1}$ , während  $I_{KATP}$  eine Verbindung zwischen zellulärem Metabolismus und Membranpotential herstellt (Babenko et al., 1998; Flagg and Nicols, 2001; Lopatin and Nicols, 2001; Nerbonne et al., 2001). Bei größeren Säugetieren trägt  $I_{K1}$  auch zur Morphologie der Plateauphase (Phase 2) und der verzögerten Repolarisation (Phase 3) bei. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Kaliumkanäle ist es nicht verwunderlich, dass die Ablation oder gezielte Mutation einzelner Kanäle zu z.T. deutlichen kardialen Phänotypen in den verschiedenen Mausmodellen geführt hat.



**Abb. 1.12: Vergleich der atrialen (A) und ventrikulären (V) Aktionspotentiale aus Mensch und Maus in zeitlicher Relation zum Elektrokardiogramm.** Das Mausmyozytenaktionspotential ist wesentlich kürzer als beim Menschen und durch das weitgehende Fehlen der Plateauphase gekennzeichnet. Depolarisations- und Repolarisationsprozesse scheinen bei der Maus partiell zu koinzidieren, was sich in einem Fehlen der ST-Strecke im Maus-EKG widerspiegelt (Nerbonne, 2004).

## 1.6. Niederspannungsaktivierte Kalziumkanäle im Herzen und im kardiovaskulären System - von den Ursprüngen ihrer Entdeckung bis zur Gegenwart

Die ersten T-Typ-Ströme wurden bereits in den 80iger Jahren von Bean an isolierten atrialen Kaninchenmyozyten gemessen (Bean, 1985) und später auch in einer Vielzahl anderer Spezies gefunden (Bonvallet, 1987; Xu and Best 1990; Ertel et al., 1997). Interessanterweise zeigen ventrikuläre Kardiomyozyten des Kanichens deutlich geringere T-Typ-Stromdichten als atriale, was eine deutliche Heterogenität hinsichtlich Funktionalität und Relevanz widerspiegelt (Bean, 1985). Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass es auf ventrikulärer Ebene massive Unterschiede hinsichtlich der Expression der unterschiedlichen T-Typ Kanäle gibt. So wurden in ventrikulären Zellen vom Meerschweinchen (Droogmans and Nilius, 1989; Mitra and Morad, 1986; Nilius and Roder, 1985) und auch Haien (Selachii) konstant T-Typ-Ströme detektiert, nicht jedoch in adulten ventrikulären Zellen anderer Spezies (Bean, 1985; Osaka and Joyner, 1991; Richard et al., 1990; Bootman et al., 2001). Diese Speziesunterschiede machen unmittelbar deutlich, dass ein Transfer dieser Erkenntnisse auf den Menschen nicht direkt möglich ist. Obwohl  $Ca_v3.1$  ( $\alpha 1G$ ) Transkripte (Monteil et al., 2000) und auch  $Ca_v3.2$  ( $\alpha 1H$ )-Transkripte (Cribbs et al., 1998; Williams et al., 1999) mittels *Northern Blot* im Herzen des Menschen nachgewiesen worden sind, ist der eindeutige Nachweis von T-Typ Strömen in gesunden atrialen wie ventrikulären Arbeitsmyokardzellen des Menschen bislang nicht gelungen bzw. in der Literatur nicht zweifelsfrei belegt. Arbeiten von Ouadid et al. (1991) und Beuckelmann et al. (1991) konnten keinen T-Typ-Strom in atrialen und ventrikulären Zellen des Menschen nachweisen. Während *Northern Blot*-Analysen positive Resultate für  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  lieferten, konnten in situ Hybridisierungsexperimente den Nachweis von  $Ca_v3$ -Transkripten in adulten humanen Myozyten nicht erbringen. In Arbeitsmyokardzellen ist daher die Existenz und funktionelle Relevanz der T-Typ Kanäle fraglich. Wenn vorhanden, ist die Funktion unklar, da eine Involvierung in die Exzitations-Kontraktionskopplung unwahrscheinlich ist (Bootman et al., 2001). Dennoch führte die Applikation des T-Typ Blockers Mibefradil ( $10 \mu M$ ) zu einer Verkürzung des Aktionspotentials in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens (Benardeau et al., 2000) bzw. zu einer Attenuierung der Kontraktion ventrikulärer Myozyten aus Meerschweinchen (Emanuel et al., 1998; Hoischen et al., 1998; Sipido, 1998). In einigen Spezies

konnte eine geringe Beteiligung an der sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung nachgewiesen werden, der jedoch nur eine geringe funktionelle Relevanz zuzukommen scheint (Brotto and Creazzo, 1996; Emanuel et al., 1998; Lipsius et al., 2001). Während in Arbeitsmyokardzellen die Expression und funktionelle Bedeutung von T-Typ-Kalziumkanälen nicht eindeutig geklärt ist, stellt sich dies bei den Komponenten des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems deutlich anders dar. So wurden zweifelsfrei T-Typ-Ströme in Purkinje-Zellen (Hirano et al., 1989; Tseng and Boyden, 2002), in sinuatrialen Zellen (Hagiwara et al., 1988) sowie in latenten Schrittmacherzellen (Zhou and Lipsius, 1994) detektiert (zusammengefasst in Massie, 1998 und Triggle, 1997). Es ist wichtig hervorzuheben, dass der T-Typ-Strom in atrialen Schrittmacherzellen um ein Vielfaches größer ist, als in atrialen Nicht-Schrittmacherzellen (Zhou and Lipsius, 1994) und dass die pharmakologische Blockade von T-Typ Kalziumkanälen die intrinsische Automtizität und Feuerfrequenz von Schrittmacherzellen inhibiert (Hagiwara et al., 1988; Zhou and Lipsius, 1994; Li et al., 1997; Fareh et al., 1999; Hüser et al., 2000). Diese Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass T-Typ-Kalziumkanäle bei der langsamen diastolischen Depolarisation eine entscheidende Rolle spielen und damit essentiell für die myogene kardiale Automtizität sind (Bean, 1985; Nilius et al., 1985; Hagiwara et al., 1988, Officer and Ewert, 1998; Hüser et al., 2000). Darüber hinaus scheint es wahrscheinlich, dass T-Typ Kalziumkanäle auch einen deutlichen Beitrag zum Kalziumstrom während der „Plateauphase“ von kardialen Schrittmacherzellen leisten (Bean, 1995). Sowohl T-Typ als auch L-Typ-Ströme können eine  $Ca^{2+}$ -getriggerte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Kaninchen-Purkinjezellen vermitteln, auch wenn T-Typ-Kanäle hierbei weniger effektiv zu sein scheinen (Zhou and January, 1998). In atrialen Schrittmacherzellen wurden weiterhin subtile Wirkmechanismen der T-Typ-Kanäle beschrieben: So führt der T-Typ vermittelte Kalziumstrom zur lokalen Freisetzung von subsarkolemmalem intrazellulärem Kalzium, das zu einer Aktivierung des elektrogenen  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers führt und damit die Membrandepolarisation unterstützt (Hüser et al., 2000; Lipsius et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass T-Typ Kanäle eine wichtige Rolle bei der myoendokrinen Funktion des Herzens spielen und an der ANP Sekretion beteiligt sind (Leuranguer et al., 2000). Eine Reihe von molekularbiologischen Ansätzen hat deutlich gemacht, dass verschiedene T-Typ Kanäle mit unterschiedlicher Dominanz zu verschiedenen Zeiten

der Ontogenese exprimiert werden. *Northern-Blot*-Analyse (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Williams et al., 1999; Leuranguer et al., 2000; Monteil et al., 2000), RT-PCR (Ferron et al., 2002) und in situ Hybridisierung (Bohn et al., 2000) kardialen Gewebes unterschiedlicher Spezies haben den Nachweis von  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  Transkripten in embryonalen, neonatalen und adulten Herzen erbracht. In Rattenatrien und Rattenventrikeln fanden sich sowohl  $Ca_v3.1$  als auch  $Ca_v3.2$ -Transkripte (Leuranguer et al., 2000; Ferron et al., 2002), wobei die relative Transkriptmenge mit dem Alter abnahm (Huang et al., 2000; Ferron et al., 2002; Larsen et al., 2002). Dennoch wurden T-Typ Ströme in vielen adulten ventrikulären Myozyten nicht nachgewiesen (Leuranguer et al., 2000), was unterstreicht, dass das Vorliegen von Transkripten mit dem Vorhandensein von Strömen nicht zwingend korrelieren muss. Die bei der Ratte gewonnenen, oben aufgeführten Erkenntnisse scheinen denen des Menschen sehr ähnlich zu sein. Auch beim Menschen fanden sich  $\alpha 1G$  und  $\alpha 1H$  Transkripte im adulten Herzen mittels *Northern-Blot*-Analyse (Cribbs et al., 1998; Williams et al., 1999; Monteil et al., 2000), allerdings wurden T-Typ-Ströme bislang nicht beschrieben (Beuckelmann et al., 1991; Ouadid et al., 1991). Analog zur Ratte zeigte sich aber auch beim Menschen, dass die  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  Transkriptniveaus während der Entwicklung langsam wieder abnahmen (Qu and Boutjdir, 2001). Dies macht deutlich, dass T-Typ-Ströme sehr wahrscheinlich in der frühen Herzentwicklung des Menschen eine entscheidende Rolle spielen. Während in der Pränatalphase  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  gemeinsam vorliegen, scheinen postnatal T-Typ-Kanäle mehr oder weniger exklusiv durch  $Ca_v3.1$  vertreten zu werden (Ferron et al., 2002).

Es gibt mittlerweile viele Hinweise dafür, dass T-Typ Kalziumkanälen eine wichtige pathophysiologische Rolle bei einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen zukommt. In adulten atrialen Myozyten der Ratte, die einen Wachstumsfaktor (*growth hormone*, GH)-produzierenden Tumor besaßen, zeigte sich vor Einsetzen einer kardialen Hypertrophie ein Anstieg des T-Typ Stromes um das mehr als zweifache (Xu and Best, 1990). L-Typ-Ströme waren nicht alteriert, was die Bedeutung der T-Typ Kanäle bei der myozytären Proliferation unterstreicht. Obwohl in einem Kaninchenmodell für atriale Fibrillation keine veränderten T-Typ-Ströme gemessen werden konnten (Yue et al., 1997), sind T-Typ Kanäle offensichtlich in der Lage, die Suszeptibilität für atriale Arrhythmien zu erhöhen (Fareh et al., 1999). Bei

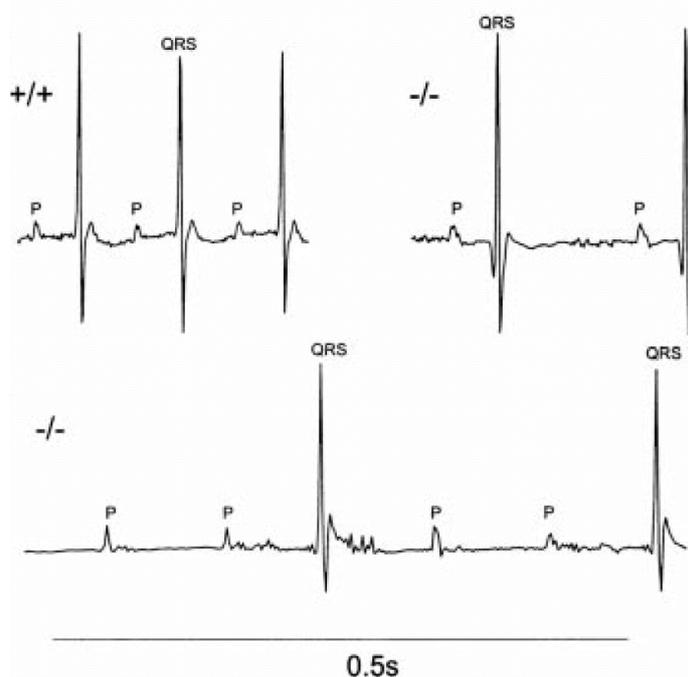
Herzinsuffizienz scheint es zu keiner Veränderung auf T-Typ Ebene zu kommen, weder auf atrialer Ebene (Li et al., 2000) noch in Purkinje-Zellen (Han et al., 2001).

### 1.7. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle im Herzen:

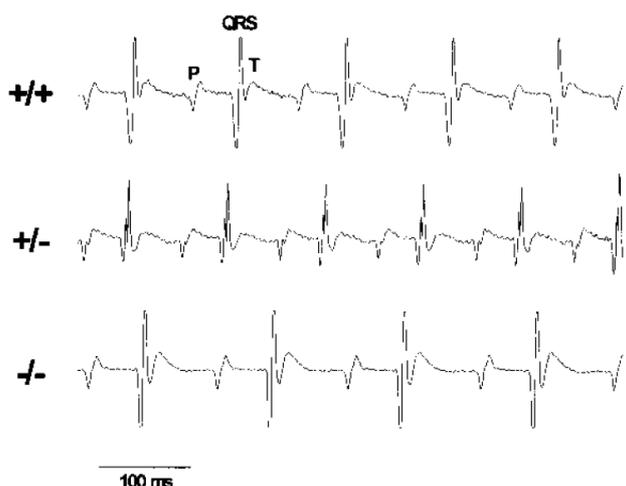
#### Wie transgene Mausmodelle neue Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie von Ionenkanälen geben

Die Spontanaktivität des myoendokrinen Säugerherzens basiert, wie bereits oben ausführlich dargelegt, auf der strukturellen Integrität und koordinierten Aktivität von Schrittmacherzellen sowie der regelrechten Erregungsausbreitung über das Arbeitsmyokard. Das myoendokrine Herz verfügt dabei über eine Reihe von potentiellen Schrittmacherzellen im SA-Knoten, AV-Knoten, His-Bündel und den Purkinje-Fasern (Kaupp and Seifert, 2001). Die intrinsische myogene Automtizität spiegelt hierbei das koordinierte Zusammenspiel einer Vielzahl von spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanal-Entitäten wider, deren funktionelle Relevanz im Rahmen der langsamen diastolischen Depolarisation und des sich anschließenden Aktionspotentials allerdings teilweise noch kontrovers diskutiert wird (DiFrancesco, 1993; Irisawa et al., 1993; Baruscotti and DiFrancesco, 2004). Potentielle Schrittmacherzellen haben kein stabiles Ruhepotential, sondern weisen, ausgehend von einem maximalen diastolischen Potential (MDP) einen langsamen Depolarisationsprozess auf, der das Ergebnis einer komplexen Interaktion verschiedener Kanalkomponenten ist. Hierzu zählt neben dem verzögert-gleichrichtenden Kaliumstrom ( $I_{Kr}$ ) mindestens eine weitere Komponente spannungsgesteuerter Einwärtsströme: der Hyperpolarisations- und zyklisch-Nukleotid gesteuerte Ionenstrom  $I_f$  (auch  $I_h$  oder  $I_q$  genannt), eine anhaltende relativ Kationen-unselektive Einwärtsstromkomponente  $I_{st}$  sowie hoch- und niederspannungsaktivierte Kalziumkanalströme ( $I_{Ca,L}$ ;  $I_{Ca,T}$ ) (DiFrancesco, 1986; Campbell et al., 1992; Boyett et al., 2000; Cho et al., 2003, Stieber et al., 2004). Die initiale Phase der diastolischen Depolarisation wird durch die  $I_f$ -Komponente (HCN 2/4 bei der Maus) getragen. Bei einem Membranpotential von -65 mV kommt es zur Aktivierung von T-Typ-Kanälen, während der L-Typ getragene Kalziumstrom erst bei einem Schwellenpotential von etwa -30 mV aktiviert wird und somit wesentlich zum Aufstrich des Aktionspotentials beiträgt (DiFrancesco, 1986; Campbell et al., 1992; Boyett et al., 2000). Dies gilt für  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ), während neuere Resultate an  $Ca_v1.3$

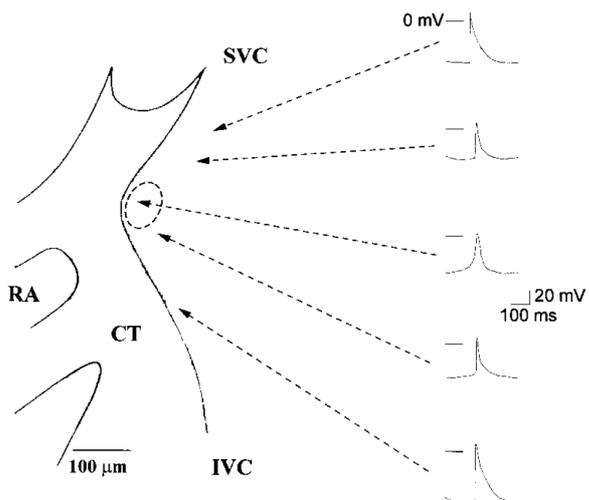
defizienten Mäusen darauf hindeuten, dass letzterer L-Typ Kalziumkanal tatsächlich einer niederspannungsaktivierten L-Typ-Stromkomponente zugrunde liegt und mit einem Aktivierungsbereich von ca. -45 mV an der langsamen diastolischen Depolarisation beteiligt ist (Mangoni et al., 2003). Ein ähnlich negatives Aktivierungspotential wurde für  $Ca_v1.3$  in den inneren Haarzellen der Cochlea detektiert (Koschak et al., 2001). Dieser hier in Kürze dargelegte Vorgang repräsentiert einen einzigartigen, globalen Mechanismus der Generierung von Rhythmicität in verschiedenen Geweben, nicht nur in Schrittmacherzentren des Herzens, sondern auch in solchen des Zentralnervensystems.



**Abb. 1.13: Repräsentative EKG-Aufzeichnungen von Kontrolltieren (+/+) sowie  $Ca_v1.3$  geninaktivierten Mäusen (-/-).** Deutlich ist die Verlängerung des RR-Intervals sowie das Auftreten von AV-Blöcken 2. Grades (2 : 1 Blöcke) zu erkennen (Platzer et al., 2000).



**Abb. 1.14: Darstellung von EKG-Aufzeichnungen von Kontrolltieren (+/+), Heterozygoten (+/-) sowie  $Ca_v1.3$ -defizienten Mäusen (-/-).**  $Ca_v1.3$ (-/-) Mäuse weisen eine Bradykardie auf (erkennbar am größeren RR-Abstand) sowie eine Verlängerung der AV-Überleitung (prolongiertes PR-Interval) (Zhang et al., 2002).



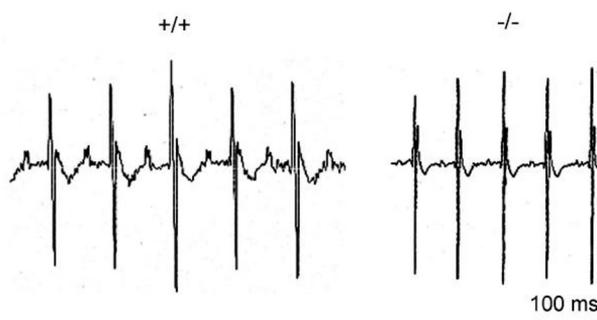
**Abb. 1.15: Darstellung der Morphologie spontaner Aktionspotentiale aus unterschiedlichen Regionen des rechten Atriums (RA) sowie dem Sinusknoten (CT: crista terminalis; IVC: inferior vena cava; RA: right atrium; SVC: superior vena cava; Zhang et al., 2002).**

Als effektives Vorgehen der Erforschung sowohl der physiologischen Bedeutung als auch der biophysikalischen Charakteristika von Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren im Herzen, hat sich die Generierung von transgenen Mauslinien erwiesen (Hahn et al., 2003; Reuter et al., 2002; Foerster et al., 2003). Sie dienen z.B. als Modelle für das *LQT-Syndrom* (LQT-Syndrom, Nerbonne et al., 2001; Keating and Sanguinetti, 2001). Die Inaktivierung von Kir2.1 führt zu Sinusbradykardie und einer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials (Zaritsky et al., 2001). Sinusbradykardie fand sich auch nach Inaktivierung der KCNQ1-Isoform 2 (Demolombe et al., 2001). Die Inaktivierung von HCN2 führt zu Sinusdysrhythmie (Ludwig et al., 2003), während der generalisierte, wie auch der herzspezifische *Knock-out* von HCN4 im frühen embryonalen Stadium (9,5 bzw. 11,5 Tage p.c.) letal ist. Dies unterstreicht u.a. die Bedeutung der HCN-Kanäle bei der Generierung von Schrittmacherpotentialen (Mangoni and Nargeot, 2001).

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle spielen eine große Rolle bei der kardialen Erregungsbildung- und -Fortleitung und nicht nur als Signalvermittler bei der Exzitations-Kontraktionskoppelung, Sekretion und einer Vielzahl neuronaler Prozesse, wie Exzitabilität, Neurotransmitter-Freisetzung, synaptische Plastizität und Genexpression. In den letzten Jahren hat das Wissen um die Bedeutung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle im Erregungsbildungs- und -Leitungssystem nicht zuletzt auf der Basis geninaktivierter Mausmodelle erheblich zugenommen (Scoote and Williams, 2004; Lipscombe, 2002). In situ Hybridisierungsexperimente und RT-PCR-Versuche haben gezeigt, dass es sich bei der dominanten L-Typ Kalziumkanalkomponente im Sinusknoten um  $Ca_v1.2$  handelt, obwohl auch geringere

Transkriptmengen an  $Ca_v1.3$  gefunden wurden (Bohn et al., 2000). Während der L-Typ  $Ca_v1.2$  primär am „Aufstrich“ des Schrittmacheraktionspotentials beteiligt ist, spielt  $Ca_v1.3$  eine bedeutende Rolle bei der langsamen diastolischen Depolarisation (Mangoni et al., 2003; Zhang et al., 2002). Während die Geninaktivierung von  $Ca_v1.2$  bereits vor dem Tag 14.5 p.c. letal ist (Seisenberger et al., 2000), überleben  $Ca_v1.3$  geninaktivierte Mäuse und präsentieren einen markanten kardialen Phänotyp mit Sinusbradykardie und atrioventrikulären Blockbildern (Abb. 1.13 - 1.14) trotz geringer Transkriptmengen im Sinus- und AV-Knoten (Bohn et al., 2000; Platzer et al., 2000). Elektrophysiologische Untersuchungen sinuatrialer Zellen  $Ca_v1.3$  defizienter Mäuse haben u.a. eine Herabsetzung der Spontanaktivität im Sinusknoten sowie der diastolischen Depolarisationsrate erbracht, welche mit der bei  $Ca_v1.3(-/-)$  beobachteten negativen Chronotropie korreliert (Zhang et al., 2002). Dieses Phänomen wurde durch pharmakologische Inhibition der L-Typ-Stromkomponente in Wildtyp-Sinusknotenzellen bestätigt. Damit wurde zum ersten Mal deutlich, dass  $Ca_v1.3$  an der Spätphase der langsamen diastolischen Depolarisation beteiligt ist. In einem *working heart*-Ansatz konnte u.a. gezeigt werden, dass die ventrikuläre kontraktile Funktion  $Ca_v1.3$  defizienter Herzen nicht eingeschränkt ist. Auch lies sich die Sinusbradykardie durch Isoproterenol nahezu kompensieren, die AV-Knoten-Dysfunktion jedoch nicht (Matthes et al., 2004). Während in  $Ca_v1.3(-/-)$  Mäusen  $Ca_v1.2$  geringgradig kompensatorisch hochreguliert ist (Zhang et al., 2002), findet sich in schlagenden pränatalen Herzen  $Ca_v1.2$  defizienter Mäuse eine niedrigaffine DHP-sensitive Komponente, deren Identifizierung u.a. im Rahmen dieser Arbeit erfolgte (Lu et al., 2004) und nicht ohne weiteres auf die vierfach erhöhte Transkriptmenge von  $Ca_v1.3$  in  $Ca_v1.2(-/-)$  Herzen zurückgeführt werden kann (Seisenberger et al., 2000). Anders stellt sich die Situation der T-Typ Kalziumkanäle im Herzen dar. Die dominante niederspannungsaktivierte Komponente im Erregungsbildungs- und Leitungssystem stellt  $Ca_v3.1$  dar, während  $Ca_v3.2$  in geringeren Transkriptmengen vorzufinden ist und  $Ca_v3.3$  gar nicht exprimiert wird (Bohn et al., 2000). Obwohl  $Ca_v3.1$  defiziente Mäuse bereits generiert wurden, war bis vor kurzem wenig über den kardialen Phänotyp bekannt. Histologisch sind die Herzen  $Ca_v3.1$  defizienter Mäuse unauffällig (Kim et al., 2001), elektrophysiologisch wurde schon frühzeitig eine Bradykardie erwartet (Stieber et al., 2004). Neuere Ergebnisse von Mangoni et al. (2005) zeigen, dass  $Ca_v3.1$  defiziente Mäuse durch eine Bradykardie und eine Verlangsamung der atrioventrikulären Überleitung

gekennzeichnet sind. *Patch-Clamp*-Experimente an isolierten Sinusknotenzellen haben gezeigt, dass die T-Typ-Stromkomponente fast vollständig verschwunden ist. Die phänotypisch erfassbare Bradykardie liess sich mittels *Current-Clamp*-Technik an isolierten Sinusknotenzellen u.a. anhand einer Abflachung der langsamen diastolischen Depolarisation belegen. Während das  $Ca_v3.2$  *Knock-out* Mausmodell u.a. durch eine massive Dysregulation der Vasomotorik bzw. Vasokonstriktion der Koronargefäße mit fibrotischem und nekrotischem Umbau der Herzmuskulatur gekennzeichnet ist, fanden sich dennoch keine intrinsischen Alterationen im Elektrokardiogramm (Abb. 1.16; Chen et al., 2003). Diese Beispiele machen deutlich, dass auch die geringgradige, aber exklusive Expression eines Kalziumkanals eine wichtige funktionelle Bedeutung im Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens spielen kann.



**Abb. 1.16: Repräsentative EKG-Spuren aus Kontrolltieren (+/+) und  $Ca_v3.2$  defizienten Mäusen (-/-).** Die qualitative und quantitative Analyse des EKG erbrachte keine Auffälligkeiten bzw. signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Chen et al., 2003).

### 1.8. Der R-Typ Kalziumkanal $Ca_v2.3$ ( $\alpha1E$ ) im Ratten- und Mauserzen

Die Zahl der für Schrittmacherzellen/Myokardzellen relevanten Kalziumkanäle reduzierte sich bislang auf die L-Typen  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$  sowie die T-Typen  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  (Klugbauer et al., 2002; Perez-Reyes, 2003; Bourinet et al., 2004; Niwa et al., 2004; Xia et al., 2004). Die DHP-insensitiven Non-L-Typ Kalziumkanäle  $Ca_v2.1$  ( $\alpha1A$ ) und  $Ca_v2.2$  ( $\alpha1B$ ) spielen hingegen extrakardiomyozytär, in autonomen Ganglien, und bei der zentralnervösen Regulation des kardiovaskulären Systems eine entscheidende Rolle (Mori et al., 2002).

In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Hinweise, dass mit dem R-Typ  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) eine weitere Kalziumkanalkomponente in Kardiomyozyten exprimiert wird und eine wichtige funktionelle Bedeutung bei der regelrechten Erregungsbildung und Ausbreitung im Herzen spielen könnte (Piedras-Renteria et al., 1997; Weiergräber et

al., 2000). Obwohl bereits 1992 kloniert, hat diese Kalziumkanaluntereinheit ihre strukturellen und funktionellen Eigenarten nur sehr widerspenstig preisgegeben (Schneider et al., 1994; Williams et al., 1994). Heute weiss man, dass  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) eine wichtige Rolle bei der Hormon- und Neurosekretion (Grabsch et al., 1999, Pereverzev et al., 2002; Pereverzev et al., 2005; Jing et al., 2005), der Langzeitpotenzierung (Dietrich et al., 2003), der Anxiogenese (Lee et al., 2002), der Myelinscheidenbildung (Chen et al., 2000) und der Spermiendifferenzierung (Lievano et al., 1996; Sakata et al., 2002) spielt. Die Bedeutung von  $Ca_v2.3$  im kardiovaskulären System wird im Folgenden näher dargelegt.

Eigene Studien haben gezeigt, dass Transkripte der T- und L-Typ Kalziumkanäle nicht die einzigen Transkripte sind, die im Säugerherzen exprimiert werden.  $Ca_v2.3$  Transkripte wurden mittels RT-PCR erstmals im Rattenherzen detektiert, sowohl aus RNA-Gesamtherz-Präparation (Weiergräber et al., 2000) als auch aus Rattenatrien (Piedras-Renteria et al., 1997). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass hierbei spezifische Spleißvarianten von besondere Bedeutung sind, die im II-III-*loop* und im C-Terminus strukturelle Variationen aufweisen. In beiden Regionen tritt alternatives Spleißen auf, dass im II-III-*loop* Exon 19 (57 bp) und im C-terminalen Fragment Exon 45 (129 bp) umfasst. Wir konnten zeigen, dass die  $Ca_v2.3e$  Spleißvariante, der Exon 19 im II-III-*loop* fehlt, jedoch Exon 45 im C-Terminus enthält, die dominante Form im Rattenherzen darstellt (Weiergräber et al., 2000). Später wurde  $Ca_v2.3$  aus isolierten atrialen Rattenmyozyten kloniert und  $Ca_v2.3e$  als dominante Spleißvariante bestätigt (Mitchell et al., 2002). Philip Best und Mitarbeiter haben eine detaillierte Expressionsanalyse verschiedener  $Ca_v$ -Untereinheiten im Rattenherzen auf atrialer und ventrikulärer Ebene vorgelegt (Larsen et al., 2002), die zeigte, dass das  $Ca_v1.2$ -Transkriptniveau das von  $Ca_v2.3$ ,  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  um das 10 - 100-fache übersteigt.  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v3.1$  bleiben während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung auf konstantem Niveau, während sich für  $Ca_v2.3$  und  $Ca_v3.2$  eine deutliche Entwicklungsabhängigkeit der Expression finden lies.  $Ca_v3.2$  zeigte höchste Transkriptniveaus während der Embryonalentwicklung bis zu 3 - 4 Wochen postnatal, was auch elektrophysiologisch bestätigt werden konnte (Xia et al., 2004). Die  $Ca_v2.3$ -Untereinheit zeigt in der quantitativen RT-PCR hohe Transkriptmengen pränatal mit einem maximalen Wert vier Wochen post partum und nachfolgendem Abfall der Transkriptmenge bei adulten Tieren. Es wurde daher spekuliert, dass neben  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$  auch  $Ca_v2.3$  eine

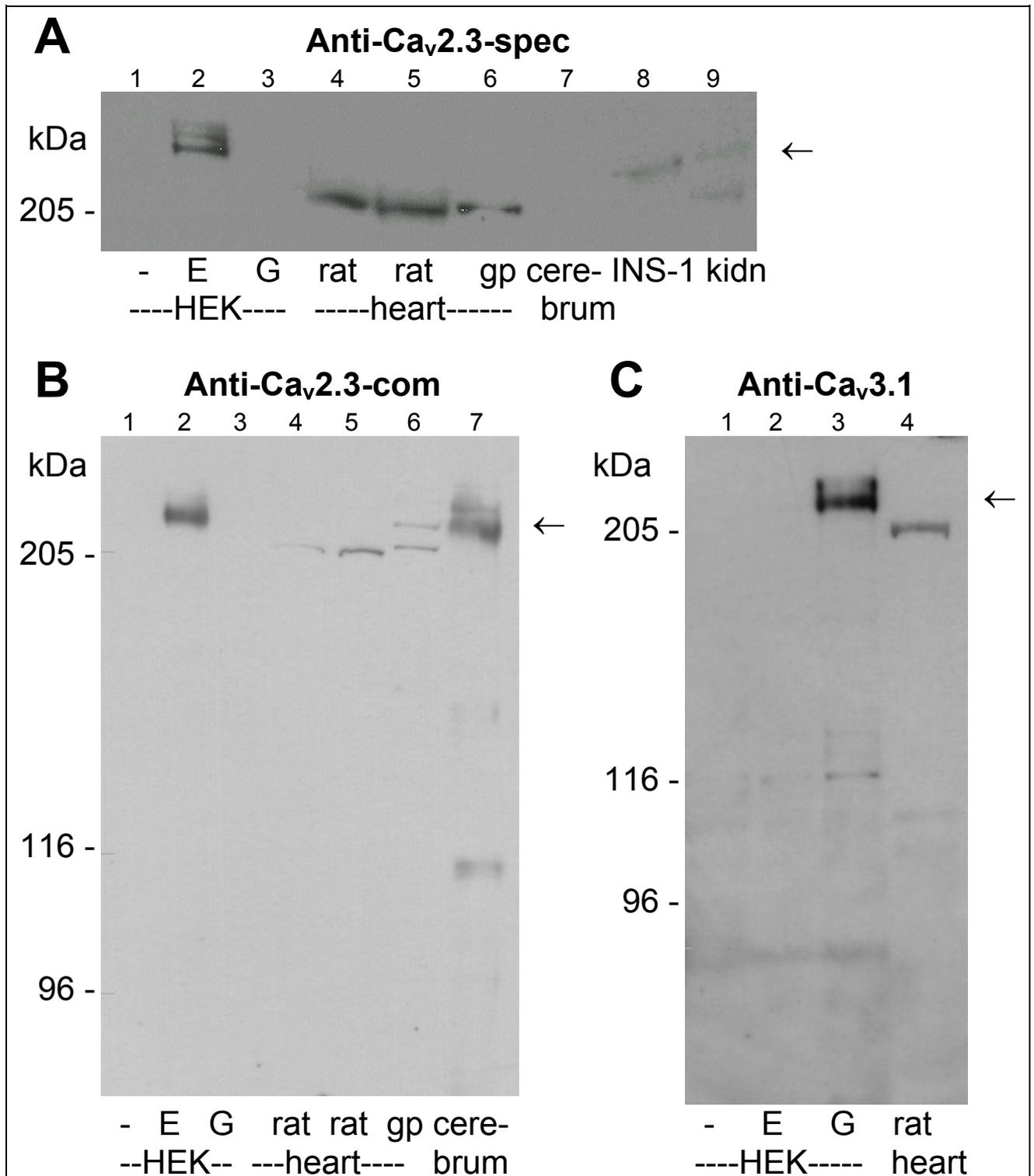
niederspannungsaktivierte Komponente im Herzen darstellen könnte (Larsen et al., 2002).

### 1.9. Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Ca<sub>v</sub>2.3 und Ca<sub>v</sub>3.1 im Rattenherzen

Die Expression von Ca<sub>v</sub>2.3 und Ca<sub>v</sub>3.1 wurde zunächst im *Western-Blot* untersucht. Als Gewebe zur Mikrosomengewinnung dienten Herz (Ratte, Meerschweinchen), Cerebrum (Ratte), INS-1-Zellen (Insulinoma-Zelllinie, Ratte) und Niere (Ratte). Abb. 1.17 zeigt drei Immunoblots mit anti-Ca<sub>v</sub>2.3-com-, anti-Ca<sub>v</sub>2.3-spec- und anti-Ca<sub>v</sub>3.1-4a-Seren (Weiergräber et al., 2000). Der anti-Ca<sub>v</sub>2.3-spec als auch der anti-Ca<sub>v</sub>2.3-com zeigen in Mikrosomen aus Ratten- und Meerschweinschenherzen eine Ca<sub>v</sub>2.3-Herzvariante, die mit einer apparenten molekularen Masse von 218 kDa ± 6 kDa etwa 28 kDa unterhalb der vorausgesagten Primärsequenzlänge der rekombinanten Ca<sub>v</sub>2.3-Untereinheit aus Ca<sub>v</sub>2.3-transfizierten HEK-Zellen liegt. Ein ähnliches Resultat liefert der anti-Ca<sub>v</sub>3.1-4a Antikörper mit Detektion der Ca<sub>v</sub>3.1 aus mit Ca<sub>v</sub>3.1 stabil transfizierten HEK-293-Zellen (molekulare Masse: 241 kDa) sowie der etwas kleineren kardialen Ca<sub>v</sub>3.1-Isoform der Ratte mit einem Molekulargewicht von 232 kDa.

**Abb. 1.17: Nachweis von Ca<sub>v</sub>2.3 und Ca<sub>v</sub>3.1 in Zelllinien und Geweben (siehe folgende Seite).** *Western-Blot* von stabil transfizierten HEK-293-Zellen sowie Gewebeextrakten nach Isolation der Mikrosomen. Die Pfeile markieren die Größen der rekombinanten Proteine. A) Mikrosomen von untransfizierten HEK-293-Zellen (--, 2.5 µg, Spur 1), von Zelllinien, die stabil mit Ca<sub>v</sub>2.3 (E, 3 µg, Spur 2) oder Ca<sub>v</sub>3.1 transfiziert worden waren (G, 3 µg, Spur 3), von Rattenherzen (*rat*, 20 µg in Spur 4 oder 32 µg in Spur 5), von Meerschweinchen-Herzen (*gp*, 8 µg, Spur 6), von Ratte Cerebrum (14 µg, Spur 7), von INS-1 Zellen (INS-1, 25 µg, Spur 8) und von Rattennieren (*kidn*, 50 µg, Spur 9). B) Mikrosomen von untransfizierten HEK-293-Zellen (--, 3 µg, Spur 1), von Zelllinien, die stabil mit Ca<sub>v</sub>2.3 (E, 3 µg, Spur 2) oder mit Ca<sub>v</sub>3.1 transfiziert worden waren (G, 3 µg, Spur 3), von Rattenherzen (*rat*, 20 µg in Spur 4 oder 32 µg in Spur 5), von Meerschweinchen-Herzen (*gp*, 8 µg, Spur 6) und von Ratte-Cerebrum (14 µg, Spur 7). Nur mit Hilfe von anti-Ca<sub>v</sub>2.3-com, nicht jedoch mit anti-Ca<sub>v</sub>2.3-spec, läßt sich in Cerebrum eine Ca<sub>v</sub>2.3-Bande nachweisen. Dieser Befund stimmt mit den RT-PCR-Ergebnissen überein, in denen in Cerebrum nur Ca<sub>v</sub>2.3-Spleißvarianten

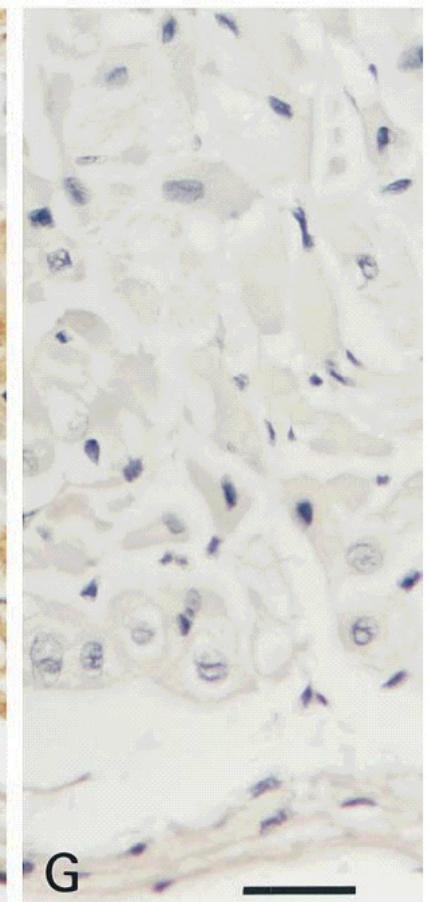
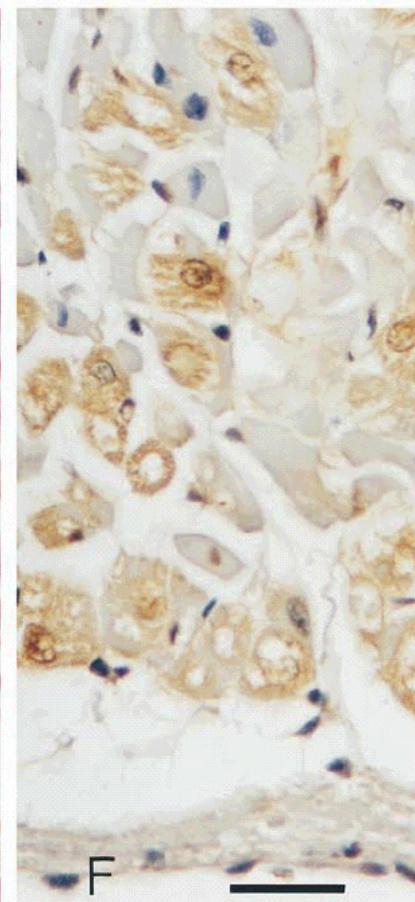
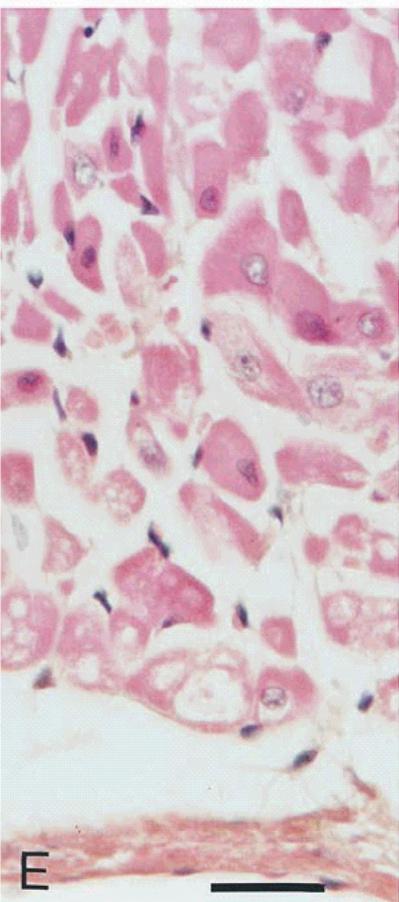
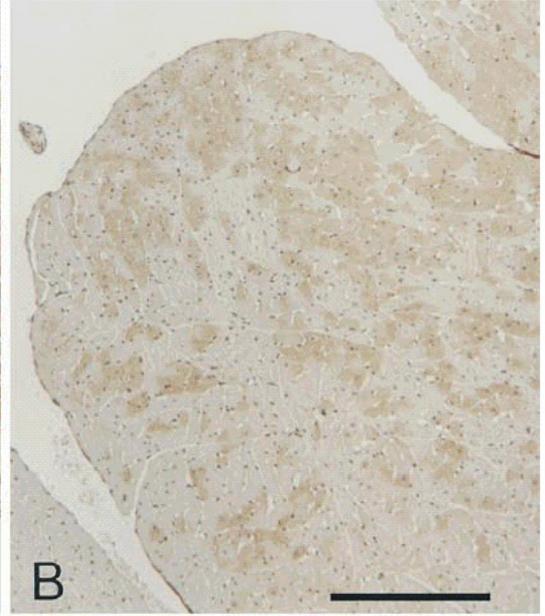
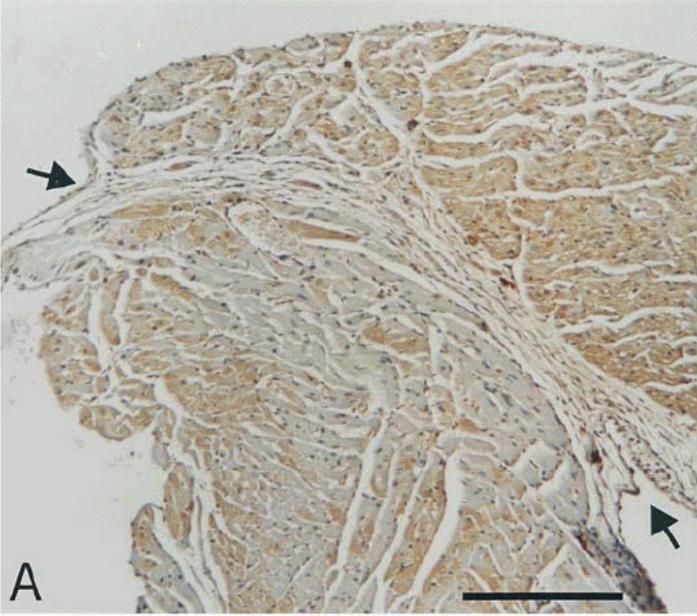
nachgewiesen werden, denen das für anti-Ca<sub>v</sub>2.3-spec spezifische Epitop fehlt (Pereverzev et al., 1998; Weiergräber et al., 2000).



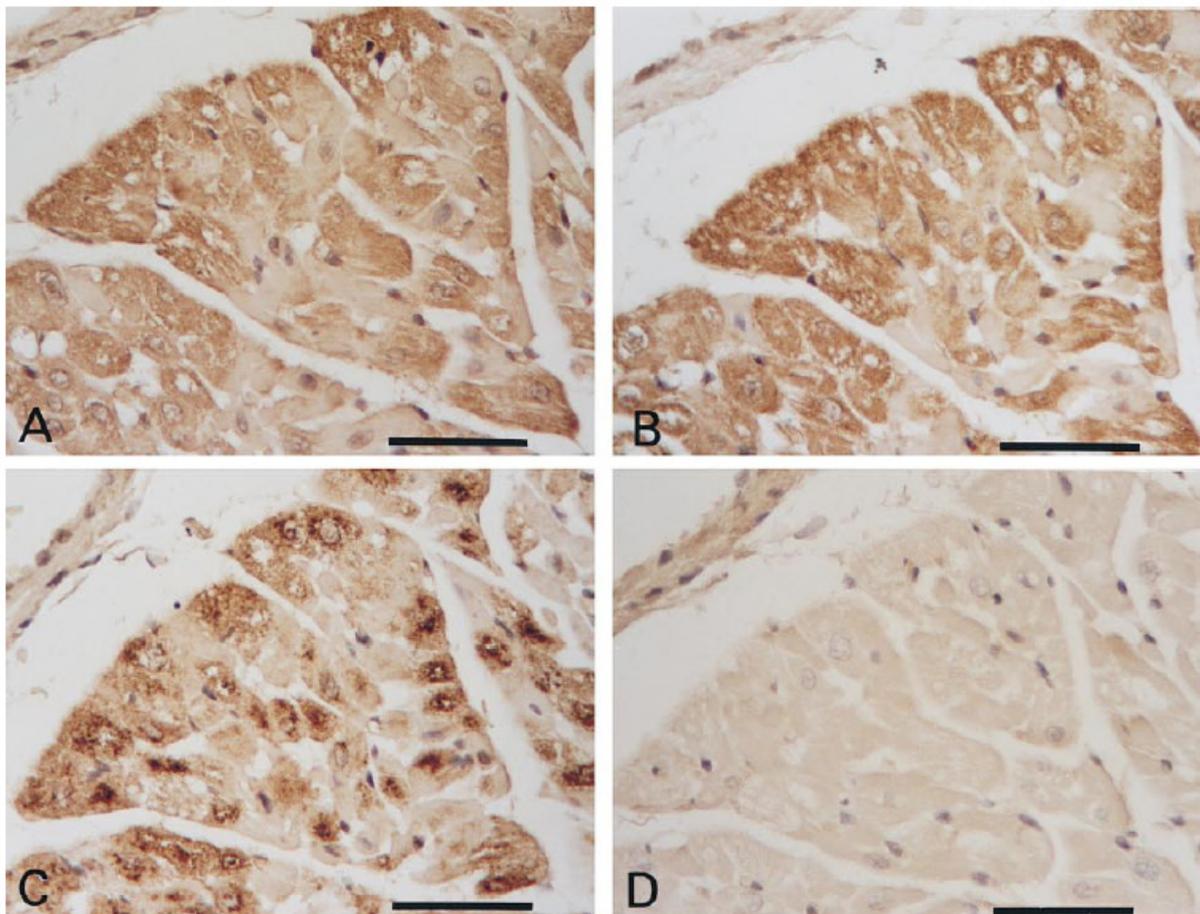
Das niedrigere apparente Molekulargewicht der Ca<sub>v</sub>2.3 und Ca<sub>v</sub>3.1 Kalziumkanaluntereinheit ist möglicherweise auf Proteolyse oder eine herzspezifische posttranslationale Modifikation zurückzuführen. Dies ist u.a. auch

von anderen  $\alpha$ 1-Kalziumkanaluntereinheiten, wie z.B.  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$  und auch  $Ca_v1.3$  bekannt (Schneider and Hofmann, 1988; De Jongh et al., 1991). So wurden beispielsweise im Skelettmuskel des Kaninchens zwei  $Ca_v1.1$ -Isoformen detektiert, ein 212 kDa *full-length*-Polypeptid und ein kleineres 190 kDa Protein, welches durch posttranslationale Proteolyse aus dem erstgenannten hervorgeht. Mit 95 % dominiert hierbei die kürzere Isoform. Dies zeigt deutliche Parallelen zu den gewonnenen *Western-Blot*-Resultaten für  $Ca_v2.3$  und  $Ca_v3.1$  im Herzen. Der beobachtete Größenunterschied für  $Ca_v2.3$  im Herzen im Vergleich zur rekombinanten Kontrolle von 28 kDa liegt damit im Bereich dessen, was auch für andere spannungsgesteuerte Kalziumkanäle aus Skelettmuskel, Herzmuskel und Neuronen bekannt ist (Flockerzi et al., 1986a/b; Sieber et al. 1987, Schneider and Hofmann 1988; De Jongh et al. 1991; Florio et al., 1992; Hell et al. 1994).

Frühere *Western-Blot*-Ergebnisse haben gezeigt, dass im Herzen von Ratte und Meerschweinchen eine  $Ca_v2.3$ -Spleißvariante mit dem längeren C-Terminus exprimiert wird (Weiergräber et al., 2000). Auch immunhistochemische Untersuchungen mit anti- $Ca_v2.3$ -spec- und anti- $Ca_v2.3$ -com- und Lilly- $Ca_v2.3$ -Antikörpern (Volsen et al., 1995) erbrachten vergleichbare Resultate. Die zelluläre Verteilung von anti- $Ca_v2.3$ -spec- und anti- $Ca_v3.1$ -4a-positiven Proteinen wurde zunächst im Rattenherzen bestimmt (Abb. 1.18, 1.19). Unter Berücksichtigung histomorphologischer Kriterien sind die  $Ca_v2.3$ - und  $Ca_v3.1$ - positiv gefärbten Zellen dem Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem (*Systema conducens cordis*) zuzuordnen, wobei es sich hauptsächlich um Purkinjefasern (*Rami subendocardiales*) handelt.  $Ca_v2.3$ - und  $Ca_v3.1$ - positive Reaktionen zeigten sich aber nicht nur für die *Rami subendocardiales*, sondern auch für massivere Strukturen des Erregungsleitungssystems, wie den *Truncus fasciculi atrioventricularis* (Hiss-Bündel, Abb. 1.18). Die immunhistochemischen Befunde für  $Ca_v2.3$  und  $Ca_v3.1$  wurden durch Färbungen mit dem monoklonalen Lilly-anti- $Ca_v2.3$ -Antikörper bzw. dem polyklonalen Lilly-anti- $Ca_v3.1$ -Antikörper bestätigt. Die Expression von  $Ca_v2.3$  im Rattenherzen ist offensichtlich auf das Erregungsbildungs- und -Leitungssystem beschränkt (Weiergräber et al., 2000).



**Abb. 1.18: Detektion  $Ca_v2.3$ -positiver Zellen im Rattenherzen (Atrium und Ventrikel) mit Hilfe von Serienschnitten (siehe vorherige Seite).** A) Immunhistochemischer Nachweis von  $Ca_v2.3$  mit Hilfe von anti- $Ca_v2.3$ -spec Serum (1 : 100) im rechten Atrium und Ventrikel. Die Pfeile kennzeichnen die bindegewebige Trennung des Vorhofs vom Ventrikel (Herzskelett). B)  $Ca_v2.3$ -positive Reaktion im linken Ventrikel. C, D) Negativkontrollen mit Präimmunserum (1 : 100), Maßstabsbalken (A - D) = 400  $\mu$ m. E) Histochemische Charakterisierung linksatrialer Purkinjefasern mittels HE-Färbung zur Unterscheidung zwischen Arbeitsmyokard und Erregungsleitungssystem. F) Die immunhistochemische Färbung mit anti- $Ca_v2.3$ -spec-Antikörper (1 : 100) zeigt eine Verteilung in den Purkinjefasern. Eine Färbung der Endokardschicht (unterer Bildrand) findet sich nicht. Als Negativkontrolle fungierte Präimmunserum (1 : 100), Maßstabsbalken (E - F) = 50  $\mu$ m (Weiergräber et al., 2000).



**Abb. 1.19: Serienschnitte vom Vorhof der Ratte.** A) Anti-Chromogranin-A/B (1 : 50); B) Anti- $Ca_v2.3$  (1 : 300); C) Anti-ANP (1 : 200); D) Präimmunserum (1 : 300); Maßstabsbalken (A - D) = 100  $\mu$ m (Weiergräber et al., 2000).

Die beobachtete Kolo-kalisation von Ca<sub>v</sub>2.3, Ca<sub>v</sub>3.1 sowie ANP und Chromogranin A/B (Abb. 1.19) legt nahe, dass beide spannungsgesteuerten Kalziumkanäle eine wichtige Rolle bei der myoendokrinen Funktion des Herzens spielen (Weiergräber et al., 2000). Für das Rattenherz ist bekannt, dass nahezu das gesamte Erregungsleitungssystem (AV-Knoten, Hiss-Bündel, Tawara-Schenkel) und auch die verschiedenen Purkinjefasern vom Typ I und Typ II endokrin-aktive, ANP-freisetzende Zellen darstellen. Die Schlüsselrolle der T-Typ-Kalziumkanäle bei der ANP-Sekretion konnte im Rattenatrium nachgewiesen werden (Leuranguer et al., 2000).

#### 1.10. Ca<sub>v</sub>2.3 in pränatalen Kontroll- und Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mauserherzen - molekularbiologische und elektrophysiologische Charakterisierung

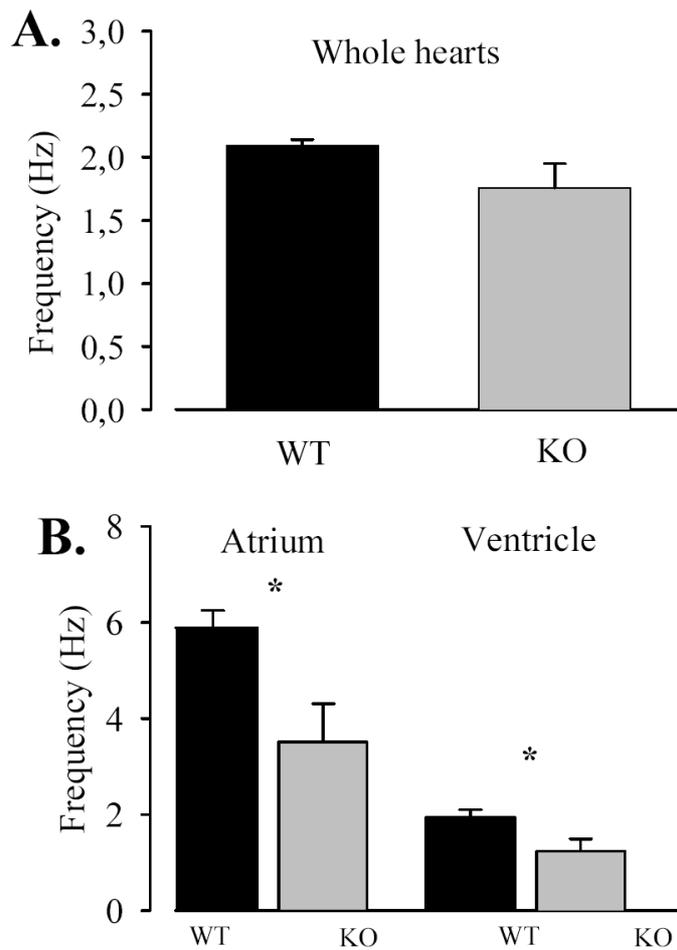
Mit der Generierung Ca<sub>v</sub>2.3 defizienter Mäuse (Pereverzev et al., 2002) ergab sich erstmals die Möglichkeit, den Effekt der Ca<sub>v</sub>2.3-Ablation auf das kardiovaskuläre System zu untersuchen. Mittels RT-PCR Analyse konnte zunächst gezeigt werden, dass das pränatale Mauserherz in verschiedenen Stadien der Herzontogenese unterschiedliche II-III-*loop* Spleißvarianten exprimiert: 12,5 und 14,5 Tage p.c. findet sich fast ausschließlich die endokrine Variante Ca<sub>v</sub>2.3e, während sich zum Tage 19,5 p.c auch die anderen Spleißvarianten, Ca<sub>v</sub>2.3d und Ca<sub>v</sub>2.3f hinzugesellen, wie man es letztlich bei adulten Mauserherzen vorfindet (Lu et al., 2004). Diese entwicklungsabhängige Modulation der Spleißvariantenverteilung und die deutliche Präsenz von Ca<sub>v</sub>2.3 in der pränatalen und frühen postnatalen Entwicklungsphase im Rattenherzen (Larsen et al., 2002) deutet darauf hin, dass Ca<sub>v</sub>2.3 eine wichtige Rolle bei der Organogenese des Herzens spielen könnte. Sollte dies auch Konsequenzen für die regelrechte Erregungsbildung und Fortleitung im Herzen haben?

Diese Frage sollte unter Zuhilfenahme der *Multi-Electrode Array* (MEA)-Technik zunächst an isolierten pränatalen Herzen (Alter 11,5 - 12,5 Tage p.c.) beantwortet werden. Die Analyse der Herzfrequenz (HR) isolierter pränataler Herzen erbrachte für Ca<sub>v</sub>2.3 geninaktivierte Tiere keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren (HR:  $1,76 \pm 0,19 \text{ s}^{-1}$  (Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)) vs.  $2,09 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$  (Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)) - ein Phänomen, das sich nach autonomer pharmakologischer Denervierung auch bei adulten Tieren fand (Abb. 1.20). Trennte man allerdings Atrien und Vorhöfe, so zeigten sich sowohl auf Vorhofebene als auch auf Ventrikelenebene signifikante

Unterschiede zwischen  $Ca_v2.3(+|+)$ - und  $Ca_v2.3(-|-)$ -Tieren. Die  $Ca_v2.3(-|-)$  Atrien bzw. Ventrikel wiesen signifikant niedrigere Frequenzen auf als die Herzhöhlen der Kontrolltiere, wobei die beobachteten atrialen Frequenzen in beiden Genotypen größer als die ermittelten ventrikulären Frequenzen waren. Möglicherweise wird die höherfrequente atriale Aktivität nicht 1 : 1 auf die Ventrikel übergeleitet, was auf eine entwicklungsabhängige Maturation der atrialer Erregungsbildungs- und Leitungszentren sowie des atrioventrikulären Überleitungsbereichs (AV-Knoten, Hiss-Bündel) zurückzuführen sein könnte. Das Verhältnis von atrialer zu ventrikulärer Frequenz ist allerdings in beiden Genotypen konstant, so dass eine Störung der AV-Überleitung in embryonalen  $Ca_v2.3(-|-)$  Herzen zunächst unwahrscheinlich erscheint. Isolierte pränatale Kontrollherzen (38 von 40) zeigten weiterhin ein sehr regelmäßiges Muster extrazellulärer Feldpotentiale (Abb. 1.21), während isolierte pränatale Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Tiere ein unregelmäßiges Muster extrazellulärer Feldpotentiale aufwiesen. Der zur Kalkulation der Herzfrequenzvariabilität herangezogene Variationskoeffizient (*coefficient of variance*, CV) lag bei  $Ca_v2.3 (-|-)$  Tieren mit 10,8 % auch deutlich über dem der Kontrollgruppe mit 2,4 %.

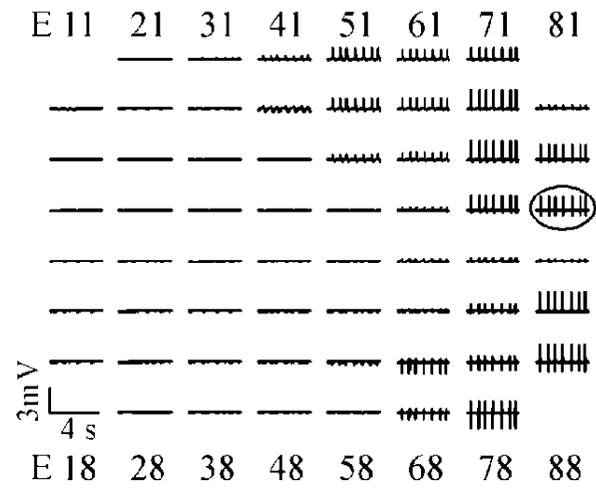
In isolierten Kontrollherzen zeigte sich weiterhin, dass die Erregungsfortleitung einer konstanten räumlichen Ausbreitung über das isolierte Herz folgt, während in isolierten  $Ca_v2.3$  defizienten Herzen kein zeitlich konstantes Muster der exzitatorischen Ausbreitung nachweisbar ist (Lu et al., 2004).

Die in isolierten, pränatalen  $Ca_v2.3(-|-)$  Herzen beobachteten Arrhythmien ließen sich auch durch Superfusion von  $Ca_v2.3(+|+)$  Herzen mit SNX-482 (200 nM), einem  $\alpha 1E$  spezifischen Peptidtoxin aus der Tarantel *Hysterocrates gigas* (Newcomb et al., 1998), provozieren. Der Variationskoeffizient stieg um das 3,6-fache von 8,3 % auf 30,1 % an (Abb. 1.23).

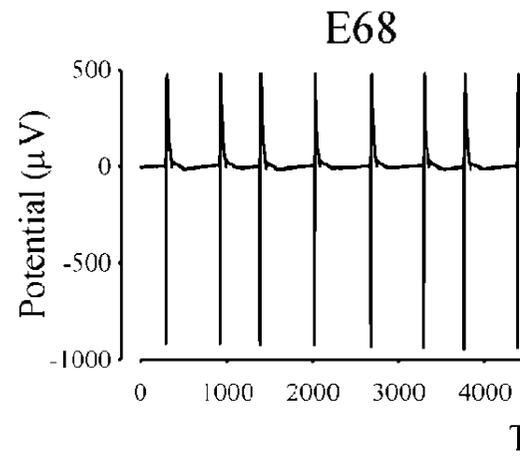


**Abb. 1.20: Mittlere Herzfrequenz isolierter pränataler  $Ca_v2.3(+/+)$  und  $Ca_v2.3(-/-)$  Herzen.** Für das Gesamtherz findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen. Trennt man hingegen Atrien und Ventrikel voneinander, so zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und *Knock-out*-Tieren mit durchweg höheren Frequenzen in der Kontrollpopulation (Lu et al., 2004).

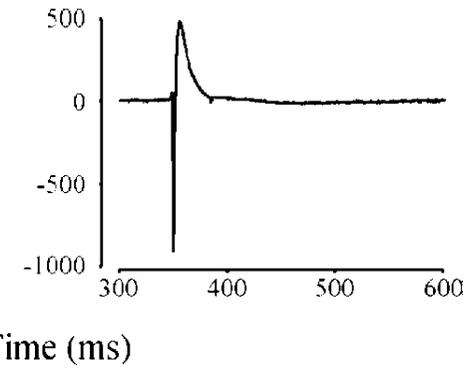
**A1.**



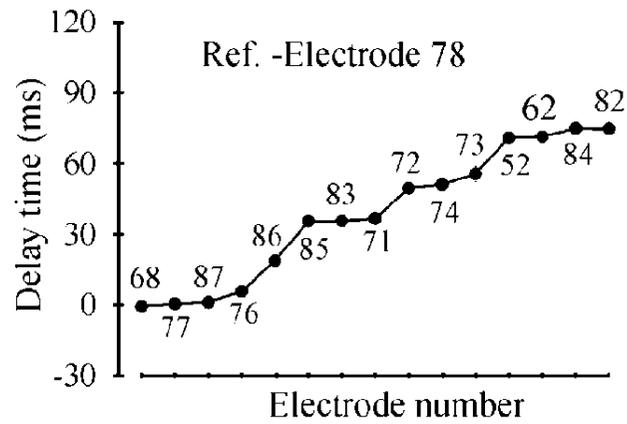
**B1.**



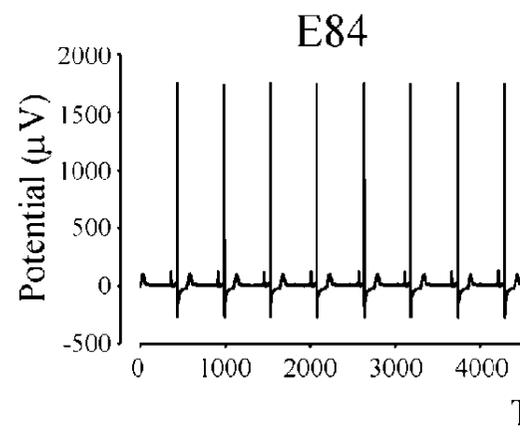
**B2.**



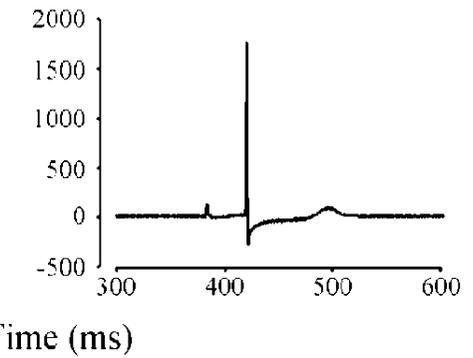
**A2.**



**C1.**



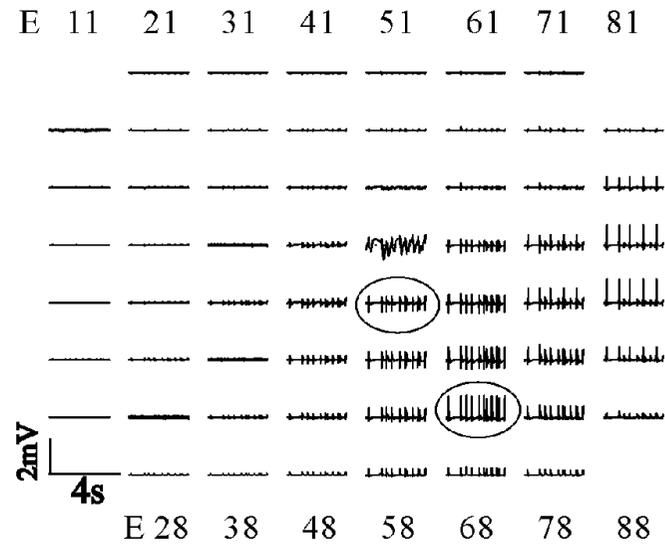
**C2.**



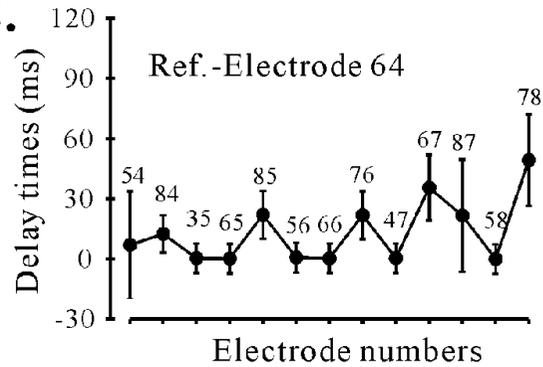
**Abb. 1.21: Elektrische Feldpotentiale isolierter pränataler Kontrollherzen, aufgenommen mittels eines *Multi Electrode Array (MEA) Systems* (siehe vorherige Seite).** Embryonale Maus Herzen wurden 11,5 - 12,5 Tage p.c. entnommen, auf MEA-Chips platziert und über Nacht inkubiert. A1) Die MEA-Elektrodenmatrix besteht aus 60 Elektroden (mit entsprechenden Nummern markiert). Dargestellt sind repräsentative extrazelluläre Feldpotentiale, abgeleitet an den entsprechenden Elektrodenpositionen. A2) Diagramm der Verzögerungszeit der einzelnen Feldpotentiale in A1. Man erhält damit einen Eindruck von der Ausbreitungsrichtung und der zeitlichen Konstanz dieses Prozesses. Der SEM (*standard error of the mean*) ist extrem klein bzw. kleiner als die Datenpunkte selbst. Damit wird deutlich, dass die Erregungsausbreitung in isolierten pränatalen Kontrollherzen zeitlich konstant und koordiniert abläuft. B1/2, C1/2) Extrazelluläre Feldpotentiale, abgeleitet an den Elektroden Nr. 68 und 84. Die Morphologie der Feldpotentiale unterscheidet sich markant in Abhängigkeit der Elektrodenlokalisierung. Dennoch wird deutlich, dass die isolierten pränatalen  $Ca_v2.3(+|+)$ -Herzen einen äußerst regelmäßigen Rhythmus aufweisen (Lu et al., 2004).

**Abb. 1.22: MEA-Analyse isolierter pränataler  $Ca_v2.3$  defizienter Herzen (siehe folgende Seite).** A1) Darstellung des MEA-Elektrodensystems mit repräsentativen Feldpotentialen. B1/2, C1/2) Feldpotentiale isolierter pränataler  $Ca_v2.3(-|-)$  Herzen bei höherer Auflösung. Deutlich ist die unregelmäßige Abfolge der Extrazellulärpotentiale erkennbar, was sich in einem 4-fach höheren Variationskoeffizienten im Vergleich zu pränatalen Kontrollherzen widerspiegelt. A2) Vergleicht man die zeitliche Abfolge der einzelnen Feldpotentiale, so wird deutlich, dass die Erregung an unterschiedlichen Elektroden, d.h. an unterschiedlichen Positionen der isolierten pränatalen  $Ca_v2.3(-|-)$  Herzen simultan ihren Ursprung zu haben scheint. Die im Vergleich zu Kontrollherzen massiven Schwankungen (SEM) in der zeitlichen Verzögerung der Feldpotentiale verdeutlichen weiterhin, dass kein zeitlich konstantes Muster der Erregungsausbreitung in pränatalen *Knock-out* Herzen vorliegt (Lu et al., 2004).

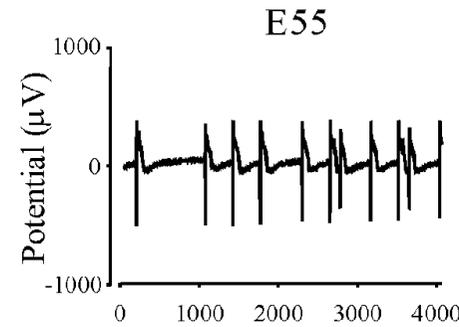
**A1.**



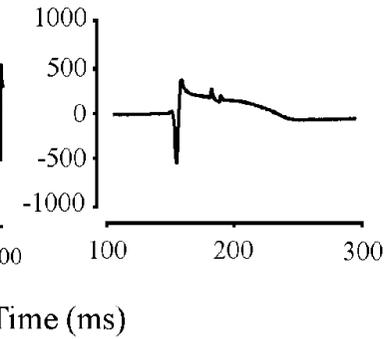
**A2.**



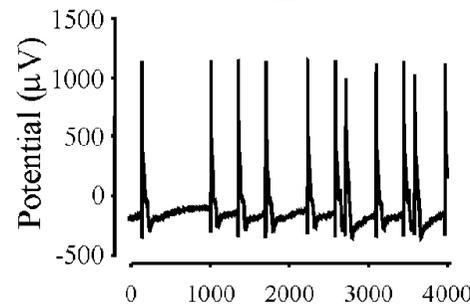
**B1.**



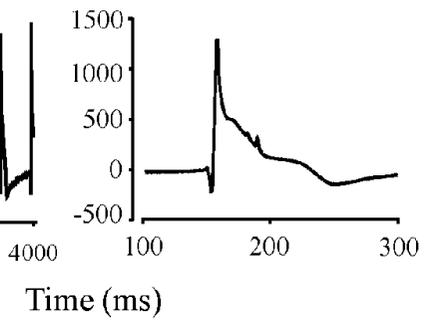
**B2.**

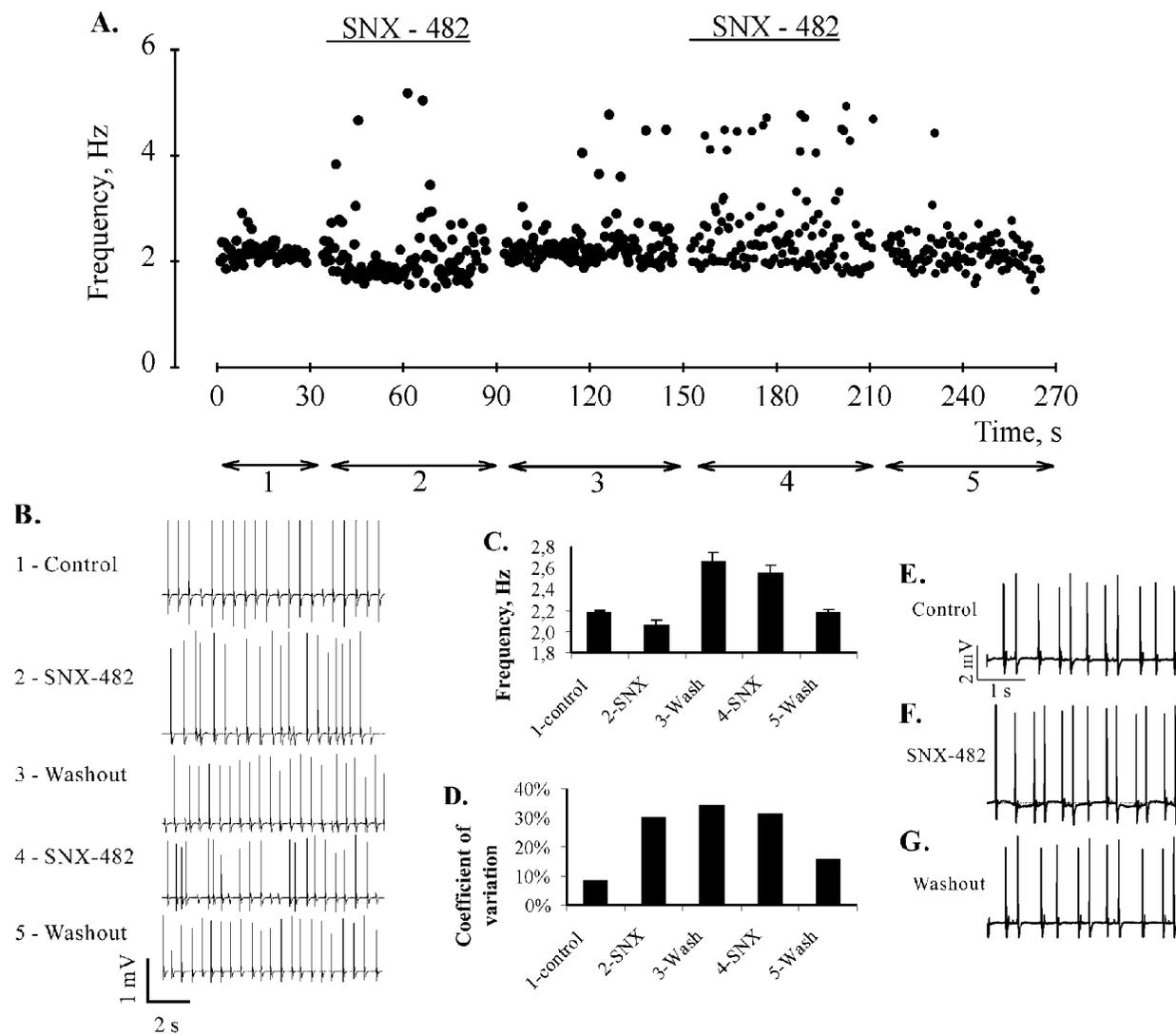


**C1.**



**C2.**





**Abb. 1.23: SNX-482-Effekt auf isolierte pränatale  $Ca_v2.3(+|+)$  Herzen.** A) Darstellung der Frequenzentwicklung nach verschiedenen SNX-482 Applikations- und Waschschritten. Die unterschiedlichen Phasen sind mit 1 - 5 gekennzeichnet. B) Repräsentative extrazelluläre Feldpotentiale unter den Bedingungen 1 - 5. Deutlich zeigt sich, dass der Variationskoeffizient nach SNX-482 Applikation zunimmt (D). Der Effekt ist hier nur nach dem finalen Waschschrift reversibel (Lu et al., 2004).

## 1.11. Ca<sup>2+</sup>-Kanalopathien und kardiale Rhythmusstörungen beim Menschen

Beim Menschen sind mittlerweile eine Vielzahl von Ca<sup>2+</sup>-Kanalopathien bekannt, die durch Mutationen unterschiedlicher Ionenkanal-Untereinheiten verursacht sind und die unterschiedlichsten Organsysteme involvieren. So können Mutationen der Ca<sub>v</sub>2.1 ( $\alpha$ 1A) Untereinheit sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen zu spinocerebellärer Ataxie Typ 6 (SCA6), episodischer Ataxie Typ 2 (EA2) und familiärer hemiplegischer Migräne (FHM) sowie Kombinationen der einzelnen Krankheitsbilder führen (Toru et al., 2000; Guida et al., 2001; Wappl et al., 2002; Pietrobon, 2002).

Mutationen der Ca<sub>v</sub>1.1 ( $\alpha$ 1S) Untereinheit sind für die hypokaliämische periodische Paralyse verantwortlich und Störungen der Ca<sub>v</sub>1.4 ( $\alpha$ 1F) Untereinheit bedingen eine Form der angeborenen Nachtblindheit (CSNB, *congenital stationary night blindness*). Beispiele für Mutationen von T-Typ Kalziumkanälen, die humanpathogenetisch relevant wären, sind bislang noch gering. Es gibt Hinweise, dass Ca<sub>v</sub>3.2 in die Pathogenese der Absencen-Epilepsie involviert ist. Die Zahl der transgenen Mausmodelle, die die Bedeutung der verschiedenen spannungsgesteuerten Kalziumkanaluntereinheiten und ihre Relevanz als Tiermodelle für die verschiedensten neurologischen und kardialen Erkrankungen des Menschen unterstreichen, ist in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen. Eine vollständige Darstellung all dieser Modelle sprengt daher den Rahmen dieser Abhandlung.

Ein eindrucksvolles Beispiel einer Mutation eines spannungsgesteuerten Kalziumkanals (Ca<sub>v</sub>1.2), das erst kürzlich beim Menschen beschrieben wurde – das Timothy-Syndrom, soll hier aber beispielhaft vorgestellt werden. Im Jahre 1992 wurde das Syndrom, welches sich u.a. durch kardiale Arrhythmien und Syndaktylie (Marks et al., 1995) auszeichnet, zum ersten Mal beschrieben und erhielt den Namen Timothy-Syndrom. Da es sich um eine Multi-System-Erkrankung handelt, findet man eine große Zahl anderer Störungen bei betroffenen Patienten, z.B. Zeichen der Immundefizienz und Autismus. Kardial fanden sich neben einem LQT-Syndrom und ventrikulären Tachyarrhythmien auch ein persistierender Ductus arteriosus Botalli, ein offenes Foramen ovale, ventrikuläre Septumdefekte, eine Fallot-Tetralogie sowie eine Kardiomegalie (Abb. 1.24-1.26).

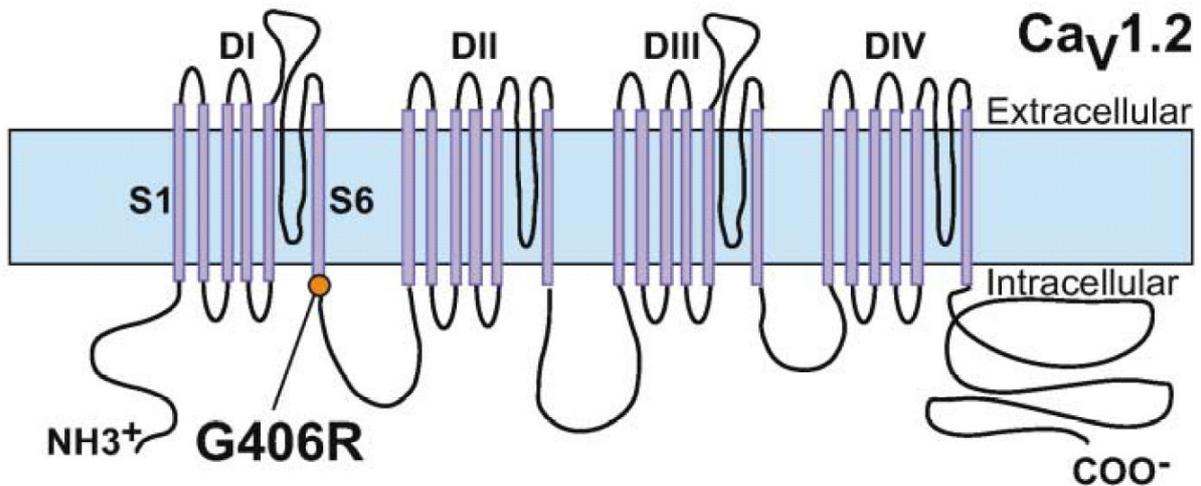


Abb. 1.24: Darstellung der  $Ca_v1.2$  Kalziumkanaluntereinheit mit der für das Timothy-Syndrom verantwortlichen *de novo* **Missense-Mutation G406R** (Splawski et al., 2004).

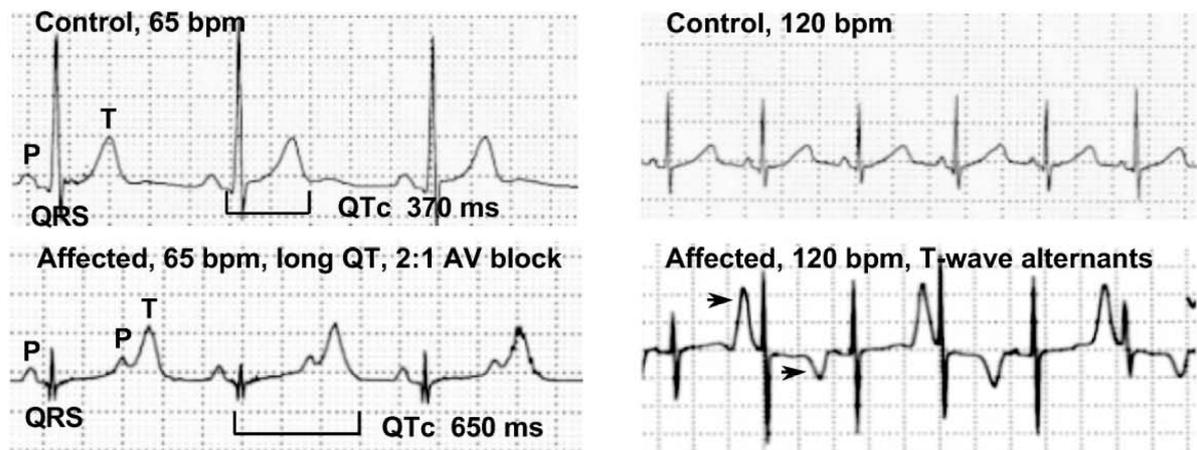
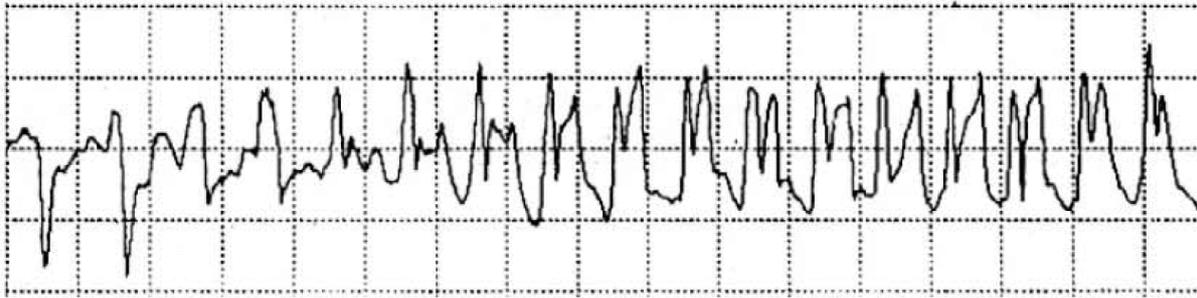
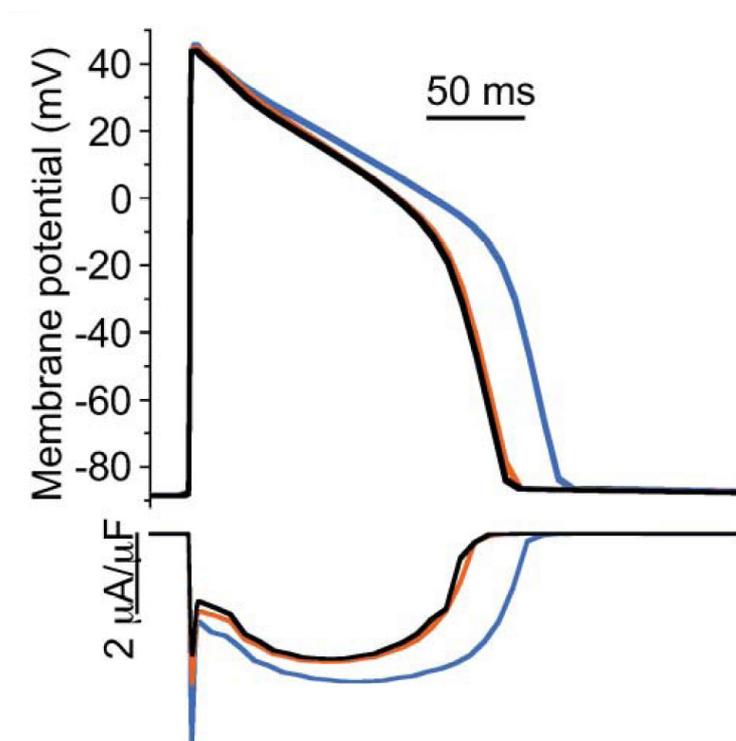


Abb. 1.25: Das Elektrokardiogramm eines Timothy-Patienten (untere EKG-Spuren) bei Ruhefrequenz (links) und höheren Frequenzen (rechts). Bei niedrigen Frequenzen zeigt sich eine so massive Verlängerung der QT-Zeit, dass bereits die nächste atriale Aktivierung einsetzt (P-Welle) und somit ein 2 : 1 Block imitiert wird. Bei hohen Frequenzen findet sich ein T-Wellen Alternans – eine Beobachtung, die auf schwerwiegende Alterationen der ventrikulären Repolarisation schliessen lässt (Splawski et al., 2004).



**Abb. 1.26: Darstellung polymorpher ventrikulärer Tachykardien in Patienten mit Timothy-Syndrom und implantiertem Defibrillator.** Die Herzfrequenz beträgt ca. 300/min (Splawski et al., 2004)



**Abb. 1.27: Auswirkungen der  $Ca_v1.2$  (G406R)-Mutation auf das kardiale Aktionspotential (oben) sowie der Kalziumeinstrom (unten) im Computermodell.** Der mutierte  $Ca_v1.2$  Kanal (Heterozygotie, blau) zeigt zwar nur eine geringe Änderung der Inaktivierung im Vergleich zum Wildtyp (schwarz), führt aber zu einer 17 %igen Prolongation des Aktionspotentials. Erst die Reduktion des von  $Ca_v1.2$  (G406R) getragenen Kalziumeinstroms um 35 % kann ein Aktionspotential von regelrechter zeitlicher Ausdehnung (rot) wiederherstellen (Splawski et al., 2004).

Schließlich stellte sich heraus, dass eine de novo *Missense*-Mutation (G406R) Ursache des Timothy-Syndroms ist, eine Mutation, die sich am C-terminalen Ende des Insertionssegmentes 6 der ersten Domäne findet. Die Aminosäuresequenz in

dieser Region ist speziesübergreifend und im Vergleich mit anderen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen zu 100 % konserviert. Der elektrophysiologische Vergleich der Wildtyp  $Ca_v1.2$  Variante mit der G406R- $Ca_v1.2$ -Mutante in heterologen Expressionssystemen ergab, dass der Glycin-Arginin-Austausch zu einer dramatischen Abnahme der Inaktivierung führte. Im Computermodell bewirkt der verlängerte Kalziumeinstrom eine Prolongation des myokardialen Aktionspotentials mit QT-Zeit-Verlängerung und erhöhter Suszeptibilität für maligne Arrhythmien.

## 1.12. Fragestellung

Arrhythmien stellen innerhalb der Kardiologie eine Erkrankungsgruppe von hoher medizinischer und grundlagenwissenschaftlicher Bedeutung dar. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung der funktionellen Relevanz des spannungsgesteuerten Kalziumkanals  $Ca_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ) bei der kardialen myogenen Automatizität in Erregungsbildungszentren sowie der Erregungsfortleitung im Erregungsleitungssystem. Mittels molekularbiologischer, immunologischer und elektrophysiologischer Verfahren, wie *Patch-Clamping* und telemetrische EKG-Aufzeichnungen soll eine kardiovaskuläre Phänotypisierung  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse durchgeführt werden.  $Ca_v2.3$ -Transkripte sollen im Herzen unterschiedlicher Spezies mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden, wobei deren kardiomyozytärer Ursprung durch *Single-cell* RT-PCR-Experimente belegt werden soll. In qualitativen und quantitativen EKG-Analysen erfolgt die kardiovaskuläre Charakterisierung, die Aufschluss über die funktionelle Bedeutung des  $Ca_v2.3$  Kalziumkanals im Herzen wie auch bei der autonomen kardialen Kontrolle geben soll. Auch die Analyse anderer spannungsgesteuerter Kalziumkanäle ( $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$ ) wird hierbei im Rahmen möglicher Kompensationsprozesse mit berücksichtigt, um zu eruieren, welche Rolle  $Ca_v2.3$  bei der Genese kardialer Arrhythmien im Tiermodell spielt.

## 2. Materialien

### 2.1. Allgemeine Reagenzien

<u>Reagenz</u>	<u>Reinheitsgrad</u>	<u>Artikel-Nr.</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	p.a.	1.00014.1011	Merck (Darmstadt, GER)
Acrylamid	p.a.	1685791	Boehringer-Mannheim (Ingelheim, GER)
Ammoniumper- oxodisulfat (APS)	ACS-grade	0486-25G	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Bromphenol-Blau	Na-Salz	12370	USB (Distributor: Amersham Biosciences, Freiburg, GER)
BSA	Fraktion V	01400	Biomol (Hamburg, GER)
Butanol-1	p.a.	1.01990.1000	Merck (Darmstadt, GER)
CaCl <sub>2</sub>	p.a.	1.02382.1000	Merck (Darmstadt, GER)
Coomassie Brilliant pure Blue G 250	reinst	17524	Serva (Heidelberg, GER)
Coomassie Brilliant pure Blue R 250	reinst	17525	Serva (Heidelberg, GER)
Kreatin	min. 99 %	C-3630	Sigma (München, GER)

<b>Reagenz</b>	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
CsCl	min. 99,5 %	C-3139	Sigma (München, GER)
CsOH	min. 90 %	C-8518	Sigma (München, GER)
CuSO <sub>4</sub>	> 99 %	C-1297	Sigma (München, GER)
EDTA	> 99 %	8043.2	Roth (Karsruhe, GER)
EGTA	min. 97 %	E-4378	Sigma (München, GER)
Essigsäure	100 %, p.a.	K26183463	Merck (Darmstadt, GER)
Ethanol	abs., > 99,8 %	8006	J.T.Baker (über Fisher Scientific, Schwerte, GER)
Formaldehyd	37 %	F-1635	Sigma (München, GER)
Glucose	99,5 %	G-7528	Sigma (München, GER)
Glutaminsäure	99 %	G-1501	Sigma (München, GER)
Glycin	> 99 %	04943	Biomol (Hamburg, GER)
HCl (2 N)	p.a.	1.09063.1000	Merck (Darmstadt, GER)
HCl	37 %	1.13386.2500	Merck (Darmstadt, GER)
HEPES	> 99,7 %	11344-025	GibcoBRL (Gaithersburg, Maryland, USA)

<b>Reagenz</b>	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Isopropranolol	> 99 %	0918-1L	Amresco (Solon, Ohio, USA)
KCl	> 99 %	P-9333	Sigma (München, GER)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X 3H <sub>2</sub> O	> 99 %	12040.0250	Merck (Darmstadt, GER)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	p.a.	4873	Merck (Darmstadt, GER)
Magermilchpulver	fettarm	3030	Heirler (Radolfzell, GER)
2-Mercaptoethanol	> 99 %	0482-100ML	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Methanol, abs.	> 99,8 %	4627.2	Roth (Karlsruhe, GER)
MgCl <sub>2</sub>	p.a.	1.05833.1000	Merck (Darmstadt, GER)
MOPS	p.a.	29836	Serva (Heidelberg, GER)
N-Methyl-D-Glucamin	>99 %	M-2004	Sigma (München, GER)
N,N'-Methylenbis-Acrylamid	p.a.	1685830	Boehringer-Mannheim (Ingelheim, GER)
Natriumacetat	p.a.	6268	Merck (Darmstadt, GER)
NaCl	> 99,5 %	3957.2	Roth (Karlsruhe, GER)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	> 99 %	S-7795	Sigma (München, GER)

<b>Reagenz</b>	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
NaHCO <sub>3</sub>	99 %	1.59316.0050	Merck (Darmstadt, GER)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	> 99,5 %	1.03095.1000	Merck (Darmstadt, GER)
NaN <sub>3</sub>	Sigma ultra	S-8032	Sigma (München, GER)
NaOH (1 N)	p.a.	1.09137.1000	Merck (Darmstadt, GER)
NaOH (2 N)	p.a.		Merck (Darmstadt, GER)
Natriumcitrat	99,5 %	S-4641	Sigma (München, GER)
Natriumtartrat	98 %	289981	Sigma (München, GER)
Paraformaldehyd	> 95 %	P6148	Sigma (München, GER)
Ponceau S	practical grade	P-3504	Sigma (München, GER)
Saccharose	für biochem. Zwecke	1.07687.1000	Merck (Darmstadt, GER)
SDS	99 %	L-4390	Sigma (München, GER)
Taurin	approx. 99 %	T-0625	Sigma (München, GER)
TEMED	ultra-pure	0761-100ML	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Trichloressigsäure	> 99 %	T-9159	Sigma (München, GER)
Tris	> 99,9 %	4855.3	Roth (Karsruhe, GER)

TWEEN™-20      zur Synthese      8.22184.0500      Merck (Darmstadt, GER)

## 2.2. Geräte

### **Gewebehomogenisator**

Ultra-Turrax T25, Leerlaufdrehzahl 8000 /min, Jahnke & Kunkel.

### **Zentrifugationseinrichtungen**

1. Braun Biotech International, Modell Sigma 1K15 (Kühlzentrifuge).
2. Beckmann GS-6KR.
3. Heraeus Instruments Biofuge pico.
4. Beckmann J2-HS mit Beckmann JA-20 Rotor.
5. Beckmann L60-Ultrazentrifuge mit SW55 Rotor.

## 2.3. Materialien zur Mikrosomenisolation

### **Proteinaseinhibitoren:**

#### **PMSF** (Phenylmethylsulphonylfluorid)

Final 0,1 mM, Konz. Stammlsg.: 200 mM, 349 mg / 10 ml Ethanol, No. 32395, Serva (Heidelberg, GER).

#### **Phenanthrolin**

Final 1 mM, Konz. Stammlsg.: 500 mM, 990 mg / 10 ml Ethanol, No. 32010, Serva (Heidelberg, GER).

#### **Iodacetamid**

Final 1 mM, Stammlsg.: 300 mM, 925 mg / 10 ml H<sub>2</sub>O, No. I-1149, Sigma (München, GER).

### **Benzamidin**

Final 4 mM, Stammlsg.: 400 mM, 625 mg / 10 ml (50 % Ethanol), No. B-6506, Sigma (München, GER).

### **Pepstatin**

Final 1 µM, Stammlsg.: 1 mM; 6,85 mg / 10 ml Ethanol, No. 77170, Fluka (Buchs, Switzerland).

### **Leupeptin**

Final 1 µg/ml, Stammlsg.: 1 mg / ml H<sub>2</sub>O, No. L-9783, Sigma (München, GER).

### **Mikrosomenpuffer:**

Mikrosomenpuffer I:       - 50 mM Tris, pH 7,4  
                                  - 1 mM EDTA

Mikrosomenpuffer II:     - 20 mM MOPS  
                                  - 300 mM Saccharose  
                                  - 2 mM EDTA  
                                  - pH 7,4

### **Reagenzien zur Proteinbestimmung:**

#### **BCA-Assay, Reagenz A:**

Pierce (1000 ml, RT), No. 23223:

- 1 % Bicinchoninsäure-Dinatriumsalz
- 2 % Natriumkarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)
- 0,95 % Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)
- 0,16 % Natriumtartrat
- 0,4 % NaOH

### **BCA-Assay, Reagenz B:**

Pierce (25 ml, RT), No. 23224:

- 4 % CuSO<sub>4</sub>

## **2.4. Materialien für SDS-PAGE / Western Blot**

### **2.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli)**

#### **Acrylamid-Stammlösung (Monomerenstammlösung, 30 % (m/v), Dunkel-lagerung bei 4°C; Sterilfiltration)**

- 29 % Acrylamid (m/v)
- 1 % N,N-Methylenbisacrylamid (m/v)

#### **Trenngel-Puffer (Lagerung bei RT)**

- 1,5 M Tris (Tris-8-hydroxymethyl-aminomethan)
- pH 8,7 (mit verdünnter HCl-Lösung einstellen)

#### **Sammelgel-Puffer (Lagerung bei RT)**

- 0,5 M Tris
- pH 6,3 (mit verdünnter HCl-Lösung einstellen)

#### **10 % (m/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)**

#### **TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)**

#### **10 % (m/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat, Lösung frisch ansetzen)**

#### **Standard-Elektrophoresepuffer (Lagerung bei RT)**

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS (m/v)

**5X SDS-Probenpuffer (Denaturierungspuffer, Laemmli-Puffer, Lagerung bei -20°C)**

- 15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)
- 15 % SDS (m/v)
- 1,5 % Bromphenol blau (m/v)
- 50 % Glycerin (v/v)

**Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE**

***High Molecular Weight Standard Mixture for SDS-Gel-Electrophoresis (SDS-6H Marker, Sigma Chemical Company, Sigma-Aldrich Corp., München, GER)***

**Proteinkomponenten und Molekulargewicht (Da):**

Myosin (Kaninchen)	205000
$\beta$ -Galactosidase (E.coli)	116000
Phosphorylase b (Kaninchen Muskel)	97400
Albumin (Rind)	66000
Albumin (Ei)	45000
Carboanhydrase (Rinder-Erythrozyten)	29000

Hinsichtlich des Ansetzens der Markerstammlösung folgten wir den Herstellerangaben. Appliziert wurden für ein Standardgel 10  $\mu$ l der Markerlösung (Lagerung bei -20°C).

**Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE**

***SDS-Molecular Weight Marker (M 4038, Sigma Chemical Company, Sigma-Aldrich Corp., München, GER)***

**Proteinkomponenten und Molekulargewicht (Da):**

Myosin	205000
$\beta$ -Galactosidase (E.coli)	116000
Phosphorylase b	97400
Fructose-6-P-Kinase	84000
Albumin	66000
Glutamindehydrogenase	55000

Ovalbumin	45000
Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	36000
Carboanhydrase	29000
Trypsinogen	24000
Trypsininhibitor	20000
$\alpha$ -Lactalbumin	14200
Aprotinin	6500
(Lagerung bei -20°C)	

### **Parafilm „M“**

Laboratory Film (American National Can<sup>TM</sup>, Chicago)

### **Thermo-(Heiz)block**

### **Elektrophoresekammer für SDS-PAGE**

Multigel-Long, Biometra, Göttingen, GER

### **Aqua dest. (Milli-Q-Anlage, Millipore)**

### **Wasserstrahlpumpe (zum Entgasen)**

## **2.4.2. Semi-Dry Blot**

### **Proteintransferpuffer:**

### **Towbins Tris-Glycin-Transferpuffer (Standardtransferpuffer, Lösung frisch ansetzen)**

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 20 % Methanol (v/v)

### **Modifizierter Transferpuffer (Lösung frisch ansetzen)**

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 10 % Methanol (v/v)
- 0,01 % SDS (m/v)

### **Whatman-Paper**

Whatman Paper Ltd., Maidstone, Kent, UK

### **PVDF (Polivinyldendifluorid)-Immobilisationsmembran**

- MILLIPORE® (Immobilon-P Transfer-Membran, IVP H 00010, Porengröße: 0,45 µm)

### **Nitrozellulosemembran**

- Hybond ECL (Amersham LIFE SCIENCE)

### **Blockierlösung**

- PBST (PBS, pH 7,4 + 0,1 % (v/v) Tween™-20)
- 5 % Magermilchpulver

### **PBST-Phosphate Buffered Saline Tween**

- 1 X PBS
- 0,1 % Tween™-20

### **Waschlösungen**

- PBST + 2 % BSA
- PBST

### **Detektionssystem**

***ECL Western blotting detection reagents, RPN 2209 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, GER)***

Detektionsreagenz 1 (62,5 ml)

Detektionsreagenz 2 (62,5 ml)

Ausreichend für 1000 cm<sup>2</sup> Membranoberfläche

Haltbarkeit aller Komponenten mindestens 6 Monate, Lagerung bei 2 - 8°C.

### **Filmmaterial**

**Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, GER)**

Autoradiographiefilm, RPN 2103

### **Entwicklermaschine für Hyperfilm ECL**

Curix 60, Agfa, Köln, GER

### **Entwickler**

G153; 2,5 Liter, Agfa, Köln, GER

### **Fixierer**

G353; 2,5 Liter, Agfa, Köln, GER

### ***Semi-Dry-Blotting-Apparatur***

Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA

### **Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung**

- 0,2 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue R250
- 0,05 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue G250
- 42,5 % (v/v) Ethanol (vergällt)
- 5 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

### **Coomassie-Entfärbelösung**

- 45 % (v/v) Ethanol (vergällt)
- 10 % (v/v) Essigsäure

### **Ponceau-S Red-Färbelösung (10 X)**

- 2 % (m/v) Ponceau-S rot
- 30 % (m/v) Trichloressigsäure
- 30 % (m/v) Sulfosalicylsäure

### **Ablösepuffer (*stripping*-Puffer), Lösung frisch ansetzen**

- 100 mM 2-Mercaptoethanol
- 2 % SDS (m/v)
- 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7

## 2.5. Histochemische Arbeitsmaterialien

### 2.5.1. Allgemeine Reagenzien

#### **PBS (pH 7.4)**

- 7,75 g Natriumchlorid (NaCl)
- 1,50 g Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Verdünnen auf 1,0 Liter mit demineralisiertem Wasser, gegebenenfalls pH-Wert Einstellung durch Zugabe von 3 M NaOH.

#### **Tris (pH 7,4)**

- 6,61 g Tris-HCl
- 0,97 g Tris-Base

Verdünnen auf 1,0 Liter mit demineralisiertem Wasser, gegebenenfalls pH-Wert Einstellung mit 1 M NaOH-Lösung oder 1 M HCl-Lösung.

#### **Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Medizinisch reinst, stabilisiert (Merck), 30 %, (Perhydrol), Lagerung bei 4°C, Stammlösung zur Erstellung der Peroxid-Blockierlösung.

#### **Nicht-wässriges Eindeckmedium (*histological mounting medium: Permount*)**

Fisher Scientific, 100 ml, Lagerung bei RT, SP15-100, Lot.NO.: 994868-24.

#### **Mayer's Hämatoxilin-Lösung**

0,1 %, 1L, Lagerung bei RT., Cat.-No. MHS-32, SIGMA-Diagnostics (München, GER)

### **Eosin**

Für Mikroskopie und Adsorptionsindikator, Art. 1345/5191108, Merck (Darmstadt, GER)

### **Eosin Aqueous**

Chandon, 0,5 %, Lagerung bis 30°C, Prod. No. 6766009

### **Deckgläser**

20 X 20 mm, AL-Menzel-Gläser (Braunschweig, GER)

24 X 50 mm, AL-Menzel-Gläser (Braunschweig, GER)

### **Objektträger: Super Frost Plus**

Objektträger geputzt, geschliffen, 72 St., 25 X 75 X 1,0 mm, Menzel-Gläser (Braunschweig, GER)

### **Immersionsöl für Mikroskopie**

Immersionsöl Zeiss 518N, halogenfrei; UN 3082, 250 ml, INR: 360.737,  $n_e$ : 1,518 (23°C), Zeiss (Göttingen, GER)

### **Coplin-Objektträger-Behälter**

Färbetröge-Glas, für 10 Objektträger, Merck (Darmstadt, GER)

### **Versandbehälter für Objektträger**

Für 5 Objektträger, Merck (Darmstadt, GER)

### **Objektträger-Kästen**

Für 100 Präparate, 222 X 171 X 33 mm, Merck (Darmstadt, GER)

### **Präparate-Archiv-Mappen/Tafeln mit Deckel**

Für 20 Objektträger, Merck (Darmstadt, GER)

### **Färbetröge**

Typ Hellendahl, mit Erweiterung PMP (TPX), glasklar, mit Deckel, für Objektträger 26 X 76 mm, Merck (Darmstadt, GER)

## **Färbetrog und Färbegestell mit Drahtbügel**

Merck (Darmstadt, GER)

## **Einbettkassetten mit Deckel**

Typ Reichert-Jung, POM, Merck (Darmstadt, GER)

## **Lichtmikroskop der Firma Zeiss (Durchlichtmikroskop)**

Axioskop, Zeiss (Göttingen, GER)

### **2.5.2. Antikörperliste**

In der folgenden Liste sind Antikörper aufgeführt, die für *Western-Blot* Untersuchungen verwendet wurden. Weiterhin sind das Immunogen, die Art des Antikörpers (monoklonal/polyklonal) und das Wirtstier (*host*) angegeben.

#### **Anti-Ca<sub>v</sub>2.3-( $\alpha$ 1E)-„specific“ (anti-Nast 197)-Antikörper**

Peptidantikörper, polyklonal, Kaninchen, Epitop: aa 1981 - aa 1993: GIYLPSTQEHAG(C), aus dem Carboxyterminus der humanen  $\alpha$ 1Ed Isoform, *Gen Bank Accession* No. L27745; für Kopplungszwecke wurde ein zusätzlicher Cysteinyln-Rest am C-Terminus angefügt.

#### **Anti-Ca<sub>v</sub>2.3-( $\alpha$ 1E)-„common“ (anti-Nast 195)-Antikörper**

Peptidantikörper, polyklonal, 3. „Boosterung“, Kaninchen, Epitop: aa 256 - aa 273: SGILEGFDPHPHPCGVQG(C), für Kopplungszwecke wurde ein zusätzlicher Cysteinyln-Rest am C-Terminus angefügt; extrazellulär lokalisierte Schleife zwischen dem Segment IS5 und dem Porenbereich der Domäne I, identisch in allen bislang publizierten Ca<sub>v</sub>2.3-Isoformen, *Gen Bank Accession* No. L27745.

#### **Anti-Ca<sub>v</sub>3.1-( $\alpha$ 1G)-4a-Antikörper**

Peptidantikörper, polyklonal, Kaninchen, Epitop: aa 2327 - aa 2345: (C)PSPKKDVLSLSGLSSDP, für Kopplungszwecke wurde ein zusätzlicher Cysteinyln-Rest angefügt.

## 2.6. Verfahren zur Isolation, Auftrennung und Detektion von $Ca_v\text{-}\alpha 1$ -Kalziumkanaluntereinheiten

### 2.6.1. Mikrosomale Membranen aus Gewebe und Zellkulturen

#### 2.6.1.1. Mikrosomenpräparation

Die Mikrosomenpräparation erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Flockerzi et al. (1986a/b). Die im Folgenden aufgeführten Arbeitsschritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt, wobei die benötigten Zentrifugen ebenfalls auf 4 °C vorgekühlt wurden. Unmittelbar vor Gebrauch des Mikrosomenpuffers II erfolgte die Zugabe der Proteinaseinhibitoren mit folgenden finalen Konzentrationen: 4 mM Benzamidin; 1 mM Phenanthrolin, 1 mM Jodacetamid; 0,1 mM PMSF; 1 µM Pepstatin A; 1 µg/ml Leupeptin. Es wurden zunächst Großhirne und Herzen von Kontrollmäusen und  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem Mörser mittels Pistill pulverisiert.

Das Gewebe-Pulver von jeweils 2 Organen wurde in 12 ml komplettiertem Mikrosomenpuffer II zwecks Gewebeaufschlusses mittels eines Gewebemogenisators (Ultraturrax) in 3 Pulsen von jeweils 5 s Dauer homogenisiert und anschließend 30 min bei 5000 X g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand 1 mit der Fraktion leichter Mikrosomen wurde durch 6 Lagen Gaze filtriert und auf Eis aufbewahrt (Filtrat 1), das Pellet in 6 ml komplettiertem Mikrosomenpuffer II resuspendiert und wieder für 30 min bei 5000 X g zentrifugiert. Überstand 2 wurde ebenfalls filtriert (Filtrat 2).

Nach Vereinigung von Filtrat 1 und Filtrat 2 wurde festes KCl unter Rühren bis zu einer Konzentration von 0,6 M dem vereinigten Filtrat zugesetzt. Anschließend wurde unter gelegentlichem Mischen 15 min auf Eis inkubiert. Hieran schloss sich eine zehnmünütige Zentrifugation bei 8500 X g an, wobei der gewonnene Überstand abgenommen, auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zur Pelletierung der Mikrosomen 40 min bei 100000 X g (4°C) zentrifugiert wurde.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet sodann in 200 µl Mikrosomenpuffer II resuspendiert und in 20 µl Aliquots tiefgefroren. Alternativ kann vor dem Einfrieren bei -80 °C noch 5 µl 5 X SDS-Denaturierungspuffer zugegeben werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand eines nicht denaturierten Aliquots mittels der BCA-Methode.

Für die Mikrosomenpräparation aus kultivierten Zellen kam ein modifiziertes Protokoll nach Wei et al. (1995) zum Einsatz.

Wie bei der Mikrosomenpräparation aus Gewebe wurden auch hier alle Arbeitsschritte bei 4°C in einem Kühlraum durchgeführt und die verwendeten Zentrifugen und Pufferlösungen ebenfalls auf 4°C vorgekühlt. Kurz vor Gebrauch ist der Mikrosomenpuffer I mit Proteinaseinhibitoren, wie oben beschrieben, zu komplettieren.

Das Medium von zwei Kulturschalen von 10 cm Durchmesser wurde dekantiert und die Zellen in je 10 ml PBS gewaschen. Dieses PBS wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in je 8 ml PBS aufgenommen und 5 min bei 450 X g (Beckmann GS-6KR) zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in je 5 ml Mikrosomenpuffer I resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min geschüttelt. Der hypoosmolare Puffer bewirkt hierbei eine osmotische Lyse der Zellen.

Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min bei 450 X g) zur Pelletierung der schweren Membranfraktionen. Das Pellet wurde in komplettiertem Mikrosomenpuffer I gelöst und, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, aliquotiert eingefroren. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 100000 X g (4°C) zentrifugiert, das Pellet sodann in 200 µl Mikrosomenpuffer I resuspendiert und in 20 µl Aliquots, alternativ mit 5 µl 5 X SDS-Denaturierungspuffer pro Aliquot versetzt (s.o.), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der BCA-Methode.

#### **2.6.1.2. Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuremethode (BCA-Methode)**

In proteinhaltiger Lösung wird zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduziert. Bicinchoninsäure weist spezifisch Kupfer(I) unter Bildung eines rosafarbenen Farbkomplexes nach. Die Absorption wird photometrisch bei 562 nm gemessen und ist direkt proportional zur Proteinkonzentration (basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz).

Die fertige BCA-Detektionslösung besteht aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50 : 1 und ist einen Tag bei Raumtemperatur stabil. Zuerst muss anhand einer Protein-Eichkurve der Extinktionskoeffizient ermittelt werden. Hierzu wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard in Konzentrationen von 0 bis 0,25 mg/ml verwendet. Eine 50 µl Probe bzw. BSA-Standard wurde zu 1 ml BCA-

Detektionslösung gegeben, 30 min bei 56°C inkubiert und dann über 40 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Extinktionswerte bei 562 nm gegen Aqua bidest. als Leerwert. Zur Auswertung der Eichkurve diente das Programm Origin 6.0 (Microcal Software, Incl.). Auf dieser Grundlage wurde die Proteinkonzentration der Proben in [mg/ml] bestimmt.

### **2.6.2. Verfahren zur Proteindetektion - Grundlagen der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

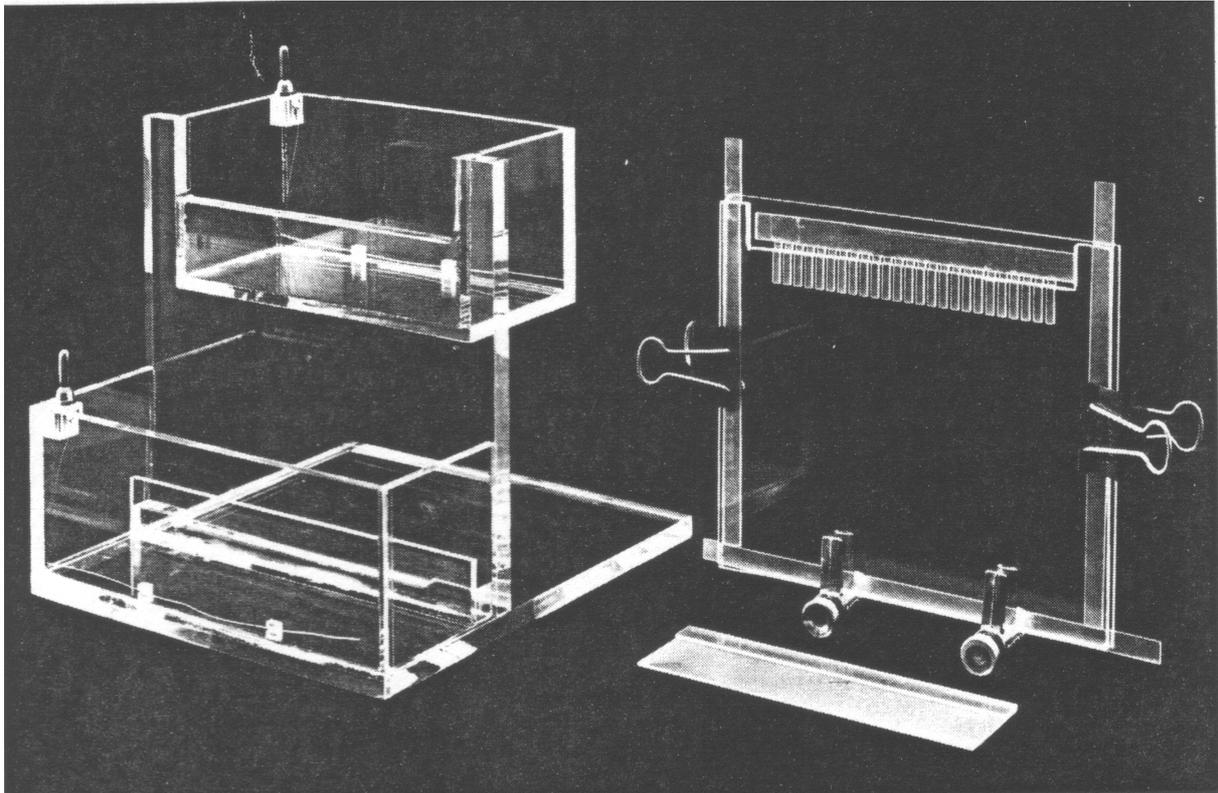
Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches mit der Möglichkeit des anschließenden Proteintransfers auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF) - oder Nitrozellulosemembran (sog. *Western-Blot*-Verfahren).

Bei dem verwendeten Elektrophoreseverfahren handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, mit Sammelgel und Trenngel, im Gegensatz zur kontinuierlichen Gelelektrophorese. Prinzipiell können kontinuierliche wie auch diskontinuierliche Verfahren als Flachbett- oder Rundgelelektrophorese durchgeführt werden. Der wesentliche Vorteil der Flachbettgelelektrophorese liegt in der Vergleichbarkeit parallel aufgetragener Proben und der anschließenden Transfer- (*Blotting*)-Möglichkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit kam die Flachbett-Disk-Gelelektrophorese zum Einsatz, bei der das Acrylamid zwischen zwei Glasplatten in Form einer rechteckigen Masse polymerisiert. Die Glasplatten sind an den Rändern mit Abstandhaltern (*spacer*) versehen und werden zudem noch seitlich und basal mit einem Silikonband abgedichtet.

Vor Herstellung des benötigten Gels wurden die benötigten Glasplatten zunächst zur Entfernung eventuell vorhandener Acrylamidreste und Vermeidung von Kontamination mit Fremdprotein gründlich mit einem Detergenz (Spülmittel) gereinigt. Es folgte eine Behandlung mit Aqua dest. und Ethanol, bevor die Platten luftgetrocknet wurden. Um eine Kontamination mit Fremdprotein zu vermeiden, wurden während des gesamten Versuchs Handschuhe getragen.

Bei der Auswahl des Prozentgehaltes und damit der Porosität des Acrylamid-Trenngels muss v.a. das erwartete Molekulargewicht der relevanten, zu detektierenden Proteinfraction mit berücksichtigt werden.



**Abb. 2.1: Flachbett-Gelelektrophorese und Elektrophoresekammer** (Cooper T.G., 1981).

Zur Analyse der Spezifität der untersuchten Peptidantikörper sowie der Analyse der Verteilung von Ca<sub>v</sub>2.3 in verschiedenen Geweben kamen 5 -, 6 -, 6,5 - und 7,5 %ige Trenngele zum Einsatz. Die besten Ergebnisse haben niederprozentige Gele erbracht, z.B. 5 %, die allerdings relativ diffuse Banden beim weiteren *Blotting*-Verfahren liefern. Schärfere Banden erbringen Gele mit einem Prozentgehalt von 7,5 oder höher, allerdings wird der Proteintransfer aus dem Gel zur Transfermembran hin dann auch merklich schwieriger.

Zur Zusammensetzung bei verschiedenen Trenngelkonzentrationen siehe auch Tab. 2.1. Die einzelnen Komponenten wurden zunächst zusammengefügt und die Lösung sodann unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe entgast (ca. 5 min), um später lästige Gasbildung während des Polymerisationsprozesses und daraus resultierende Inhomogenitäten im Trenngel zu vermeiden und Sauerstoff als Radikalfänger zu entfernen. Erst dann erfolgte die Zugabe von TEMED und zuletzt von Ammoniumperoxodisulfat zur Initiation der Radikalkettenreaktion.

In Wasser gelöstes APS bildet freie Radikale, wodurch es zur Initiation einer Radikalkettenreaktion mit der Ausbildung langer Polyacrylamidketten kommt. Um eine Vernetzung zu erreichen, ist die Zugabe von N,N'-Methylenbisacrylamid

notwendig. Die Porengröße wird hierbei zum einen bestimmt durch die Acrylamidkonzentration, zum anderen aber auch durch den Grad der Quervernetzung. Zur Variation der Porengröße hat es sich am vorteilhaftesten erwiesen, die Acrylamidkonzentration zu variieren. Das ebenfalls zugegebene TEMED dient als Katalysator der Gelbildung, da dessen freie Radikale metastabil sind. Das Trenngel wurde mit Butanol (wassergesättigt) überschichtet und polymerisierte in ca. ½ Stunde.

Während das Trenngel polymerisiert, erfolgte die Fertigstellung des Sammelgels.

Zusammensetzung des **Sammelgels**:

<b>Sammelgel-Konzentration</b>	<b>4,5 %</b>
Acrylamid (Stammlösung 30 %)	1,5 ml
H <sub>2</sub> O (MilliQ)	5,7 ml
0,5 M Tris/HCl; pH 6,3	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
TEMED	20 µl
10 % APS	60 µl

**Tab. 2.1: Trenngel-Zusammensetzung bei unterschiedlichen Konzentrationen.**

<b>Trenngel-Konzentration</b>	<b>5 %</b>	<b>6 %</b>	<b>6,5 %</b>	<b>7,5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>12,5 %</b>
Acrylamid-Lösung (30 %)- (Acrylamid 29 %; Bisacrylamid 1 %)	2,5 ml	3 ml	3,23 ml	3,75 ml	5 ml	6 ml	6,25 ml
H <sub>2</sub> O (MilliQ)	8,5 ml	8,05 ml	7,8 ml	7,3 ml	6,1 ml	5 ml	4,8 ml
1,5 M Tris/HCl, (oder 1,2 M Tris/HCl, beide pH 8,7)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Vor Überschichten des Trenngels mit Sammelgel wurde das Butanol dekantiert und die Grenzfläche mit Elektrophoresepuffer 3 X gespült und anschließend mit Whatman-Papier getrocknet. Dann wurde der Kamm ins Sammelgel eingeführt und bis zur Polymerisation gewartet.

Nach Entfernung des Kammes (Platzhalter, 18er-Kamm) mussten die Vertiefungen (*slots*) zur Entfernung eventueller Acrylamidreste mittels einer Hamilton-Pipette ausgespült werden. Für die Probenapplikation kam ebenfalls eine Hamilton-Pipette zum Einsatz. Die Optimierung des *Western-Blots* zeigte sich als notwendig, da die verwendeten Mikrosomen in ihren elektrophoretischen wie auch in ihren Transfereigenschaften besondere Anforderungen stellten.

Der Probenvorbereitung kam eine große Bedeutung bei der Durchführung der SDS-PAGE zu. Hierbei ist v.a. auf eine schnelle Verarbeitung der Mikrosomen und eine schnelles Zusammenpipettieren mit 5 X Denaturierungspuffer (Laemmli-Puffer) und H<sub>2</sub>O zu achten. Fehlerquellen sind oft zu kurzes Erwärmen bei RT (die Mikrosomen sind dann zumeist noch präzipitiert) oder auch zu langes Erwärmen (mögliche proteolytische Degradation trotz Vorhandensein von Proteinaseinhibitoren).

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront des Laemmli-Puffers in das Trenngel übertrat (dann Durchführung der Elektrophorese bei 30 mA). Als Stromquelle diente ein *Electrophoresis Power Supply* EPS 3500 der Firma Pharmacia.

Im Rahmen der Versuchsoptimierung und der routinemäßigen Durchführung hatte es sich als nützlich erwiesen, das Gel während der Elektrophorese zu kühlen, da eine Temperaturabhängigkeit hinsichtlich der Stabilität der Mikrosomen vorliegt. Hier haben Temperaturen von 4°C und 16°C gute Ergebnisse erbracht und sind der ungekühlten Elektrophorese eindeutig vorzuziehen.

Um zu gewährleisten, dass die hochmolekulare  $\alpha$ 1-Untereinheit des Kalziumkanals Ca<sub>v</sub>2.3 auch tatsächlich in das Trenngel eindringen, wurde zum einen die Porosität des Trenngels adaptiert, zum anderen die Elektrophorese nach Auslaufen der Bromphenolblaufront noch ½ Stunde weitergeführt.

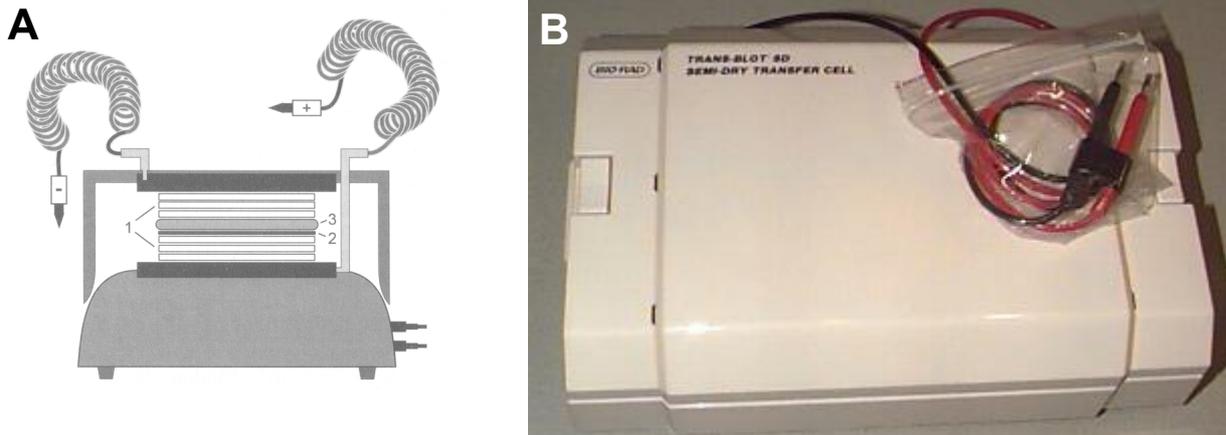
## 2.6.3. Transferverfahren und *Western-Blot*

### 2.6.3.1. *Semi-dry blotting-Verfahren und Membranvorbereitung (membrane wetting protocol)*

Das *semi-dry blotting*-Verfahren stellt eine Elektroelutionsmethode dar, mit der sehr effektiv, d.h. mit relativ geringem Zeit- und auch Arbeitsaufwand, der Transfer von Proteinen auf eine Membran (PVDF, Nitrozellulose etc.) erfolgen kann. Die hier verwendete PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran, Immobilon-P) ist eine mikroporöse Membran, die sich gut für den Nukleinsäure- und Proteintransfer eignet. Anders als bei Nitrozellulose hat sich in unseren Versuchen v.a. die chemische Resistenz, die mechanische Strapazierfähigkeit und die Nichtentflammbarkeit des PVDF bewährt. Da die Membran sehr apolar ist, erlaubt sie eine starke hydrophobe Wechselwirkung mit DNA, RNA und im Besonderen Proteinen. Die repulsiven elektrostatischen Effekte an der Membran sind wesentlich geringer als die hydrophobe Interaktion, die auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (van der Waals-Kräften) und Mini-Dipolen (multifokale fluktuierende Elektronendichteschwankungen in den Molekülorbitalen (sog. London-Kräften) beruht.

Die am häufigsten verwendeten Transfermethoden sind die nach Towbin (Towbin et al., 1979; Towbin and Gordon, 1984) sowie nach Burnette (Burnette, 1981). Wie im Ergebnissteil gezeigt, erfordert die erfolgreiche Detektion im *Western-Blot* die Optimierung einer Vielzahl von Parametern, wie Probenaufbereitung und Probenvorbereitung, Ermittlung der optimalen Temperaturen, Inkubationszeiten, des pH-Wertes und des Puffersystems. Die verwendete PVDF-Membran verlangt eine spezifische Membranvorbehandlung: sie muss zunächst auf die Größe des Gels zugeschnitten werden und wird dann in 100 % Methanol für 15 s inkubiert, für 2 min in ein Wasserbad transferiert und zuletzt für mindestens 5 min (besser 10 – 15 min) in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran ändert im Rahmen des „Wässerns“ ihre Farbe von einem ursprünglich opak-weißlichen Ton hin zu einem einheitlichen durchscheinendem Grau. Allerdings neigt die PVDF-Membran dazu, nach dem „Wässern“ schnell wieder auszutrocknen. Der oben beschriebene Befeuchtungsprozess muss dann wiederholt werden.

Auf Anoden- und Kathodenseite des *blotting-sandwich* (Abb. 2.2) wurden jeweils 3 - 5 Lagen Whatman-Papier, die ebenfalls in Transferpuffer vorinkubiert worden waren, aufgebracht.



**Abb. 2.2: Aufbau einer *semi-dry-blotting*-Apparatur.** A) Schematische Darstellung: 1: Filterpapiere (*Whatman-Papier*), 2: PVDF-Membran, 3: Polyacrylamidgel (Gassen and Schrimpf, 1999). B) Verwendete *Semi-dry* Transfer Apparatur (BioRad).

Wie sich bei der Vielzahl der Versuche zur Optimierung des *Western-Blots* gezeigt hat, sind neben der Probenvorbereitung v.a. die Transferbedingungen von zentraler Bedeutung. Hier spielen v.a. die molekulare Masse und der isoelektrische Punkt eine entscheidende Rolle.

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden, wie oben angeführt, mittels Elektroelution auf die Membran transferiert. Aufgrund der geringen Ionenaktivität des Transferpuffers sind hierfür relativ geringe Ströme notwendig. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass transferierte Proteine die Transfermembran passieren können. In Abhängigkeit von der molekularen Masse und weiteren Faktoren, wie Membranmaterial und der Transferdauer, sind dies durchschnittlich 10 - 50 %.

Wie bereits oben erwähnt, existieren verschiedene Puffersysteme; standardmäßig wurde auch in unseren Experimenten mit Towbins Puffer (ein Tris-Glycin-Puffer) begonnen. Dieser Puffer enthält in seiner Normalzusammensetzung 20 % Methanol, welches die Auflösung des Blots verbessert. Weiterhin fördert Methanol in vielen Fällen die hydrophobe Wechselwirkung, indem es das SDS vom zu detektierenden Protein entfernt. Dies bedeutet aber auch gleichzeitig, dass der Transfer besonders hochmolekularer Proteine eingeschränkt wird. SDS dagegen fördert die Elution gerade hochmolekularer Proteine aus dem Polyacrylamid. So hat sich gezeigt, dass der Transfer von Proteinen > 100.000 Da ohne SDS mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann und Proteine > 150.000 Da in Abwesenheit von SDS sogar präzipitieren können. SDS erhöht zwar die Elektroelution hochmolekularer Proteine, allerdings auf Kosten der Interaktionsstärke mit der PVDF-Membran.

Es muss also zur Optimierung ein Kompromiss gefunden werden zwischen der Methanolkonzentration einerseits und der SDS-Konzentration andererseits. Die besten Ergebnisse wurden mit einer reduzierten Methanolkonzentration von 10 % erzielt. Hinsichtlich des SDS erbrachten Konzentrationen zwischen 0,001 - 0,1 % gute Resultate mit einem Optimum bei 0,01 %. Zuletzt wurde dann nur noch ein modifizierter Standard-Transferpuffer (modifizierter Towbins-Tris-Glycin-Puffer) mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol und 0,01 % SDS verwendet. Stellenweise wird empfohlen, den Transfer durch neutrale Salze zu verbessern, da diese das Entfernen der Hydrathülle um das zu transferierende Protein fördern und damit die hydrophobe Wechselwirkung verstärken. Wir haben davon abgesehen, da sich damit auch die Stromstärke erhöht. Dieses Faktum ist nicht unerheblich, da sich damit auch die Temperatur während des Blottingvorganges erhöht (zusätzlich kann die Kapazität es *Power Supply* erschöpft werden). Während unserer Versuche wurde nicht auf Spannungskonstanz, sondern auf Stromkonstanz Wert gelegt, da sich bei Spannungskonstanz der Stromfluß merklich ändert.

Zu Beginn der Experimente wurde auf ein Prääquilibrieren des Gels in Transferpuffer verzichtet. Das Äquilibrieren hat sich aber als sehr hilfreich erwiesen, da sich sonst während des Transfers die Ionenverhältnisse innerhalb des Blots verschieben (v.a. im Gel). Ionen werden aus dem Gel eluiert und die Stromstärke nimmt zu. Da der Transfer bei konstanter Stromstärke durchgeführt wurde, hätte dies eine Verschlechterung des Transfers nach sich gezogen. Durch das Prääquilibrierungsprozedere verhindert man zusätzlich ein Schrumpfen des Gels, basierend auf dem Methanolgehalt des Transferpuffers, welches eine Verringerung der Porengröße und somit eine Verschlechterung des Transfers zur Folge hätte. Die Stromstärke betrug  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ; bei einem Standardgel (ca. 10 X 10 cm) also etwa 100 mA. Als Mindesttransferdauer wurden 2 h angesetzt.

Wie bereits erwähnt, wurde der *semi-dry blot* bei Raumtemperatur durchgeführt. Vielfach wird auch empfohlen, bei 4°C (z.B. im Kühlraum) zu transferieren. Bei hochmolekularen Proteinen hat das aber keine Vorteile erbracht. Hier war u.a. zu befürchten, dass es zu einer Präzipitation der präparierten Mikrosomen kommen könnte. Mit dem Ende des Transfers musste die Membran und das Gel aus dem *blotting-sandwich* entfernt werden: das Gel wurde zur Kontrolle des Transfers über Nacht in Coomassie-Färbelösung, die proteinbeladene PVDF-Membran über Nacht in Blockierlösung (PBST + 5 % Magermilchpulver) transferiert. Bezüglich des

Blockiervorganges sei folgendes erwähnt: Es hat sich als hilfreich erwiesen, die nicht durch Protein besetzten Areale der Transfermembran durch nicht reaktive Proteine zu blockieren. Hierzu eignen sich BSA, Gelatine, Kasein, Tiereserum oder auch nicht-fette Trockenmilchprodukte. Dadurch wird unspezifische Bindung der nachfolgend applizierten Antikörper weitgehend verhindert.

Wichtig zu erwähnen ist, dass Milchprodukte häufig auch Biotin enthalten (bis zu 0,031 mg/ml), so dass es hierbei mit biotinylierten Nachweiskomponenten zu Wechselwirkungen kommen kann. Es ist prinzipiell auch möglich, die Membran nach dem Transfer luftzutrocknen. Die Membran muss dann zur weiteren Prozessierung wieder in Methanol überführt werden, sodann in Wasser gespült und in Transferpuffer äquilibriert werden.

### **2.6.3.2. Naßtank-Verfahren**

Ein alternatives Vorgehen zum *Semi-Dry*-Verfahren stellt das Nasstankverfahren dar. Hierbei wird das Gel ähnlich dem oben beschriebenen *sandwich*-Verfahren bearbeitet und zwischen zwei Plastikhaltern arretiert. Diese werden in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Transferkammer in vertikaler Position zwischen Anode und Kathode überführt und auf diese Weise die aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran transferiert. Für hochmolekulare porenbildende  $\alpha$ 1-Untereinheiten spannungsgesteuerter Kalziumkanäle hat sich ein Transfer über Nacht bei 4°C als sinnvoll herausgestellt. Da das Nasstankverfahren gerade für den Transfer hochmolekularer Proteine geeignet ist, wurde in diesem Falle auf die Anwendung modifizierter Transferpuffer verzichtet. Es wurde der Standard-Transferpuffer (Towbins-Puffer) mit 20 % Methanol ohne SDS-Zusatz verwendet.

### **2.6.3.3. Proteindetektion mittels Antikörper**

#### **Primärantikörperinkubation**

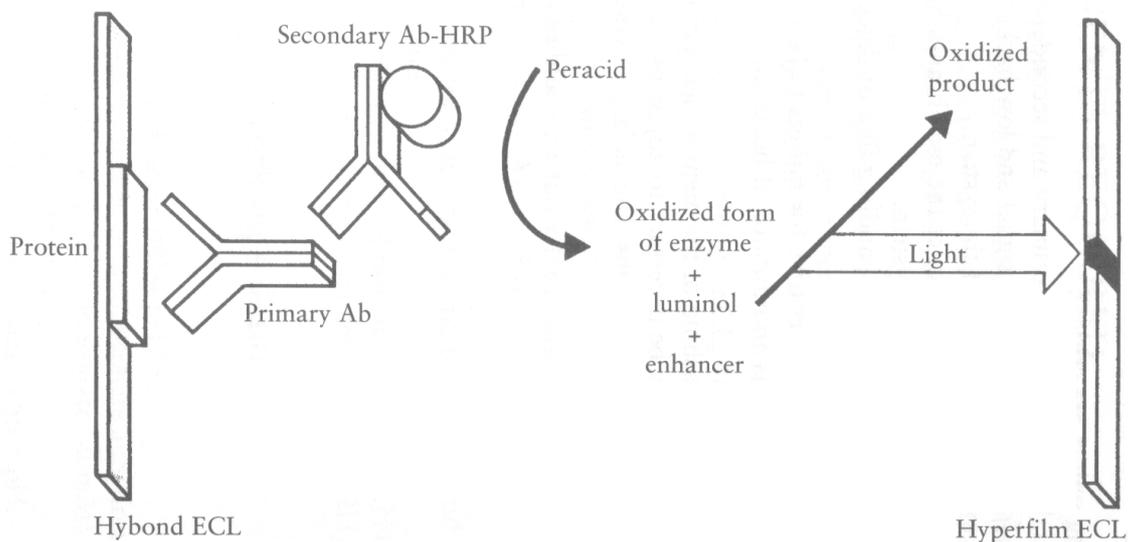
Die verwendeten Antikörper wurden in PBST + 2 % BSA verdünnt (standardmäßig 1 : 500) und zur Prävention bakterieller und mykoider Besiedlung mit 0,01 % Natriumazid versehen. Die Primärantikörperinkubation erfolgte für 2 h bei RT, woran sich drei Waschschriffe mit PBST + 2 % BSA zu je 5 min anschlossen.

## Sekundärantikörper

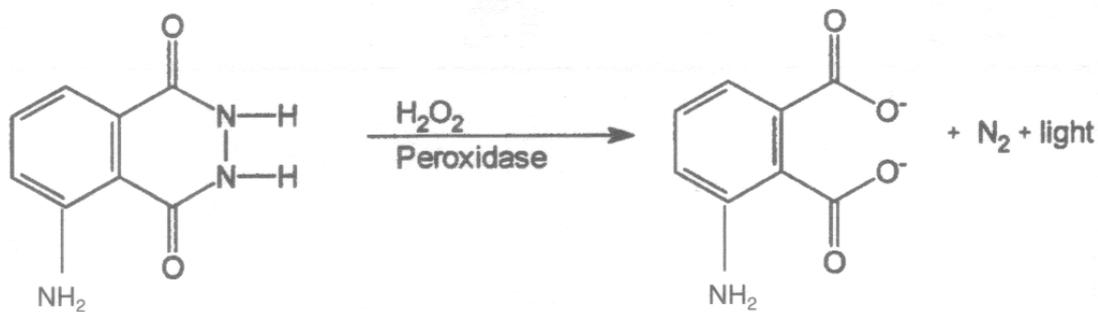
Als Sekundärantikörper diente in unseren Versuchen ein *anti rabbit HRP conjugated antibody* (LIFE SCIENCE, Amersham). Der Sekundärantikörper wurde 1 : 10000 in PBST + 2 % BSA verdünnt und die Membran anschließend 1 h bei RT inkubiert. Daran schlossen sich erneut drei Waschschritte in PBST + 2 % BSA zu je 5 min an.

## ECL-Detektionssystem

Der Nachweis des zu detektierenden Proteins erfolgte unter Zuhilfenahme des ECL-Detektionssystems (Amersham). Beide Detektionsreagenzien wurden im Verhältnis 1 : 1 unter einminütiger sanfter Bewegung gemischt und die Membran darin inkubiert. Die Inkubationszeiten der Membran variierten zwischen 0,5 - 2 min in Abhängigkeit von den aufgetragenen Proteinmengen und den Transferbedingungen. Überschüssiges ECL-Reagenz ließ man abtropfen; die Membranen wurden in Frischhaltefolie verpackt und die ECL-Autoradiographiefilme für unterschiedliche Zeiten (i.d.R. 5, 10 und 30 min) belichtet.



**Abb. 2.3: Prinzip der Immunodetektion nach der ECL-Methode** (Amersham Pharmacia Biotech, 1998).



**Abb. 2.4: Oxidation des Luminols unter alkalischen Bedingungen** (Amersham Pharmacia Biotech, 1998).

### Proteinvisualisation

Generell gibt es eine Reihe von Möglichkeiten zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine und Überprüfung der Effizienz des Proteintransfers auf die PVDF-Membran. Diese bedienen sich der Färbemethoden mittels Coomassie-Brillant-Blue-Färbung sowie Ponceau-S Red-Färbung.

Der Coomassie-Farbstoff bindet unspezifisch an die im Gel vorhandenen Proteine, wobei die Nachweisgrenze bei 0,1 µg liegt (Stryer, 1990). Hierfür wird das Gel nach dem Proteintransfer für 20 min in 100 ml Coomassie-Lösung inkubiert. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele sodann mit Entfärbelösung behandelt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, das transferierte Protein auf der PVDF-Membran direkt mittels Ponceau-S-Färbung nachzuweisen. Sie wurde im Rahmen der Versuchsoptimierung v.a. durchgeführt, um eine mangelnde Elektroelution und damit einen insuffizienten Transfer auf die PVDF-Membran aufzudecken. Zum Proteinnachweis wurde die Membran 10 min in 100 ml 1 X Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und die Membran nach Abtropfen des überschüssigen Farbstoffes dreimal für jeweils 5 min mit 5 % Essigsäure gewaschen, wobei sich Proteine als rote Banden darstellen. Die Ponceau-Färbung in der dargestellten Form hat eine Nachweisgrenze von 1 - 2 µg Protein.

## **Wiederverwertung einmal getesteter Membranen**

Ziel dieses Vorgehens ist es, sowohl den Primär- als auch den Sekundärantikörper von der PVDF-Membran zu entfernen, und auf derselben anschließend ein weiteres Protein oder dasselbe Protein mit einem gegen ein anderes Epitop gerichteten Antikörper zu detektieren. Theoretisch kann dieses Verfahren mehrfach wiederholt werden. Zwischen den verschiedenen Detektionsschritten können die Membranen feucht in Frischhaltefolie bei 2 - 8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Membran wurde zunächst unter gelegentlichem Schütteln in Ablösepuffer bei 50°C für 30 min inkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschschriffe für jeweils 10 Minuten in PBST bei RT an. Hierbei sollten möglichst große Mengen Waschlösung verwendet werden, um das Mercaptoethanol vollständig zu entfernen. Ab hier wird nach Standardprotokoll verfahren und im folgenden Schritt die Blockierlösung eingesetzt (s.o.).

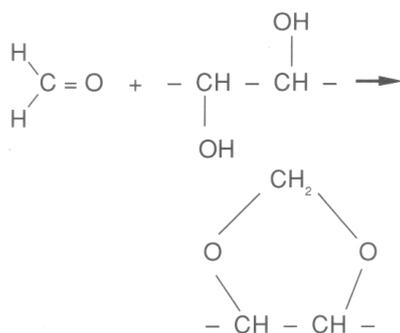
## **2.6.4. Histochemie**

### **2.6.4.1. Fixation**

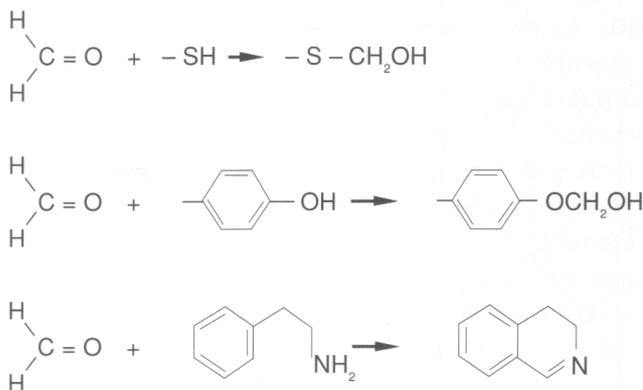
Ziel der Fixation ist es, das Gewebe vor postmortal einsetzenden Degradations- und Autolyseprozessen zu schützen. Grundlegendes Prinzip ist hierbei der durch das Fixationsreagenz induzierte Denaturierungsvorgang von Proteinen jeglicher Art, v.a. Enzymen. Die Denaturierung von Enzymen und damit verbunden deren Deaktivierung schränken zum einen die Degradationsprozesse ein, zum anderen bewirkt die Denaturierung der übrigen Zellproteine deren relative Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau. Die Fixation hat darüberhinaus einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Gewebsintegrität.

Es existiert eine Vielzahl von verschiedenen Fixationsreagenzien, die spezifische Vor- und Nachteile haben. Das am häufigsten verwendete Fixationsreagenz stellt die wässrige Formaldehydlösung dar. Typische Konzentrationen sind 4 % und 10 %. Das Fixationsprinzip des Formaldehyd beruht auf der Quervernetzung innerhalb des betreffenden Proteins, vermittelt v.a. durch die Aldehydgruppe des Formaldehyds mit z.B. Aminogruppen-haltigen Aminosäuren des betreffenden Proteins. An dieser Stelle sei kurz auf typische Artefakte des Formaldehyds bei der Fixation hingewiesen. Zu beachten ist, dass gerade bestimmte Gewebe zu einer nicht

unwesentlichen Schrumpfung tendieren: hier ist vor allem der Hoden (Testes) oder auch die Nebenniere und hier vor allem das Nebennierenmark (NNM) zu nennen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die wässrige Lösung von Formaldehyd als Fixationsreagenz verschiedene intrazellulär gespeicherte Substanzen aus den Zellen herauslösen kann, u.a. auch Glykogen. Mit zunehmendem Eindringen des Fixationsreagenzes in das Gewebe kommt es zur sogenannten Substanzflucht (z.B. des Glykogens), so dass die ursprünglich an diesen Stellen lokalisierten intrazellulären Speicher wabenartige, vakuoläre Strukturen hinterlassen.

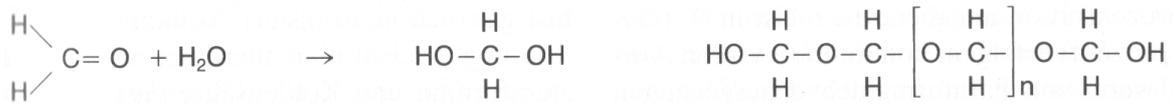


**Abb. 2.5: Reaktionen des Formaldehyds, die bei der Quervernetzung der Proteine (Denaturierung, Fixation) von Bedeutung sind (Romeis, 1989).**



In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebe mit 4 % Formaldehyd inkubiert. Die Konzentration des handelsüblich erhältlichen Formalins beträgt 35 - 37 %. Die exakte Konzentration ist prinzipiell nicht sicher anzugeben, da die wässrige Lösung von Formaldehyd aus verschiedenen Gründen nicht stabil ist: zum einen kann es zu einer meist photochemischen Oxidation des Formaldehyds zu Ameisensäure kommen; weiterhin kann es, ebenfalls photochemisch induziert, zu Polymerisationsprozessen

mit der Folge des Ausfallens von Paraformaldehyd kommen, das sich als weißer Niederschlag am Gefäßboden absetzt.



**Abb. 2.6: Polymerisationsprozess von Formaldehyd zu Paraformaldehyd** (Romeis, 1989).

Aus diesem Grunde wurde für die Erstellung der 4 %igen Fixationslösung auf Paraformaldehyd zurückgegriffen, das mittels konzentrierter Natriumhydroxidlösung hydrolysiert wurde. Der entscheidende Vorteil ist, dass man, frisch angesetzt, auch tatsächlich von einer 4 %ige Formaldehydlösung ausgehen kann. Die tropfenweise NaOH-Zugabe erfolgt solange, bis sich die Paraformaldehydsuspension gerade aufklärt.

Neben der Konzentration des Fixationsreagenzes ist als zweiter Faktor die Fixationsdauer von Bedeutung. Die nötige Fixationsdauer ist generell von der Dicke des Gewebesblockes abhängig. Die Diffusionsgeschwindigkeit (s. Ficksches Diffusionsgesetz) hängt zum einen von der Konzentration des Fixationreagenzes und damit dem Konzentrationsgradienten ab, zum anderen aber auch von der Temperatur und den spezifischen Eigenschaften des Gewebes. Die verwendeten quaderförmigen Gewebesblöckchen hatten i.d.R. eine Kantenlänge von 5 mm. Die Fixation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Höherer Temperaturen bewirken zwar nach dem Fickschen Diffusionsgesetz ein schnelleres Eindringen des Formaldehyds in das Gewebe, dies steht aber in keiner Relation zu den negativen Auswirkungen auf die Gewebsintegrität.

Andere Fixationsreagenzien wie z.B. Glutaraldehyd, B-5 oder Schwermetall-Fixationsreagenzien (Hollande's Fixationsreagenz oder Zink-Formalin) kamen nicht zum Einsatz. Sie bewirken, wie im Falle des Glutaraldehyds, eine z.T. massive Antigenmaskierung, die mit *antigen-retrieval*-Verfahren nur schwer kompensierbar sind. Zusammenfassend ist hinsichtlich des Fixationsprozesses folgendes zu beachten:

- Die Formalinfixation (4 %) stellt das Standardverfahren dar.
- Eine überlange Fixation sollte vermieden werden (manche Autoren sehen bereits

eine Fixation von mehr als 24 h als Überfixation an); auf jeden Fall sollte eine Fixation über das Wochenende oder noch länger vermieden werden.

- Das Ausmaß der Quervernetzung (*molecular cross-linkage*) korreliert mit der Fixationsdauer und Konzentration des Fixationsreagenzes (Antigen-(Epitop)-Maskierung)

#### **2.6.4.2. Einbettung**

Prinzip des Einbettungsprozesses in der Histochemie ist es, den weichen Gewebblock nach der Fixation in einen Zustand zu überführen, in dem es möglich wird, ihn mittels Mikrotom zu schneiden. Dabei wird das Gewebe aus dem ursprünglich wässrigen Millieu in ein lipophiles Millieu überführt, um es dann in Paraffin einzubetten.

Das Einbettungsprozedere fand im Institut für Anatomie sowie im Institut für Biochemie der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln statt und wurde in einem Autotechnicon durchgeführt, in dem die Gewebeproben automatisch verschiedenen Inkubationslösungen zugeführt wurden. Es handelt sich hierbei um einen Einbettautomaten vom Tauchprinzip im Gegensatz zum sog. Einkammersystem, bei welchem stets die Flüssigkeiten ausgetauscht werden. Die Gewebsblöckchen passieren die verschiedenen Lösungen (bei definierten Konzentrationen, Zeiten und Temperaturen (s.u.)) dabei in speziellen Plastikkassetten (Eurokassette von Reichert-Jung). Bäder und Inkubationszeiten stellten sich wie folgt dar:

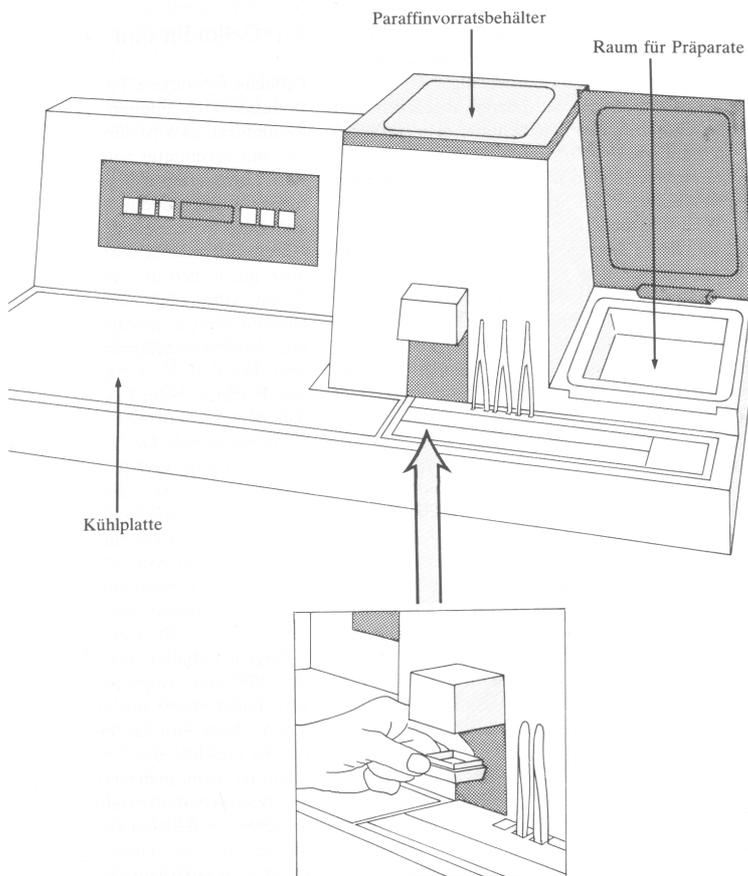
<b>Inkubationsbad</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Temperatur</b>
1. Ethanol 80 %	1 h	35°C
2. Ethanol 80 %	1,5 h	35°C
3. Ethanol 96 %	1 h	35°C
4. Ethanol 100 %	1 h	35°C
5. Ethanol 100 %	1 h	35°C
6. Ethanol 100 %	2 h	35°C
7. Histosol	1 h	35°C
8. Histosol	1 h	35°C
9. Histosol	1,5 h	35°C

10. Paraffin	1,5 h	62°C
11. Paraffin	1,5 h	62°C

Da die verwendeten Organe (Mausherzen) entweder bereits a priori von geringer Größe waren bzw. zuvor in kleinere Gewebsblöckchen zerlegt worden waren, erfolgte das sog. Ausgießen in Formen mit passenden Spannrähmchen. Als Spannrähmchen fungierten hierbei die Kassettenböden der standardmäßig verwendeten Eurokassette von Reichert-Jung.

Die Gießform aus Stahlblech hat die Form eines Pyramidenstumpfes, wobei die apikale Fläche des Pyramidenstumpfes später als Anschnittfläche dient. Das nach dem Ausgießen mit Paraffin aufgesetzte Spannrähmchen dient der späteren Arretierung am Mikrotom.

Für den hier beschriebenen Ausgießvorgang wurde ein spezieller Arbeitsplatz zum Ausgießen verwendet, mit Kühlplatte, Paraffinvorratsbehälter (Paraffinspender) und Präparateraum. Die mit dem Gewebsblock gefüllten Formen wurden sofort auf die Kühlplatte transferiert. Lässt man die Formen bei Raumtemperatur langsam abkühlen, droht die Ausbildung von „Paraffinkristallen“ und schollenartigen Paraffinstrukturen, die nicht nur die Schnittqualität am Mikrotom negativ beeinflussen, sondern auch die histologische und zytologische Integrität des Gewebes beeinträchtigen.



**Abb. 2.7: Ausgießvorrichtung mit Paraffinvorratsbehälter, Kühlplatte und Präparaterraum (Romeis, 1989).**

Einen nicht unwesentlichen Einfluß auf die Praktikabilität des Verfahrens hat auch die Haftung der Paraffinschnitte auf den verwendeten Objektträgern. Da die Schnitte einer Vielzahl von Waschschrritten unterzogen werden, ist ein starkes Haften auf dem Objektträger notwendig. Hierzu stehen generell verschiedene Objektträger-Beschichtungs-(*Coating*)-Verfahren zur Verfügung, z.B. mit „Elmers glue“, „Chrom alum“, „poly-L-Lysin“ oder auch Eiweiß-Glycerin.

Alle erstellten Schnitte wurden im Folgenden auf kommerziell erhältliche silanisierte Objektträger aufgezogen, die alle gestellten Anforderungen erfüllten. Nach dem „Aufziehen“ der Schnitte wurden diese allerdings zunächst über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet (generell sollte eine Temperatur von 60°C nicht überschritten werden, um das Antigen nicht zu schädigen; die Zeitangaben schwanken zwischen wenigen Minuten und einigen Stunden). Ungenügend fixierte Gewebe zeigen unabhängig von der verwendeten Adhäsionsmethode eine nur schlechte Bindung an die Objektträger.

#### **2.6.4.3. Deparaffinierung und Rehydratisierung**

Um die Schnitte histochemisch weiter zu bearbeiten, ist es notwendig, sie wieder ins wässrige Millieu zu überführen. Dazu ist es zunächst erforderlich, das Paraffin zu entfernen, was standardmäßig mit Xylol erfolgte. Die Schnitte wurden dreimal 10 Minuten in hintereinander positionierten Xylol-Bädern deparaffiniert. In der Literatur finden sich oft wesentlich kürzere Zeitangaben; da Paraffinreste auf dem Schnitt aber zu Hintergrundfärbung führen können, wurden sicherheitshalber längere Zeiten gewählt. Über eine negative Wirkung verlängerter Xylolinkubation gibt es keine gesicherten Studien. Es existieren allerdings wenige Berichte, dass zur Deparaffinierung verwendetes Xylol spezifische Antigene schädigen kann.

Um das lipophile Xylol aus den Schnitten zu entfernen, wurden diese in die sog. absteigende Alkoholreihe überführt. Waschschritte mit 2 X 100 % Ethanol, 2 X 96 % Ethanol und zuletzt 70 % Ethanol für je 2 min folgten, bevor die Schnitte dann in PBS überführt wurden.

#### **2.6.4.4. Trichromfärbung nach Masson**

Eine Reihe von Trichromfärbungen sind bekannt, deren Ziel nicht nur die Darstellung von Kollagenfibrillen ist, sondern auch die Differenzierung gegenüber Epithelzellen und Muskelgewebe. Eine detaillierte Vorstellung über den Färbemechanismus gibt es nicht. Fast alle verwendeten Farbstoffe sind negativ geladen und ihre Bindung ist primär elektrostatischer Natur, wobei den Differenzierungsschritten hinsichtlich der Qualität der Färbung die entscheidende Rolle zukommt. Von den verschiedenen bekannten Trichromverfahren nach Heidenhain (1915), Wallert und Houette (1930), Mallory (1936), Goldner (1938) und Cason (1950) wird die Methode nach Masson (1929) aus Gründen der Qualität und Praktikabilität vorgezogen (Romeis, 1989). Das unten beschriebene Färbeprotokoll stellt eine Modifikation des ursprünglich von Masson beschriebenen Verfahrens dar.

### **Reagenzien**

Säurefuchsin: für die Mikroskopie, Art. T128.1, C.I. 42685, 10 g, Carl Roth GmbH&Co (GER)

Orange G: für die Mikroskopie, Art 6878, 50 g, Merck (Darmstadt, GER)

Ponceau: S, P-3504, 10 g, Sigma (München, GER)

**Ponceau-Säurefuchsin-Stammlösung:**

1 Teil Ponceau de Xylidine: 0,1 g / 10 ml H<sub>2</sub>O dest. + 0,1 ml Essigsäure

3 Teile Säurefuchsin: 0,3 g / 10 ml H<sub>2</sub>O dest. + 0,3 ml Essigsäure

**Azophloxin-Stammlösung:**

0,05 g / 10 ml H<sub>2</sub>O dest. + 0,02 ml Essigsäure

**Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Färbeansatz:**

30 ml Ponceau-Säurefuchsin + 6 ml Azophloxinlösung + 264 ml 0,2 % Essigsäure

**Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung:**

12 g Phosphormolybdänsäure / 300 ml H<sub>2</sub>O dest. + 6 g Orange G

**Anilinblaulösung (gesättigt):**

2 g auf 100 ml / H<sub>2</sub>O dest. + 2,5 ml Essigsäure

**Färbeprozedere**

Der Vorteil der Trichromfärbung nach Masson besteht darin, dass nicht nur das Bindegewebe kontrastreich dargestellt wird, sondern auch das Zytoplasma, das sich durch seine scharfe Rotfärbung von der Kernfärbung deutlich abhebt. Zunächst wurde mit einer Weigertschen Eisenhämatoxylin-Färbung begonnen (7 min) und die Schnitte anschließend kurz in saurem Ethanol gewaschen. Unter fließendem lauwarmem Wasser (10 min) erfolgte sodann die Differenzierung der Eisenhämatoxylinfärbung. Da die Färbezeit nur kurz ist, werden auch hierbei nur Zellkerne angefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für ½ h bei RT in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxinlösung inkubiert und anschließend mit 1 % Essigsäure gewaschen. Hieran schloss sich ein weiterer Differenzierungsschritt in Phosphormolybdänsäure-Orange G, bevor mit einer gesättigten Anilinblaulösung für 5 min gegengefärbt wurde. Nach erneutem Waschen in 1 % Essigsäure erfolgte die Überführung in H<sub>2</sub>O und die aufsteigende Alkoholreihe, bevor die Schnitte nach Passage des Xylolbades eingedeckt wurden. Nach erfolgreicher Färbung

präsentieren sich die Kerne bräunlich-rot, das Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orange-gelb und Bindegewebe blau.

#### **2.6.4.5. Eindecken (Dehydratisierung und Klärung)**

Die gefärbten Schnitte wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und in Xylol transferiert, bevor die nicht-wässrige Eindeckung erfolgte. Eine wässrige Eindeckung bietet sich aufgrund der mangelnden Langzeitstabilität nicht an.

## 2.7. Voltage-Clamp-Verfahren

### 2.7.1. Materialien für Patch-Clamp-Experimente

Zeiss Axiovert S100, Zeiss (Göttingen, GER)

Hydraulischer Mikromanipulator, Narishige (Japan, NY, USA)

EPC9-Verstärker, HEKA, Lambrecht (Pfalz, GER)

Falcon *Bottle Top Filter*, Benton Dickinson Labware, Franklin Lakes (NJ, USA)

Mikrofil 34 AWG-5-Pack, *World Precision Instruments Inc.* (WPI), 175 Sarasota Center Boulevard, Sarasota (FL, USA)

Kwik-Fil TM: *Borosilicate Glass Capillaries*, 1B150F-4, LotNr. 0610322, *World Precision Instruments Inc.* (WPI), Sarasota Center Boulevard, Sarasota (FL, USA)

Glass 1BBL W/Fil 2,0 mm; 4IN, No.1B200F-4, *World Precision Instruments Inc.* (WPI), 175 Sarasota Center Boulevard, Sarasota (FL, USA)

Rund-Deckgläschen 100, Stärke Nr.1; 12 mm Durchmesser, 100 Stück, Laboratory Glassware (Marienfeld, GER)

AcrodiscR *Syringe Filter*: 0,2 µm, Supor R Membrane nicht-pyrogen, steril, PALL Gelman Laboratori

Silberdraht, 0,25 mm, 99,9 %, No. 11212, Aldrich-Chem. Co., P.O. Box 355, Wi 53201, Sigma (München, Germany)

*Manifold Model MP-6* (Verteilersystem), *Warner Instruments Corp.* (Hamden, USA)

*Polyethylene Tubing*-Cat.No. PE160/10 (1,57 mm OD X 1,14 mm ID), *Warner Instruments Corp.* (Hamden, USA)

Perfusionskontrolle, steril, Infusionsgerät Air G mit Präzisions-Tropfenregler Luer-Lock, No./REF 744103, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co. (Nümbrecht, GER)

Steriflip: 50 ml *disposable vacuum filtration system with 0,22  $\mu$ m Millipore Express Membrane*, Cat.No. SCGP00525, Millipore, Millipore Corporation Bedford (Massachusetts 01730, USA)

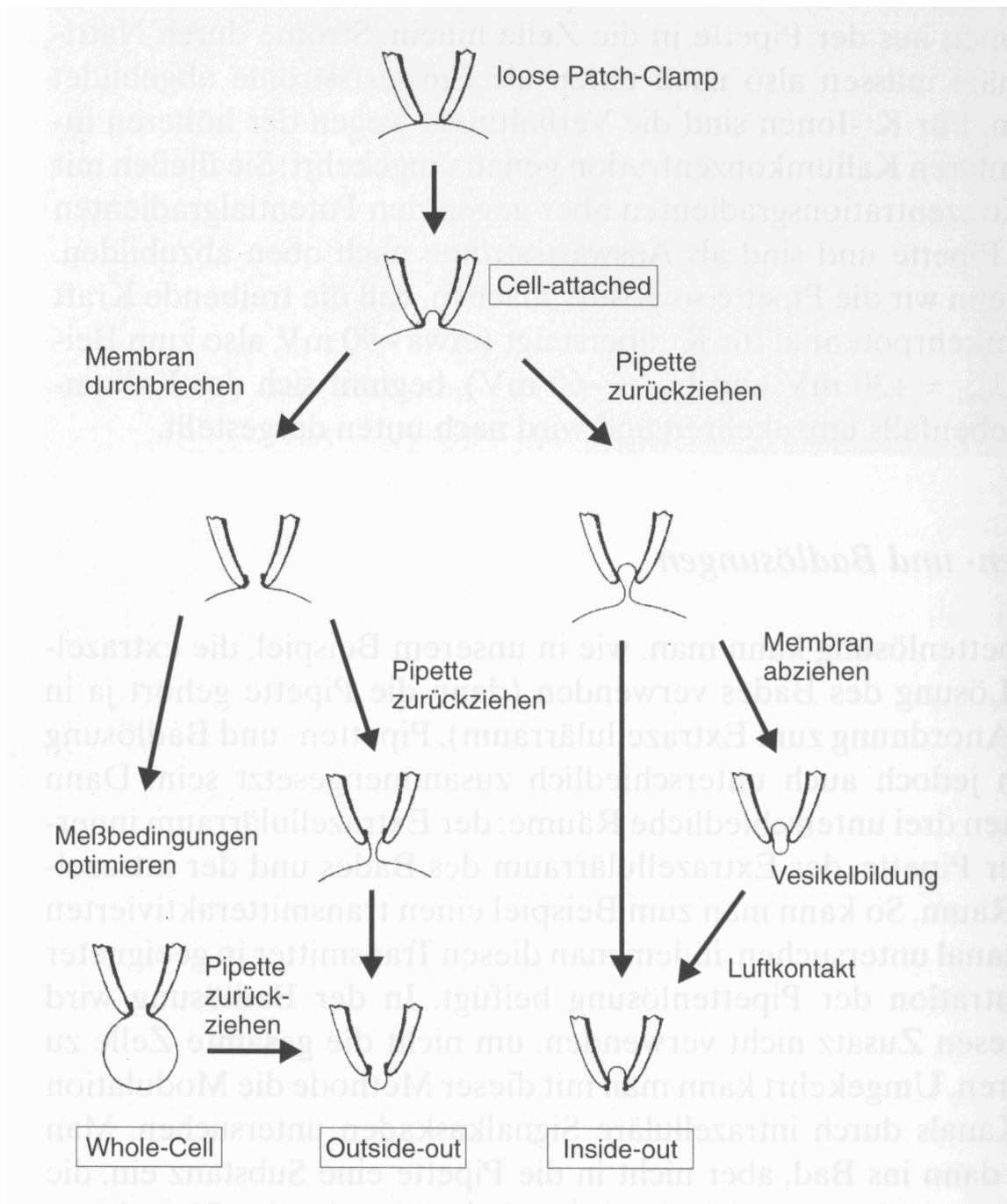
MicroFil 67 mm Tip; 0,164 mm OD (MF34G-5), *World Precision Instruments* (Berlin, GER)

Adenosin-5'-Triphosphat, Magnesiumsalz, Sigma (München, GER)

### **2.7.2. Patch-Clamp-Verfahren - Grundlagen**

Die hier vorgestellten elektrophysiologischen Experimente sind mit Hilfe der *patch-clamp* Technik (Membranfleck-Klemme) durchgeführt worden. Das grundlegende Prinzip dieses Verfahrens besteht in dem Aufsetzen einer sich zur Spitze hin verjüngenden Glaspipette auf die Zellmembran unter mikroskopischer Sicht. Die Applikation eines leichten Unterdrucks kann sodann unter günstigen Bedingungen zur Ausbildung eines Abdichtwiderstandes führen, der im Gigaohmbereich liegt - man spricht dann auch von einem sog. *gigaseal* und befindet sich nun im sog. *cell-attached*-Modus. Ist der Membranfleck intakt, ergibt sich die Möglichkeit zur Einzelkanalmessung. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Abdichtwiderstand, der umgekehrt proportional zum Leckstrom ist. Bei einem ungenügenden Abdichtwiderstand kann der Leckstrom u.U. so groß werden, dass eine effiziente Spannungsklemme nicht mehr möglich ist. Ausgehend von dieser Situation sind eine Reihe verschiedener *patch-clamp*-Konfigurationen entwickelt worden (Abb. 2.8).

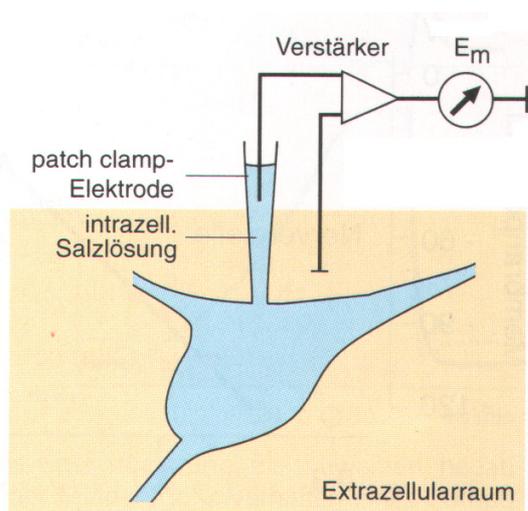
Wichtig hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang der Ganzzell-Modus (*whole cell recording, WCR*) und die zellfreie Membranklemme (*cell-free patches*). Die im Rahmen dieser Arbeit dargelegten Versuche wurden im Ganzzell-Modus durchgeführt. Hierbei wird nach Etablierung eines *gigaseal* durch Applikation eines Unterdrucks der Membranfleck rupturiert, womit man einen direkten leitenden Zugang zum Zellinnern hat.



**Abb. 2.8: Verschiedene Meßkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik.** Die Patch-Clamp-Technik stellt eine vielseitige Methode zur Untersuchung von Kanalaktivitäten dar. Zwischen der Pipette und einem kleinen Stück festgesaugter Membran entsteht eine Gigaohmversiegelung: es liegt der sog. *cell-attached*-Modus vor. Durch eine Erhöhung des Unterdrucks rupturiert der Membranfleck und es entsteht eine leitende Verbindung mit geringem elektrischem Widerstand zwischen Pipette und Zellinnerem. Man spricht auch vom Gesamt-Zell-Verfahren (*whole cell mode, WCM*). Damit wird die Ionenkanalaktivität der gesamten Zellmembran der Messung zugänglich. Auf den sog. *excised-patch*-Modus (*inside-out*-Modus) sowie die *outside-out* Konfiguration wurde bereits im Text näher eingegangen (Numberger and Draguhn, 1996).

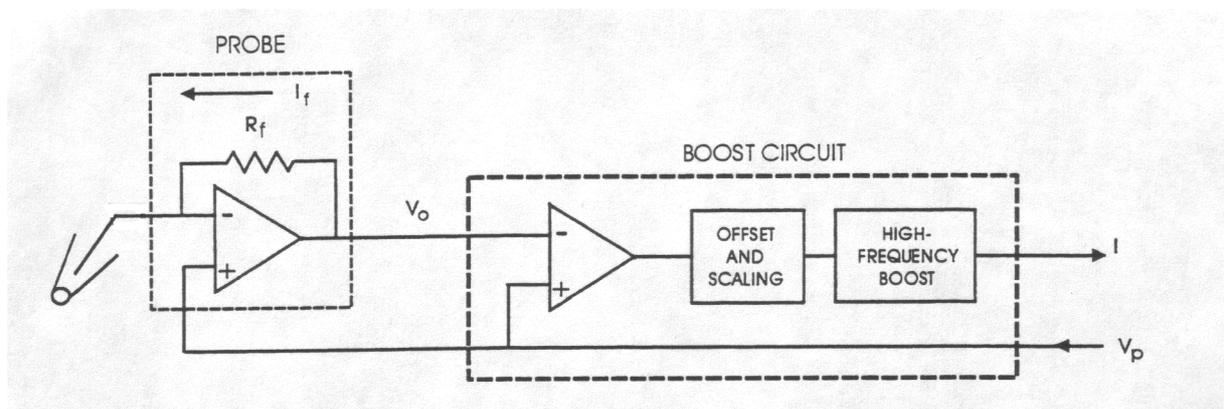
Bei den *cell-free patch*-Methoden wird die Pipette nach Formierung des *gigaseal* zurückgezogen - geschieht dies abrupt, wird der Membranfleck mit der Pipette aus der Zellmembran herausgerissen, so dass das Innere des Membranflecks Kontakt zur Badlösung bekommt. Man spricht von der *inside-out*-Konfiguration. Ein langsames Zurückziehen der Pipette führt dagegen zur Ausbildung eines dünnen Zytoplasmaschlauches, der beim Abreißen zur Verschmelzung der Zellmembran führt. In dieser *outside-out*-Konfiguration hat die Aussenseite der Membran Kontakt zur Badseite (Hille, 1992; Sakmann and Neher, 1995; Aidley, 1998).

Das *patch-clamp*-Verfahren in all seinen Konfigurationen basiert auf den Prinzipien der sog. Spannungsklemme (*voltage-clamp*), wie es in den 50er Jahren von Hodgkin und Huxley beschrieben worden ist. Prinzip ist hierbei die externe Kontrolle der Potentialdifferenz über der Membran und gleichzeitige Messung des dazu notwendigen Ionenstroms. Natürlich ist auch der umgekehrte Ansatz möglich: So wird beim *current clamp*-Verfahren der Ionenstrom kontrolliert (abhängig vom Protokoll) und die dabei auftretenden Spannungsänderungen erfasst. Die zu erwartenden Ströme sind i.d.R. sehr klein und liegen im Picoampère (pA)-Bereich, wobei es hier in Abhängigkeit vom Untersuchungsobjekt große Unterschiede geben kann. Synaptische Ströme können Werte im Bereich von 50 - 100 pA aufweisen; die in den hier vorgestellten Versuchen an stabil transfizierten HEK-293-Zellen gemessenen Kalziumströme können hingegen auch Werte von bis zu 1000 pA annehmen. Dennoch ist die Verwendung eines leistungsstarken elektrischen Verstärkers (EPC9, HEKA) notwendig, sowie eines Analog / Digital-Wandlers.



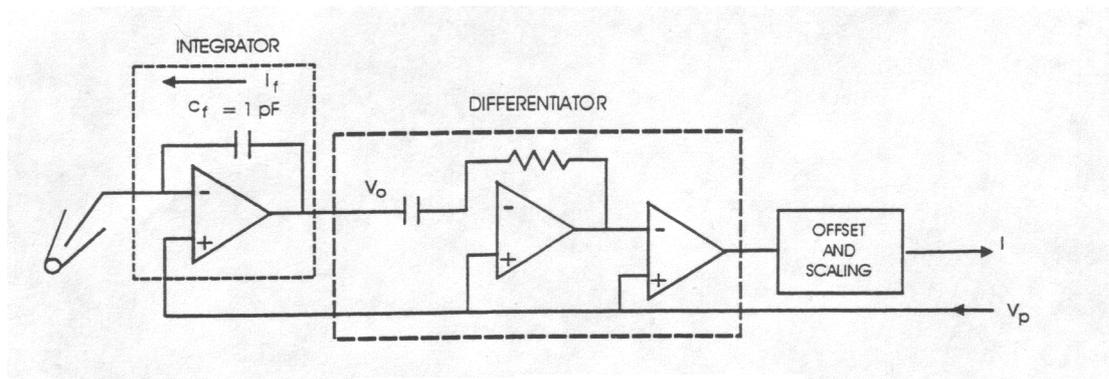
**Abb. 2.9: Prinzip der Membranfleck (*patch-clamp*)-Technik.** Eine *patch-clamp*-Elektrode wird auf die Zellmembran aufgesetzt, so dass eine Gigaohmversiegelung entsteht. Die Pipette ist mit Innenlösung (s. elektrophysiologische Materialien) gefüllt. Nach Ruptur des Membranflecks werden die gemessenen Signale über einen Meßverstärker amplifiziert (Dudel, Menzel, Schmidt, 1996).

Bereits der Elektrodenhalter (Vorverstärker), die sog. *headstage*, führt einen Amplifikationsprozess durch, der im Folgenden an einem elektrischem Schaltdiagramm kurz erläutert werden soll (Abb. 2.10). Unter den Bedingungen der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) folgt die Potentialdifferenz dem externen Kommando. Aufgabe des sog. *operational amplifiers* im Pipettenhalter ist es, die vorgegebene Spannung ( $V_p$ ) und gemessene Spannung über seine beiden Zugänge zu vergleichen. Die Spannung über  $R_f$  ist damit  $V_o - V_p$ , und wird vom sog. *differential amplifier* ermittelt. Der zur Aufrechterhaltung der Spannung notwendige Strom fließt über ein Rückkopplungselement (Widerstand) in die Zelle zurück bzw. wird aufgezeichnet. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem Widerstands-Rückkopplungsprinzip bzw. von einer *resistive headstage*.



**Abb. 2.10: Schaltprinzip einer *headstage* nach dem Widerstands-Rückkopplungsprinzip** (Axon Instruments Inc.).

Eine andere Möglichkeit ist das Kondensator-Rückkopplungsprinzip, wie es häufig für Einzelkanalmessungen verwendet wird (*capacitive headstage*), weil hier der Störstrom wesentlich geringer ist. Nachteilig ist hingegen, dass die Kapazität des Kondensators begrenzt ist; damit kann ein *Resetting* der Verstärkerkomponenten in Abständen nötig werden.



**Abb. 2.11: Schaltprinzip einer *headstage* nach dem Kondensator-Rückkopplungsprinzip (Axon Instruments Inc.).**

### 2.7.3. Elektrophysiologische Materialien

Ca<sub>v</sub>2.3 stabil-transfizierte HEK-293-Zellen wurden vor Durchführung einer jeder Messung passagiert. Zu diesem Zweck erfolgte eine Dissoziation der Zellen durch Verdau mit 0,25 % Trypsin (+ 1 mM EDTA) für ca. 2 Minuten und eine 20-fache Verdünnung mit DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

Die für die Messung bestimmten Zellen wurden noch einmal 1 : 2 verdünnt und dann in Kulturschalen mit durchschnittlich drei Deckgläschen transferiert. Hieran schloss sich eine mindestens vierstündige, maximal zweitägige Inkubation vor Durchführung der elektrophysiologischen Messungen an.

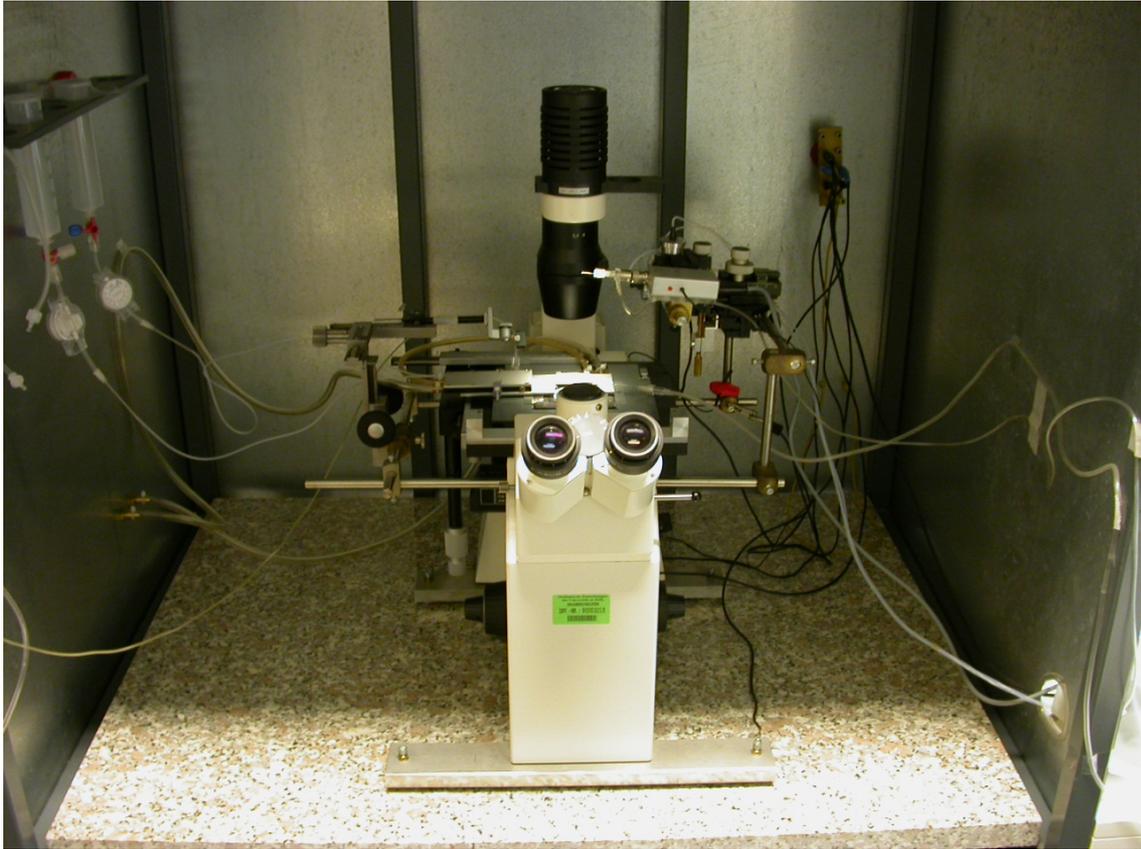
### 2.7.4. Patch-Pipetten

Für die Herstellung der Pipetten wurde ein sog. horizontales Pipettenziehgerät (Sutter Instrument Co., Navato, CA; Model P-97, *Flaming-Brown Pipette Puller*) verwendet. Als Glasröhrchen dienten entweder TW 150-6-Kapillaren (*World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL.*) oder Borosilikat-Glaskapillaren (1B150F-4 und Borosilikat Glaskapillaren 1BBL W/Fil 2.0 mm (OD/ID: 2,0 / 1,12), *World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL.*). Der Pipettenwiderstand betrug nach Füllung mit Pipettenlösung (Innenlösung) 2,7 - 6,7 MΩ. Der Leckstrom war nur minimal, weswegen eine sog. Leckstrom-Subtraktion (*leak subtraction*) nicht durchgeführt wurde. Die Innenlösung setzte sich wie folgt zusammen: 130 mM CsCl, 5 mM Oxalacetat, 5 mM Kreatin, 5 mM Pyruvat, 20 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,35 (einstellen mit CsOH), Osmolalität: 272 mosmol/kg. Die Badlösung (Aussenlösung) enthielt: 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 160 mM N-methyl-D-glucamin, 10 mM HEPES,

5 mM KCl, pH 7,35 (einstellen mit HCl), Osmolalität: 303 mosmol/kg. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

### **2.7.5. Elektrophysiologischer Messtand und Versuchsablauf**

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Patch-Clamp*-Experimente wurden  $Ca_v2.3$  stabil-transfizierte HEK (*human embryonic kidney*)-293 Zellen verwendet. Die Aufzeichnungen unter Spannungsklemme (*voltage-clamp*) erfolgten unter Ganzzellbedingungen (*whole cell mode*, WCR), bei dem der Zugang zur Zelle über die bereits oben erwähnte Unterdruck-vermittelte Membranfleckruptur (*ruptured patch*-Methode) erfolgt. Die elektrophysiologischen Untersuchungen an HEK-293 Zellen erfolgten bei einem Haltepotential von -50 mV unter Zuhilfenahme des EPC9 *Patch-Clamp*-Verstärkers (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Die Potentialdifferenz zwischen der Pipettenlösung (Innenlösung) und der Badlösung (Aussenlösung) wurde vor Erlangen des *cell-attached* Modus auf 0 mV abgeglichen. Die Membrankapazität der untersuchten Zellen schwankte zwischen 14,15 und 67,28 pF. Die Durchführung der elektrophysiologischen Experimente erfolgte bei Raumtemperatur (22 - 24°C). Die verwendeten HEK-293 Zellen wurden einen Tag vor der beabsichtigten Messung auf 12 mm Runddeckgläschen ausgebracht. Die Superfusion der transfizierten HEK-293-Zellen mittels unterschiedlicher Pharmaka erfolgte gravitationsgesteuert unter Zwischenschaltung eines Perfusionskontrollsystems (Sarstedt, Nürnberg, Germany).



**Abb. 2.12: Elektrophysiologischer Messtand und seine Komponenten.**

Elektrophysiologischer Messtand am Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln. Zentral befindet sich der Faraday-Käfig mit inversem Mikroskop (Zeiss, Axiovert S100), dem Pipettenhalter (HEKA-headstage (*probe*), HEKA, Germany), Mikromanipulator (Narishige, hydraulisch) und Perfusionssystem (50 ml Spritzen zur Superfusion der kultivierten und stabil-transfizierten HEK-293-Zellen (links)). In das Perfusionssystem sind weiterhin Perfusionskontrollen zwischengeschaltet (Sarstedt, Germany). Deutlich ist die Inkubationskammer zu sehen, die zusätzlich über einen Thermostaten temperiert werden kann. Weiterhin ist die *grounding electrode* sichtbar, die in die Badlösung eintaucht; alle anderen Komponenten, die Hintergrundrauschen induzieren könnten, sind geerdet. Um eine lokale Perfusion "gepatchter" Zellen zu ermöglichen, besteht über einen separaten zweiten Arm die Möglichkeit, über eine ausgezogene Glaspipette mittels eines elektrischen Perfusors Superfusionslösung direkt auf die Zielzelle zu applizieren. Mikroskop, Manipulator und Perfusionssystem ruhen auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Vibrationsisolationstisch), da geringste Erschütterungen die Formierung und Aufrechterhaltung eines Gigaseal unmöglich machen können. Analog-Digital-Wandler/Verstärker (EPC9, HEKA, Germany) mit Monitor und Computer sind nicht zu sehen.

## 2.7.6. Verwendete Pharmaka

### (±)-Isradipin (Dihydropyridin, DHP)

Da Isradipin sehr lichtempfindlich ist, wurden alle *Patch-Clamp*-Experimente im Dämmerlicht durchgeführt (Herstellung der Verdünnungen als auch elektrophysiologische Experimente). Um das bei den Superfusionsexperimenten verwendete Isradipin in Lösung zu bringen, war die Zugabe von Ethanol in einer finalen Konzentration von 0,02 % (v/v) notwendig. Auch der Kontrolllösung (Badlösung) wurde Ethanol mit entsprechender Konzentration zugesetzt.

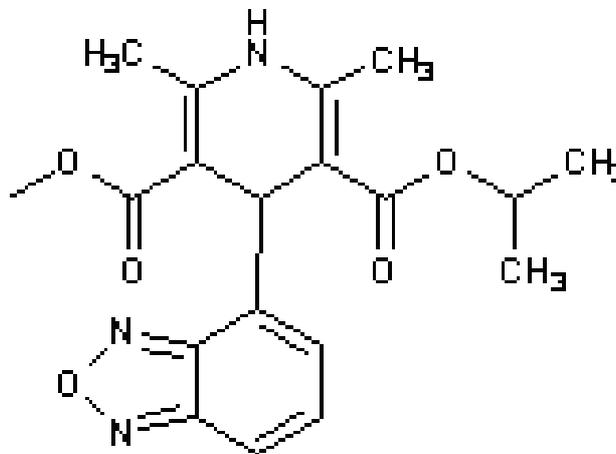
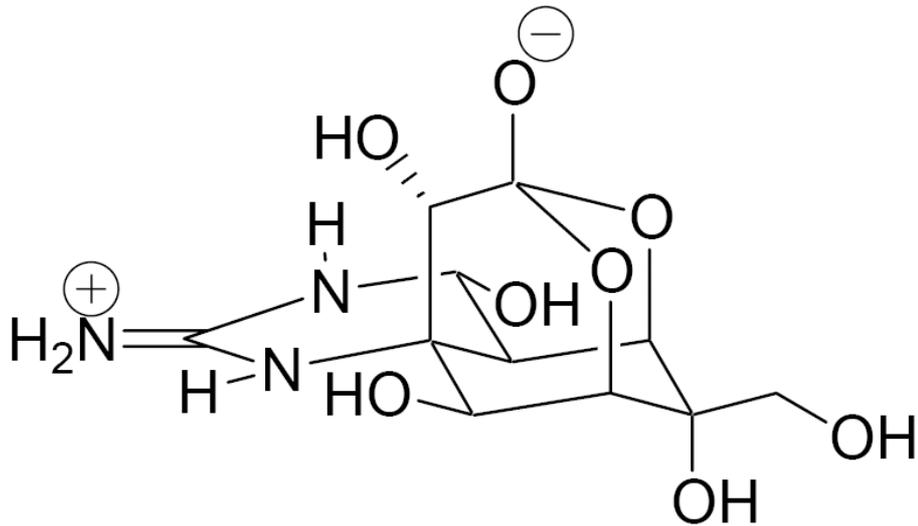


Abb. 2.13: Strukturformel des Isradipins.

### Tetrodotoxin (TTX)

Das hier verwendete Tetrodotoxin wird auch als Maculotoxin bezeichnet und hemmt selektiv spannungsgesteuert Natriumkanäle. Es handelt sich um eine extrem toxische Verbindung, die sich im Gastrointestinaltrakt des japanischen Kugelfisches *Sphaeroides rubripes*, beim Oktopus *Hapalochlaena maculosa* sowie bei einem kanadischen Molch (*Taricha torosa*) findet. Tetrodotoxin verfügt über eine positiv geladene Guanidinium-Gruppe, über die u.a. die Anbindung an die Na<sup>+</sup>-Kanalpore von der Aussenseite der Membran her erfolgt. Verwandt mit dem TTX ist das Saxitoxin (STX). Es wird von dem Dinoflagellaten *Gonyaulax cantenella* gebildet, verfügt über zwei Guanidinium-Gruppen und besitzt folglich eine gegenüber TTX nochmals höhere Affinität zu Natriumkanälen. Da die das STX synthetisierenden Algen häufig von Muscheln (z.B. Miesmuscheln, *Mytilus edulis*) aus dem Meerwasser filtriert werden, kommt es über die Anreicherung im Muschelfleisch gerade in den Sommermonaten immer wieder zu Vergiftungsfällen. Es wird angenommen, dass

auch das TTX von symbiontisch lebenden Einzellern gebildet wird. Heute liegen allerdings bereits eine Reihe von unterschiedlichen chemischen Syntheseverfahren für TTX vor.



**Abb. 2.14: Strukturformel des Tetrodotoxins (TTX).** Die positiv geladene Guanidiniumgruppe ist für die Blockade spannungsgesteuerter Natriumkanäle auf der Außenseite der Membran verantwortlich.

**Abb. 2.15 (siehe folgende Seite): Tetrodotoxin (TTX)-Produktion in verschiedenen Spezies.** Der Gastrointestinaltrakt des japanischen Kugelfisches ist eine häufige Intoxikationsquelle, v.a. wenn der Fisch unsachgemäß verarbeitet wurde. Das Muskelfleisch ist toxischfrei. Wie beim Oktopus *Hapalochlaena maculosa* und dem Molch *Taricha torosa* sind es wahrscheinlich endosymbiontisch lebende Einzeller, die das Toxin synthetisieren. Bis heute sind eine Reihe von chemischen Syntheseverfahren zur Herstellung von TTX entwickelt worden.



**Sphaeroides  
rubripes**



**Hapalochlaena  
maculosa**



**Taricha torosa**

## 2.8. Dissoziation kardialer Mausmyozyten

### 2.8.1. Materialien und Reagenzien zur Langendorff-Myozytendissoziation

Langendorff-Apparatur (bestehend aus einer Primärkammer, die der Sauerstoffanreicherung der Perfusionslösung dient, sowie einer nachgeschalteten Sekundärkammer, in der die Perfusionslösung auf 37 - 38°C temperiert wird (Abb. 2.19 A).

Heparin (Liquemin<sup>®</sup> N 25000, 5 ml, 5000 I.E./ml): intraperitoneale Injektion von 100 I.E. 20 min vor zervikaler Dislokation, um eine Koagulation des Blutes in den Koronargefäßen zu verhindern (Roche, Mannheim, GER).

Petrischalen, Durchmesser: 10 cm, mit schwarzem Grund zur besseren Kontrastierung

Heissluftgebläse mit 2 Stufen (300°C, 500°C), 1400 Watt, zum Ausziehen der Pipettenkanülen (SteinelR, GER)

*Gel Loader Tips* zur Kanülierung der Mauseorta; 0,5 - 20 µl, 2 X 96 Eppendorf<sup>®</sup> *Geloader*, Lot T2194971, No. 0030001.222, Eppendorf AG (22331 Hamburg, GER)

Knetmasse zur Arretierung einer Plastikkanüle

Fadenmaterial zur Fixation der Aorta auf der Plastikkanüle, Alze Nähgarn, 100 % Polyester (GER)

Thermostat, Multi Temp III (Pharmacia Biotech, GER)

Thermostat, Grant W6 (Pharmacia Biotech, GER)

Kollagenase Typ B zur Myozytendissoziation, 500 mg, nicht-steril, No. 1088815, Roche (Mannheim GER)

Trypsin, Typ I aus Rinderpankreas, 1 g, T8003-1G, Sigma (München, GER).

**Tyrode-Lösung (Ca<sup>2+</sup>-frei):**

NaCl	135 mM
KCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	2,5 mM
Glucose	5 mM

pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

**2.8.2. Dissoziation nach der Chunk (Stückchen)-Methode zur Gewinnung akut dissoziierter Mausmyozyten****Ca<sup>2+</sup>-freie Lösung:**

NaCl	140 mM
KCl	5,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,9 mM
Glucose	11,1 mM
HEPES	10 mM

pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

**Glutamat-„Kraftbrühe“ (KB)-Medium (modifiziert nach Isenberg & Klöckner, 1982):**

Glutaminsäure	50 mM
HEPES	20 mM
Taurin	20 mM
Glucose	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	3 mM
EGTA	0,5 mM
KCl (1 M Stammlsg.)	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM

pH 7,3 (mit KOH einstellen)

### 2.8.3. Reagenzien zur Präparation eines Schweineherzens

Das Schweineherz ist hinsichtlich Morphologie und elektrophysiologischen Charakteristika dem menschlichen Herzen wesentlich ähnlicher als das Mauserz (Crick et al., 1998). Daher wurden die Untersuchungen zur Expression von  $Ca_v2.3$  auch auf das Schweineherz ausgedehnt. Hierbei stellt sich v.a. das Problem, die Ischämiezeit zu verlängern und damit die Transportzeit vom Schlachthof zum Labor möglichst gering zu halten. Zu diesem Zweck wurden die Schweineherzen unmittelbar nach Entnahme in eine auf 4°C temperierte kardioplege Lösung transferiert und dort bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

#### Kardioplege Lösung für Schweineherzen

NaCl	82 mM
KCl	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
Glucose	111,1 mM
HEPES	10 mM
Taurin	20 mM
pH 7,4 (mit NaOH einstellen)	

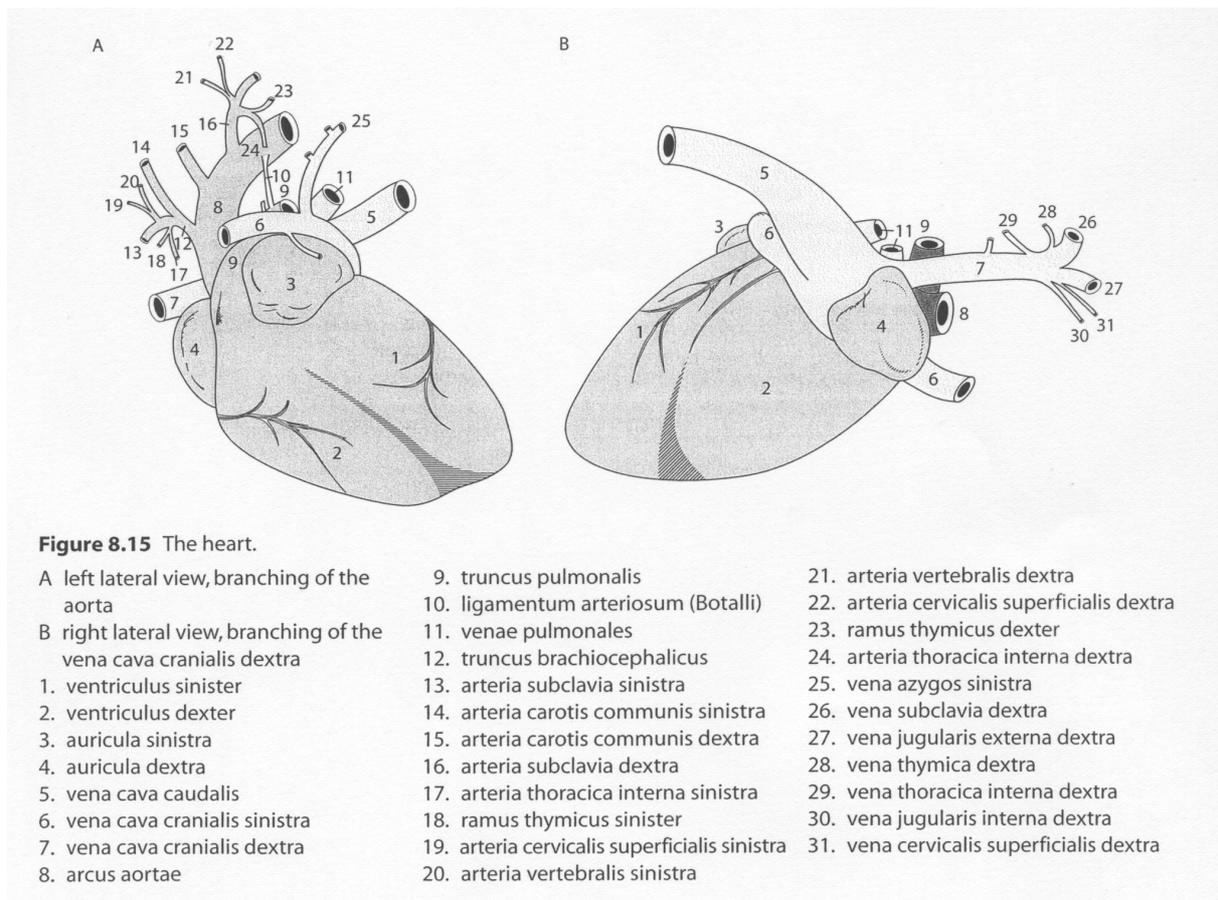
Im Labor erfolgte die Freilegung und Eröffnung der vier Herzhöhlen sowie die Präparation verschiedener Gewebssareale, die sowohl dem Erregungsbildungs- und Leitungssystem (Sinusknotenregion, AV-Knotenregion, Region des rechten und linken Tawara-Schenkels (Crus dextrum et sinistrum) als auch dem Arbeitsmyokard (aus allen vier Herzhöhlen) zuzurechnen sind.



**Abb.: 2.16: Das Schweineherz in der Frontalansicht.** Im epikardialen Fett eingebettet verläuft auf der Trennlinie zwischen rechtem und linkem Ventrikel der Ramus interventricularis anterior (RIVA) der Arteria coronaria sinistra.

#### 2.8.4. Dissoziation von Maus-Kardiomyozyten mittels Langendorff-Apparatur

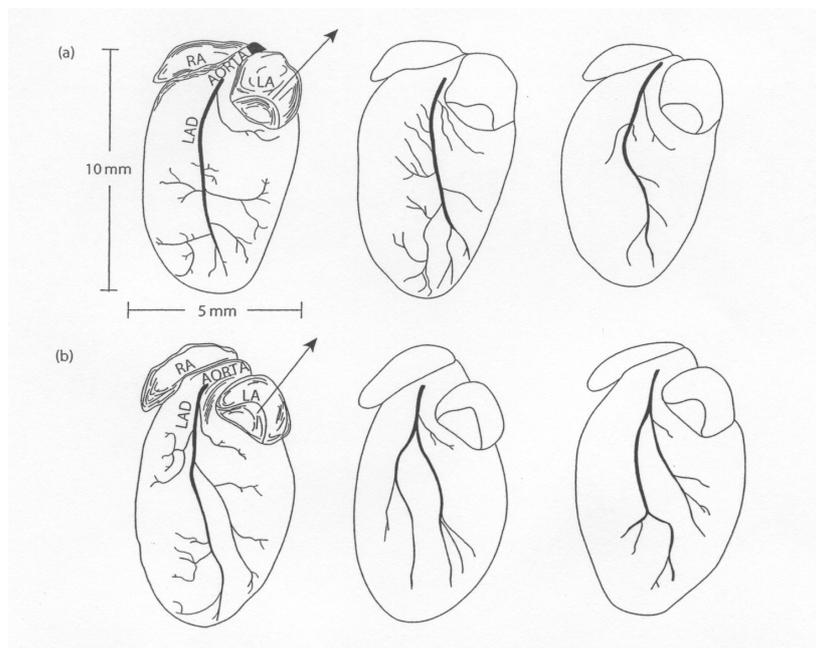
Für diese Versuchsreihe wurden C57Bl/6 Mäuse verwendet, mit einem mittleren Alter von 12 Wochen. Die eingesetzten Mäuse wurden zunächst in Einzelkäfigen isoliert und sodann 100 I.E. Heparin (Liquemin®) subkutan injiziert. Die Heparinisierung ist notwendig, um eine Koagulation des Blutes in den Herzhöhlen (Atrien und Ventrikeln) wie auch in den Koronargefäßen zu verhindern. Nach 30 Minuten erfolgte die zervikale Dislokation und sofortige Entnahme des Herzens. Nach Fixation des Versuchstieres auf einer Unterlage (i.d.R. mittels Injektionsnadeln auf Styropor), folgte die Benetzung des Haarkleides mit 70 % Ethanol, was neben einer desinfizierenden Wirkung auch zu einem verminderten Eintrag von Haaren in das Präparationsfeld führt. Prinzipiell gibt es verschieden schnelle Zugänge zum Herzen, die der individuellen Vorliebe entsprechend eingesetzt werden können.



**Abb. 2.17: Anatomie des Mauserzen mit Darstellung der Atrien, Ventrikel sowie der arteriellen und venösen Gefäße (Hedrich, 2004).**

Das Herz sollte nach Durchtrennung der großen Gefäße sowie des Ösophagus zusammen mit der Lunge entnommen werden und in 4°C kaltes PBS in einer

Petrischale von 10 cm Durchmesser (auf Eis) überführt werden. Hier kann nun mit Vorsicht unter dem Stereomikroskop Lunge, Trachea, Thymus und Ösophagus entfernt werden. Ziel ist es, die Aorta möglichst gut darzustellen, was auch die Entfernung eines Großteils des perikardialen Fettgewebes notwendig macht. In der Regel muss auch der Arcus aortae entfernt werden, wobei jedoch die Gefahr besteht, den Aortenstiel so stark zu kürzen, dass er für die spätere Fixierung der Kanüle keine ausreichende Länge mehr aufweist. Als Kanüle werden unterschiedliche Materialien vorgeschlagen. Häufig kommen abgeschliffene, extrem dünne Metallkanülen zum Einsatz, z.T. auch selbstgezogene Glaspipetten. In den eigenen Experimenten haben sich selbstgezogene Plastikkanülen bzw. *Gel Loader Tips* als äußerst nützlich erwiesen. Diese müssen bereits vorher mit PBS gefüllt werden, z.B. mit Hilfe einer Microfil-Injektionsnadel. Die Kanülierung erfolgt dann in kaltem PBS (4°C) unterhalb der Flüssigkeitsschicht, um den Eintrag von Luftblasen zu verhindern. Alle Schritte sollten möglichst schnell durchgeführt werden, um die Ischämiezeit des Herzens so kurz wie möglich zu halten.



**Abb. 2.18: Schematische Darstellung des Mauserzen mit den großen Koronargefäßen.** Ähnlich wie beim Menschen finden sich Variationen im Gefäßverlauf. In der Frontalansicht (a) dominiert der Ramus interventricularis anterior (RIVA, auch *left anterior descending coronary artery* (LAD) genannt). Wie in b) dargestellt, zeigt sich allerdings ein variabler Anteil an RIVA-Ästen mit hochsitzender Bifurkation und unterschiedlichen Ramifikationsgraden (Michael et al., 1995).

Die korrekte Platzierung der Kanüle ist von zentraler Bedeutung. Eine Möglichkeit besteht darin, die Kanüle über das Aortenklappenniveau hinaus bis in den linken Ventrikel vorzuschieben. Fixiert man in dieser Position mit einem Faden oder Nahtmaterial (z.B. Ethilon, monofil, 6-0), so kommt es primär zu einer Druckperfusion ausgehend vom linken Ventrikel. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es druckbedingt auch zu einer Dehnung des Aortenklappenringes und so retrograd zu einer Perfusion der Koronargefäße über deren Ostien kommt. Dieses Verfahren kann eine gute Zellausbeute liefern, es basiert jedoch auf einer Druckperfusion und führt damit möglicherweise zu einer latenten Vorschädigung der Zellen, was sich auch für nachfolgende elektrophysiologische Experimente (*Patch-Clamp*-Untersuchungen) als nachteilig erweisen kann. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Kanüle nicht über die Aortenklappenebene hinaus zu bewegen, sondern kurz zuvor, auf Ostienebene, zu fixieren. Damit ist gewährleistet, dass die Perfusion *lege artis*, d.h. über die Arteria coronaria dextra et sinistra verläuft. Dies lässt sich zu Beginn der Perfusion auch durch eine Entleerung, d.h. zunehmende Transparenz der Koronargefäße, nachweisen. Da die Kanüle in diesem Fall nur ein kurzes Stück in die Aorta vorgeschoben wird, ist auf eine starke Fixierung zu achten, damit sich das Herz während der Perfusion nicht ablöst. Die mittlere Präparationsdauer betrug in unseren Experimenten ca. 10 min.

Den generellen Aufbau der Langendorff-Dissoziationsapparatur zeigt Abb. 2.19 A. Die Zugabe der enzymatischen Verdauung (Kollagenase B- und Trypsin-haltige Tyrode-Lösung) bzw. Waschlösung (Tyrode-Lösung) erfolgt über einen Trichter in ein erstes, nicht-temperiertes Vorratsgefäß. Der Zulauf, wie auch der Ablauf, verfügt über einen Dreiwegehahn, über den die Lösungen bei Bedarf abgelassen werden können, bzw. über die auch mit destilliertem Wasser zwischen den einzelnen Lösungsapplikationen Waschschriffe des Systems durchgeführt werden können. Hinter der ersten Kammer ist eine Perfusionskontrolle zwischengeschaltet, über die die Herz (Koronar)-Perfusion präzise geregelt werden kann. Von hier fließt die Lösung durch ein Schlauchsystem, das sich innerhalb einer temperierten zweiten Kammer befindet, welche an einen Thermostaten angeschlossen ist. Die Temperatur des Thermostaten wurde vor Versuchsbeginn unter Zuhilfenahme eines Digitalthermometers so eingestellt, dass die Temperatur am Ausfluss der Langendorff-Apparatur 37 - 38°C beträgt. Prinzipiell sollte die Vorrichtung vor Durchführung der Dissoziation sowie nach Beendigung des Versuches immer mit

destilliertem Wasser gründlich gespült werden, um den Eintrag von Rückständen in das Mausherz zu vermeiden. Grobe Partikel könnten die Koronargefäße okkludieren und die Perfusion verschlechtern oder sogar unterbinden. Nach Aufhängung des Herzens wurde zunächst für 5 - 8 Minuten mit einer auf 37 - 38°C temperierten  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Tyrode-Lösung perfundiert. Alle Lösungen wurden über einen Perkolator begast und nach Übertritt in das erste Gefäß mit einer Sauerstoffatmosphäre überschichtet. Zur Dissoziation diente  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrode-Lösung, die mit Kollagenase Typ B (25 mg / 30 ml) und Trypsin (8 mg / 30 ml) versetzt wurde. Der enzymatische Verdau erfolgte für 25 - 30 min bei 37 - 38°C. Anschließend wurde das Herz erneut mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Tyrode-Lösung gewaschen, da verbleibende Kollagenase B- oder Trypsinreste die Ausbeute intakter, vitaler Kardiomyozyten einzuschränken vermag. Bei den ersten Dissoziationsversuchen wurde das Herz noch freischwebend an der Perfusionskanüle arretiert. Hierbei kann es jedoch zu Exsikkation der äußeren Herzschichten und damit auch zum Zelluntergang kommen. Hiervon sind v.a. die Atrien betroffen. Weiterhin muss angemerkt werden, dass die Perfusionstemperatur unter diesen Umständen nur eingeschränkt kontrollierbar ist, da sich vom linken Ventrikel in Richtung Perikard ein Temperaturgefälle ausbildet. Das Problem wurde durch Anbringen eines temperierten Doppelwandgefäßes gelöst, das mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Tyrode-Lösung gefüllt wurde. Dieses mittels eines zweiten Thermostaten auf 37°C temperierte Gefäß wurde mit einem „Laborboy“ direkt unter dem aufgehängten Herzen positioniert und ermöglicht die Dissoziation bei definierter Temperatur. Gleichzeitig wurde das Tyrodebad innerhalb des Doppelwandgefäßes mittels  $\text{O}_2$  (95 %  $\text{CO}_2$ , 5 %  $\text{O}_2$ ) begast. Während des regelrechten Dissoziationsprozesses ändert sich das äußere Erscheinungsbild des Herzens wesentlich. Wie bereits oben angeführt, ist die Blutleere in den Koronargefäßen ein deutliches Zeichen für eine akkurate Kanülenpositionierung. Mit Einsetzen des enzymatischen Verdau gewinnt das Herz dann einen zunehmend blassen, aufgedunsenen Aspekt. Nach Abschluss des enzymatischen Verdau wurde das Herz von seiner Aufhängung entfernt und in eine mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Tyrodelösung (5 - 10 ml bei RT) gefüllte Petrischale überführt. Mittels einer stumpfen Schere erfolgte die Dissektion des Herzens in größere Fragmente, aus denen sich die dissoziierten Zellen wolkenartig ablösten. Eine stärkere mechanische Agitation, z.B. mittels Pasteur-Pipette ist nicht notwendig und auch nicht empfehlenswert, da dies über die einwirkenden Scherkräfte schnell zum Zelluntergang führen kann. Die gewonnenen

Zellen können in diesem Zustand in der Petrischale bei Raumtemperatur oder bei 4°C für einige Stunden gelagert werden.

Das hier vorgestellte Dissoziationsverfahren liefert einen variablen Anteil von intakten, vitalen Zellen, wobei Optimierungsexperimente gezeigt haben, dass bei „freischwebendem“ Herzen die Ausbeute generell geringer ist, als bei Verwendung eines Doppelwandgefäßes. Das eigentliche Dissoziationsprinzip basiert auf der Verwendung  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung, wodurch es zu einer Trennung der Zellen entlang der *Disci intercalati* (Glanzstreifen) kommt. Die *gap junctions* (*Maculae communicantes*) sind in diesem Zustand geöffnet. Die elektrophysiologische Messung von Kalziumströmen macht aber das Überführen der Zellen in eine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Badlösung notwendig. Dies muss sehr behutsam, d.h. stufenweise geschehen, da es sonst durch den massiven Kalziumeinstrom durch die *gap junctions* zum Zelluntergang kommt. Es wurde eine finale Kalziumkonzentration von 2 mM angestrebt. Bei direkter Zugabe von Kalzium in dieser Konzentration kommt es zu einem Absterben nahezu aller dissoziierten und ursprünglich noch intakten Zellen. Um dies zu vermeiden und um die Zellen langsam an das externe  $\text{Ca}^{2+}$  zu gewöhnen, wurde eine sog. „Kalziumtreppe“ durchgeführt. Hierzu wird  $\text{Ca}^{2+}$  zunächst in 20 minütigen Abständen auf 0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM erhöht. Nach weiteren 20 - 30 Minuten werden die verbliebenen Zellen gezählt. Kardiomyozyten, die eine Kalziumkonzentration von 0,4 mM bereits toleriert haben, überstehen i.d.R. auch den finalen Sprung auf 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Die nun noch vitalen Zellen sind für mehrere Stunden stabil. Zellen, die während der Kalziumtreppe absterben, flottieren - sedimentieren also nicht. Intakte, vitale Zellen hingegen sedimentieren oder lagern sich am Gefäßboden bzw. der Gefäßwand ab. Die so gewonnenen Zellen wurden der *single-cell* RT-PCR zugeführt.

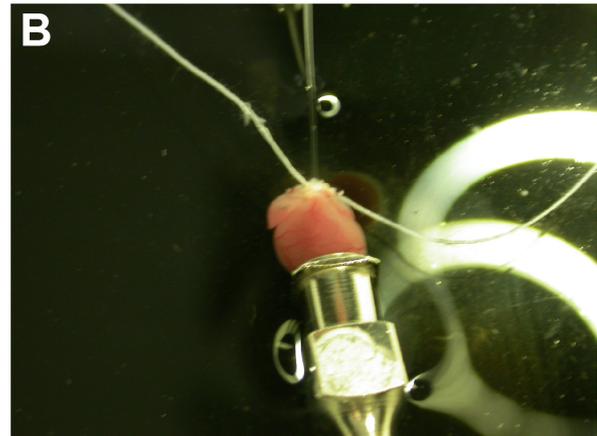
#### **2.8.5. Dissoziation nach der Chunk-Methode**

Prinzipiell kann die Dissoziation von Kardiomyozyten auch auf andere Weise vollzogen werden. Eine Möglichkeit besteht in der Zerkleinerung des Herzens in kleine Fragmente von ca. 1 mm Kantenlänge. Diese Einzelfragmente werden dann in  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung in ein temperiertes Doppelwandgefäß bei 37 - 38°C überführt. Eine Anreicherung mit  $\text{O}_2$  ist dringend erforderlich. Die Durchmischung wird hierbei mittels Rührfisch bewerkstelligt. Die Herzfragmente wurden zunächst dreimal 10 Minuten in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung inkubiert und anschließend 20 - 30 min mit Kollagenase B

verdaut. Danach erfolgte der Transfer der Zellen in Glutamat-KB-Medium. Für Mausherzen hat dieses Verfahren allerdings nur geringe Ausbeuten intakter dissoziierter Kardiomyozyten im Vergleich zur Langendorff-Dissoziation geliefert.

**Abb. 2.19: Langendorff-Perfusion und Dissoziation von Maus-Kardiomyozyten (siehe folgende Seite).**

A) Darstellung einer Langendorff-Apparatur: In einem Trichter wird die Perfusionslösung zunächst mit O<sub>2</sub> angereichert und fließt dann in eine O<sub>2</sub>-haltige Vorkammer. Von hier gelangt die Lösung in die Temperierkammer (37 - 38°C), deren Ausfluß mittels Perfusionskontrolle reguliert werden kann. B) Kanülierung der Aorta: Aufgrund der geringen Dimensionen des Mausherzens bedarf die Kanülierung der Aorta einigen Geschicks. Das Prozedere ist also zeitaufwendig (ca. 10 min), so dass man in kaltem PBS (4°C) arbeiten muss, um die Ischämiezeit des Herzens zu verlängern. Die Petrischale, in der die Präparation erfolgt, besitzt einen schwarzen Untergrund, um Reflexionen zu minimieren und den Kontrast zu verstärken. Die Plastikkanüle, die bereits zuvor mit PBS luftblasenfrei gefüllt wurde und auf die Aorta aufgezogenen werden soll, wird mittels Knetmasse am Schalenrand fixiert. Damit hat der Experimentator beide Hände zur weiteren Präparation zur Verfügung. Noch vor der Kanülierung ist es notwendig, mittels Faden eine Schlaufe vorzufertigen. Erst jetzt kann die freipräparierte Aorta vorsichtig aufgezogen werden und mittels Faden (oder Nahtmaterial) auf der Plastikkanüle fixiert werden. Um ein Weggleiten des Herzens zu verhindern, empfiehlt es sich, ein Widerlager zu verwenden. C) Das kanülierte Herz wird über die Aorta mittels Kollagenase B / Trypsin-Lösung verdaut („freischwebende“ Ansicht). D) Bessere Resultate lieferte die Herzdissoziation in einer mit Doppelwandgefäß auf 37 - 38°C temperierten und mit O<sub>2</sub> angereicherten Ca<sup>2+</sup>-freien Tyrode-Lösung. E) Darstellung akut dissoziierter Mauskardiomyozyten. Man achte v.a. auf die typische borkenartige Morphologie ventrikulärer Arbeitsmyokardzellen. Die Querstreifung ist ansatzweise erkennbar. Im Hintergrund und als Größenvergleich finden sich Erythrozyten. F) Dissoziierte Kardiomyozyten unterschiedlicher Morphologie. Abgestorbene Myozyten präsentieren sich in der charakteristischen Kugelform (sog. „*meat balls*“).



### 2.8.6. Aufbereitung menschlichen Herzgewebes

Aus der Klinik für Herz-Thoraxchirurgie (Prof. Dr. E-R. de Vivie) wurde eine Probe des rechten menschlichen Herzohres (Auricula dextra) bereitgestellt, die in 0,9 %iger NaCl-Lösung möglichst schnell in die eigenen Laborräume überführt und hier in den Prozess der RNA-Isolation eingeschleust wurde.

## 2.9. Telemetrische Detektion von Biopotentialen - Materialien und Methoden zur Kleintierchirurgie und telemetrischen Implantation von Radiofrequenztransmittern zur EKG, EEG und EMG-Messung

### 2.9.1. Injektionslösungen und Pharmaka

#### **Chemikalien zur Händedesinfektion**

Sterillium<sup>®</sup>, Bode Chemie (Hamburg, GER)

#### **Chemikalien zur Instrumenten und Flächendesinfektion**

Inzidin<sup>®</sup>, Ecolab GmbH & Co.OHG (Wien, Austria).

#### **Injektionslösungen**

0,9 %ige NaCl-Lösung, isotone Kochsalzlösung, plasmaisotoner Flüssigkeitsersatz, steril, Boehringer, Delta-Pharm GmbH (Pfullingen, GER)

Ringer-Lösung Volumenersatz zur Aufrechterhaltung eines regelrechten Elektrolytstatus, steril, Delta-Pharm GmbH (Pfullingen, GER)

#### **Injektionsnarkotika**

Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>, 100 mg/ml) bzw. Esketaminhydrochlorid 25 mg/kg (2 ml Ampullen), Parke-Davis GmbH (Karsruhe, GER)

Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) Bayer Vital GmbH & Co.KG (Leverkusen, GER)

Pentobarbital (Narkoren<sup>®</sup>)

#### **Postoperative Schmerzmedikation**

Tramadol (Tramal<sup>®</sup>), Grünenthal GmbH (Aachen, GER)

Metamizol (Novalminsulfon-ratiopharm<sup>®</sup> 1), 500 mg/ml, Ratiopharm (Ulm, GER)

## **Pharmaka zur kardiovaskulären Phänotypisierung**

Atropin (Atropinum sulfuricum Eifelfango<sup>®</sup>, Atropinsulfat-Lösung 0,5 mg/ml) sonstige Bestandteile: Natriumchlorid, Wasser für Injektionszwecke; Chem. Pharm. Werke GmbH & Co.KG. (Bad Neuenahr-Ahrweiler, GER)

Propranolol (Propranololhydrochlorid, Dociton<sup>®</sup>, 1 mg/ml) sonstige Bestandteile: Zitronensäure, Wasser für Injektionszwecke, AstraZeneca GmbH (Wedel, GER)

Methoxamin (Methoxaminhydrochlorid), M6524-500MG; 500 mg, Sigma (München, GER)

(±)-Isoproterenol (Isopropylarterenol) I-5627, 5 g, Lagerung bei RT, Sigma (München, GER)

## **Pharmaka zur prä- und postoperativen Wundversorgung**

Merbromin (Merchuchrom<sup>®</sup>), 2 %ige Lösung, Krewel Meuselbach GmbH (Eitorf, GER)

Polyvinylpyrrolidon-Iod (Polyvidon-Iod<sup>®</sup>), MUNDIPHARMA GmbH (Limburg (Lahn), GER)

Dexpanthenol (Bepanthen<sup>®</sup>), Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, GER)

## **2.9.2. Operationsbedarf - chirurgische Geräte**

### **2.9.2.1. Allgemeines**

Operationskasten zur Minimierung des aerogenen Keimeintrages in Wundflächen und Körperhöhlen (Abb. 2.24).

Heizplatte (temperiert auf 37 - 38°C, im Dauergebrauch besser geeignet als eine Infrarotlampe, da letztere stärkere Konvektion hervorruft und damit das Risiko eines aerogenen Keimeintrages erhöht wird.

Infrarotlampe (Ferkellampe/Wärmelampe)

Basisplatte (zugehörig zum *small animal retraction system*), magnetisch, Stahl, 20 X 30 cm mit zentraler Öffnung von 10 X 13 cm, *Fine Science Tools*, FST (Heidelberg, GER)

Fixatoren, 2,5 cm, magnetisch, Aluminium-ummantelt, *Fine Science Tools*, FST (Heidelberg, GER)

Elastomere, *Fine Science Tools*, FST (Heidelberg, GER)

Wundretraktoren, 5 mm, für dynamisch-verstellbare Retraktion, flexibel, atraumatisch; ersetzen weitgehend zusätzliche Assistenz bei der Operation, *Fine Science Tools*, FST (Heidelberg, GER)

Guillotine für Nager

### **2.9.2.2. Mikrochirurgie-Mikrodissektions-Besteck**

#### **Pinzetten (*thumb forceps*)**

Eine Vielzahl von Pinzettentypen kann entsprechend ihrer spezifischen Vorteile bei der Operation zum Einsatz kommen. Pinzetten bestehen prinzipiell aus zwei Schenkeln, an denen man ein sogenanntes Maulteil, die Grifffläche und den Federteil unterscheidet. Basierend auf Morphologie des Maulteiles und der Griffflächen werden unterschiedliche Pinzettentypen differenziert.

Anatomische Pinzetten weisen stumpfe, zahnlose Maulteile auf. Sie sind traumatisch da große Kraft aufgewendet werden muss, um das Gewebe zu fixieren.

Chirurgische Pinzetten, die auch „Rattenzahnpinzetten“ (*rat mouth forceps*) genannt werden, besitzen unterschiedlich geformte Zähnchen, wie z.B. die chirurgische

Standardpinzette mit 1 - 5 ineinandergreifenden Zähnen, die Brown- oder Krokodilpinzette mit seitlicher Zahnung und die Adson-Brown-Pinzette mit seitlicher Zahnung und breitem Griff. Eine besondere Variante stellt die Pinzette nach deBakey dar, die atraumatisch ist und speziell für die Gefäßchirurgie entwickelt worden ist.

### **Spezifische Pinzettentypen**

Dumont-Pinzetten (nicht magnetisch, nicht korrosiv, verschiedene Größen)

Iris-Pinzette (*Iris Forceps*, gezahnt)

Adson-Pinzette (*Adson Forceps*, Pinzette mit breitem Handgriff)

*Dressing Forceps* (verschiedene Größen, gezahnt)

*Filter Forceps* (Filterpinzette)

Tuchklemme nach Backhaus (*Backhaus Towel Clamp*)

### **Klemmen**

Klemmen bestehen aus einem sog. Maulteil, dem Gelenk, den Stielen, den Sperrhaken und den Griffen. Arterienklemmen dienen dem Fassen und Halten von blutenden Gefäßen und können im vorderen Bereich mit Zähnen ausgestattet sein.

Gefäß (Arterien)-klemmen:

Micro-, Mosquito-, Halstead oder Halstead-Mosquito-Klemme: sehr kleine Klemmen  
Kelly-, Crile-Klemme: etwas größer; die Crile-Klemme hat querverlaufende Rillen über die ganze Maulbreite, während die Kelly-Klemme nur im vorderen Bereich querverlaufende Rillen aufweist.

Rochester-Oschner/Rochester-Klemme: sehr starke Klemme, mit Haken am Ende; diese Klemmen werden v.a. in der Orthopädie für die Manipulation von Knochenteilen eingesetzt.

Pean-Klemme: kräftige Arterienklemme

Rochester-Carmalt-*Hemostatic Forceps* besitzen Quer- und Längsrillen und werden für das Abklemmen von großen Gefäßstümpfen verwendet.

### **Scheren**

Bei Scheren kann man Ringe, Branchen, den Schliessteil und die Blätter unterscheiden. Scheren quetschen das Gewebe um ein Vielfaches mehr, als das z.B. Skalpellklingen tun und daher sollte nur mit Scherenspitzen geschnitten werden. Scheren können in ihrer Form stumpf, spitz, gerade oder auch gebogen sein.

Feder-Schere (*Vannas scissors*)

Dissektionsschere (*Dissecting scissor*, gerade / gebogen)

Mayo-Schere (gerade / gebogen)

### **2.9.2.3. Weiteres chirurgisches Material**

Nadelhalter (*needle holder*): Nadelhalter sind klemmenähnliche Instrumente zum Fassen und Halten von chirurgischen Nadeln. In funktionstüchtigen Nadelhaltern sollte sich die eingespannte Nadel nicht von Hand drehen lassen. Man unterscheidet bei Nadelhaltern Spitzen, Backen, Gelenke, Stiele, Sperren und Griffe.

Dissektionsnadeln (gerade / gebogen)

Ultraschallbad (Reinigungsvorrichtung zur Entfernung von Blut- und Gewebsresten)

Mikroinfusionspumpen, B. Braun Petzold GmbH (Melsungen, GER)

Stereo-Kopfbandlupe, Seefeld 8 X 6 cm, mit 2,2-; 3,3- und 5,5-facher Vergrößerung, Heiland (Hamburg, GER)

Omnifix F<sup>®</sup> Tuberkulin Einmalspritzen, 1 ml, Skalenwert 0,01 ml, mit Luer Ansatz, einzeln steril verpackt, B. Braun Petzold GmbH (Melsungen, GER)

Insulin-Spritze mit Kanüle, 1 ml, einzeln steril verpackt, 40er Teilung

Sterican<sup>®</sup> Einmal-Kanülen, mit transparentem Luer-Ansatz, einzeln steril verpackt, Größe 20, 0,40 X 20 (Durchmesser (mm) X Länge (mm)).

Verbindungsleitung, für den Anschluss und zur Verlängerung der Infusions- und Transfusionssysteme (steril und pyrogenfrei), Fresenius (Bad Homburg, GER)

Heidelbergerverlängerung, Fresenius (Bad Homburg, GER)

Instrumentenschale (Melamin)

Nierenschalen (aus weissem Kunststoff, 26 cm lang)

Nierenschalen (aus grauer Presspappe, für den Einmalgebrauch)

Nierenschale (aus mattem Edelstahl, 25 cm lang, 12,5 cm breit, 3,5 cm hoch)

Instrumentenschale (mit Knopfdeckel)

Petrischalen aus Glas (Deckel-Durchmesser 10 cm, Höhe der Unterschale: 2 cm)

Parafilm „M“ Laboratory Film“ (American National Can<sup>TM</sup>)

Ampullenständer

Wattestäbchen

OP-Abdecktücher (Lochtuch, aus 100 % Baumwolle, autoklavierbar)

Pur-Zellin<sup>®</sup> (Zellstofftupfer aus hochgebleichtem Verbandsstoff von der Rolle, steril)

Mollzell®- Alkoholtupfer (getränkt in 71 %igem Ethylalkohol, einzeln steril verpackt, Tupfergröße: 14 X 14 cm)

Sterican, Durchmesser 0,40 X 20 mm, 100 St.; 27G X 3/4", Gr. 20, steril, REF. 4657705, B. Braun Melsungen AG (D-34209 Melsungen, GER)

NOBA Top®12 Vliesstoffkompressen, 50 St., 5 X 5 cm, steril, NOBA Verbandmittel (D-58300 Wetter, GER)

Verbandschere nach Lister

Augenpinzette (anatomisch)

Augenpinzette (chirurgisch)

Aesculap Einmal-Skalpelle (mit Klingenschutz, Kunststoffgriff, einzeln steril verpackt, BA215, BA222)

Kauterset Typ 2, Heiland (Hamburg, Germany)

Histoacryl, Gewebeklebstoff, zum Kleben glatter und frischer Hautwunden, 10 s Polymerisationszeit, 5 Ampullen, B. Braun Melsungen AG (D-34209 Melsungen, GER)

Wundklammern nach Michel (7,5 mm X 1,75 mm)

Zange zum Anlegen und Entfernen von Wundklammern

Pinzette zum Anlegen von Wundklammern

Schlinggazetupfer (100 % Baumwolle, 20-fädig)

Leukopor<sup>®</sup>, luftdurchlässiges Verbandspflaster aus weissem Viskoseflies, hypoallergen, 2,5 m X 9,2 m, 12 St., AP, Ref.No. 2454, BSN medical GmbH&KG (D-22771 Hamburg, GER)

Leukosilk<sup>®</sup>, BDF, Beiersdorf AG (Hamburg, GER)

Zahnsonden (mit Rundgriff und dünnen, unzerbrechlichen Spitzen)

Glas-Ionomer-Zement (Iono Express Fill<sup>®</sup>, Kent Dental, wasseranmischbarer Glas-Ionomer-Füllungszement, gute Transluzenz)

Kugelstopfer (doppelendig, mit unterschiedlichem Durchmesser)

#### **2.9.2.4. Chirurgisches Nahtmaterial**

Bei dem für die Hautnähte (Bauchhautnaht und Kopfhautnaht) verwendeten Ethicon<sup>®</sup> (Polyamid, 4-0 bzw. 6-0, M2) handelt es sich um ein synthetisches, nicht resorbierbares, monofiles chirurgisches Nahtmaterial aus Polyamid 6  $[\text{NH-CO-CH}_2)_5]_n$ . Polyamid 6 entsteht durch Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolactam, wobei Ethilon II Blau durch ein blaues Pigment gefärbt wird und der Faden an Edelstahlnadeln gekoppelt ist. Das Material ist nicht haftend am Gewebe und hinsichtlich Anwendungsgebiet auf Hautnähte fokussiert. Gegenanzeigen sind nicht bekannt; evtl. können geringfügige entzündliche Gewebsreaktionen und lokale Reizungen im Wundbereich auftreten. Eine präexistierende Infektion kann durch das Nahtmaterial u.U. negativ beeinflusst werden.

Die Epidermis stellt die oberste Hautschicht dar und ist relativ robust, aber dünn; die Dermis stellt die darunterliegende durchblutete Hautschicht dar, ist dreimal dicker als die Epidermis und besteht aus dichtem und robustem Bindegewebe. Mechanische Festigkeit nach Schnittführung wird in ihr erst langsam wieder erreicht.

Der Großteil der Spannung, der auf der Wunde lastet, wird durch die Faszie ausgeglichen. Die Naht muss letztlich der natürlichen Hautspannung widerstehen und die Wundränder zusammenhalten. Es ist daher notwendig, ein Nahtmaterial mit mittlerer Reisskraft zu wählen, das der Hautspannung während der kritischen Wundheilung standhält. Bei allen kleintierchirurgischen Eingriffen bei der Maus wurden Epidermis und Dermis gemeinsam verschlossen, allerdings nur dort, wo das

Tier postoperativ keinen Zugang hat (Kopf und Rücken), um eine Wundmanipulation zu verhindern.

Für den Verschluss der Abdominalwand sind einige Besonderheiten zu berücksichtigen: Die Bauchmuskulatur ist von einer Abdominalfaszie umgeben, die fibröses, scheidenartiges Bindegewebe darstellt, das die Muskulatur bedeckt und das stärkste Gewebe der Bauchwand darstellt. Bei einer Aponeurose handelt es sich um die Fortsetzung der Faszienhülle über die Muskulatur hinaus. Fasziennähte erreichen nach einem Monat ca. 25 – 40 % ihrer ursprünglichen Stärke, nach drei Monaten 55 - 65 %. Die ursprüngliche Festigkeit wird aber nie mehr ganz erreicht. Das Nahtmaterial braucht in diesem Falle eine hohe Ausgangsreißkraft. Obwohl die Zugkräfte bei der Maus geringer zu sein scheinen, muss berücksichtigt werden, dass sowohl die Kopfnaht (wegen des darunter befindlichen Glas-Ionomer Zementes zur Elektrodenfixation beim EEG, siehe unten) als auch die Bauchwandnaht (aufgrund des intraperitoneal implantierten Transmitters für EEG und EKG-Messungen) einer erhöhten Spannung ausgesetzt sind.

#### **2.9.2.5. Materialien zur enzymatischen Transmitterreinigung und Resterilisation**

Neodisher® Medizym, zur mechanischen und enzymatischen Reinigung von chirurgischem Besteck, Endoskopen etc., enthält anionische Tenside sowie ein aus einem Vertreter der Gattung Bacillus gewonnenes proteolytisches Enzym

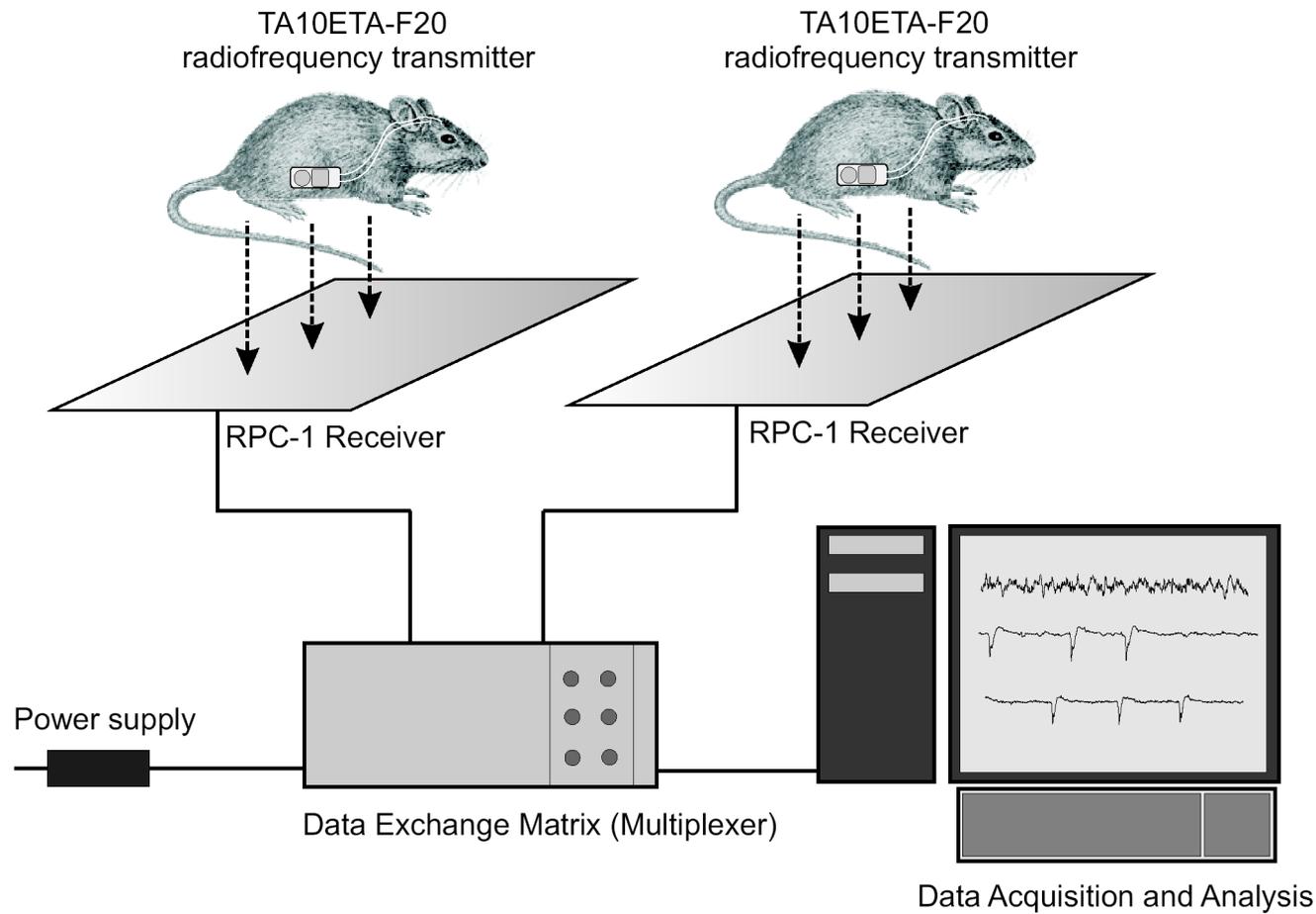
Glutardialdehyd, 25 % in Wasser, finale Konzentration 2 %, Art.No. 3778.1, Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, GER)

#### **2.9.3. Telemetrie-System zur Aufnahme elektrokardiographischer (EKG) und elektroenzephalographischer (EEG) Signale**

Für die telemetrische Erfassung von Biopotentialen wurde auf ein Aufnahme- und Analysesystem von *Data Sciences International* (DSI) zurückgegriffen. Die Abb. 2.21 zeigt schematisch den Aufbau dieses Telemetrie-Systems. Die Detektion und Transmission des Biopotentials (EKG, EEG, EMG) erfolgt über einen Transmitter, wobei für unterschiedliche Spezies verschiedene Transmittersubtypen zur Verfügung stehen. Für Ratten- und Maus-Implantationsversuche wird der TA10ETA-F20-Transmitter (DSI) empfohlen (Volumen: 1,9 cm<sup>3</sup>, Gewicht 3,9 g). Obwohl dieser

Transmittertyp zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung mit 10 X 21 mm das kleinste verfügbare Modell darstellte, muss bei Mäusen ein Mindestalter der Versuchstiere von 10 Wochen (entspricht ca. 20 g Körpergewicht) vorausgesetzt werden, um eine erfolgreiche Implantation zu gewährleisten. Die verwendeten Radiofrequenztransmitter setzen sich aus einer Sendereinheit, einer Batterie (Aktivitätsdauer ca. zwei Monate im Dauerbetrieb; im Intervallgebrauch durchschnittlich ca. sechs Monate) sowie zwei Ableitelektroden (*sensing leads*) zur Detektion von Biopotentialen zusammen. Der helikal gearbeitete Elektrodendraht aus VA-Stahl ist bruchstabil und flexibel und mit einer Silikonschicht isoliert; der Transmitter selbst besitzt eine biokompatible Ummantelung. Eigene Versuche haben gezeigt, dass auch die dauerhafte Implantation (bis zu vier Monaten) nicht zu massiven entzündlichen oder stark fibrotischen Umgebungsreaktionen führt. Die Aktivierung der Transmitter erfolgt mittels eines magnetischen Schalters (*magnetic switch*).

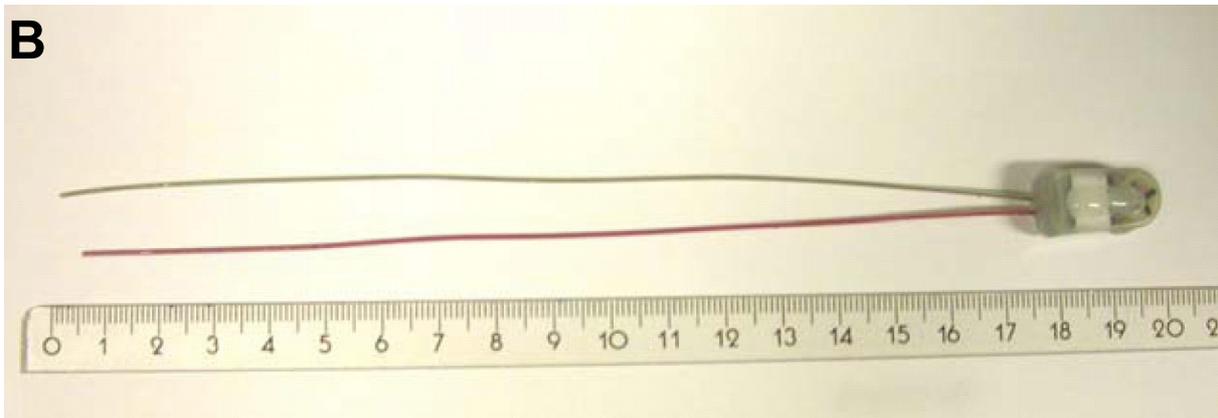
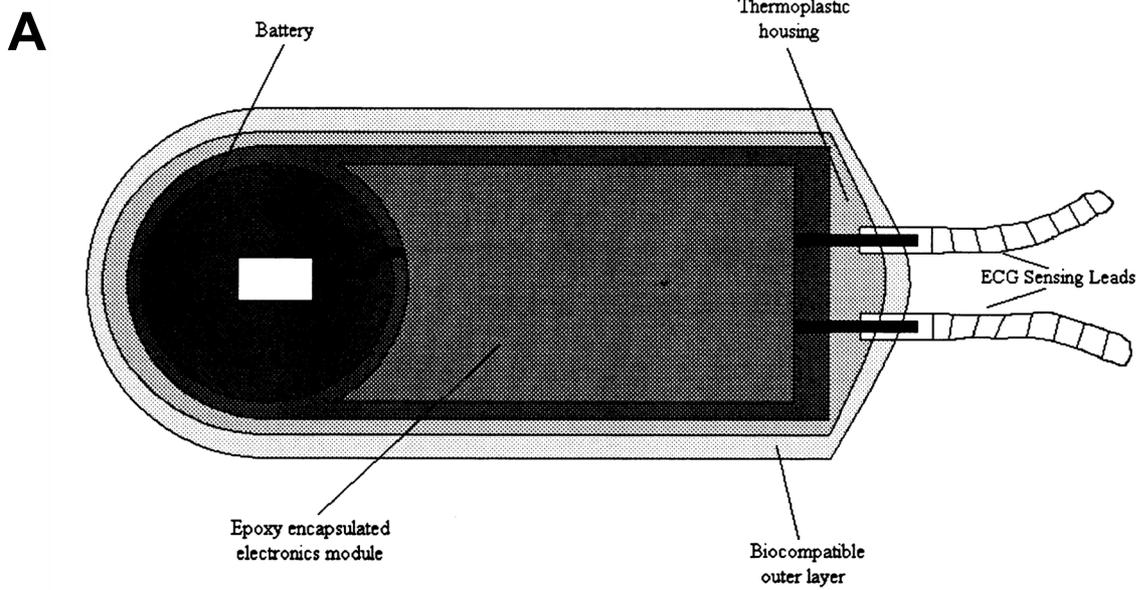
Drei verschiedene Parameter können von dem verwendeten Transmittertyp detektiert bzw. an den *Receiver* (RPC-1, DSI) weitergeleitet werden: 1. Biopotentiale: Dabei kann es sich prinzipiell um elektrokardiographische (EKG), elektromyographische (EMG) und elektroenzephalographische (EEG) Signale handeln. 2. Temperatur: Die intraabdominale Implantation des Transmitters (s.u.) ermöglicht u.a. die Verfolgung der Körperkerntemperatur als wichtiges Kriterium der postoperativen Entwicklung. Aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpervolumen sind kleine Nager postoperativ hinsichtlich Unterkühlung besonders gefährdet. Darüber hinaus ist die Körperkerntemperatur ein wichtiger Parameter zur Bewertung des Aktivitätszustandes bei Mäusen, da die Körpertemperatur auch bei geringer Aktivität (Fress- oder Putzverhalten) rasch ansteigt. Zuletzt ist auch der Aktivitätsparameter bestimmbar, der die Lokalisationsänderung des Tieres in der Horizontalen über der Empfängerplatte widerspiegelt.



**Abb. 2.21: Telemetrie-System zur Erfassung von Biopotentialen (*Data Sciences International, DSI*).** Der implantierte Transmitter (TA10ETA-F20) sendet ein Analogsignal (hier EEG) an den Empfänger (*Receiver-Platte, RPC-1*). Über eine *Data Exchange Matrix* (Multiplexer) erfolgt die Weiterleitung an die Analyseeinheit (*Data Acquisition and Analysis, DSI*).



**Abb. 2.22: Telemetrie-Setup** mit *Data Exchange Matrix* (Multiplexer) und sechs verschiedenen *Receiver-Platten (RPC-1)*. Die einzelnen Kammern ermöglichen eine ungestörte Messung der implantierten Tiere während Langzeitaufnahmen. Ein *cross-talk* zwischen den einzelnen *Receiver-Platten* wird durch die Auskleidung der Kammern mit dünnen Edelstahlplatten (Faraday-Käfig) verhindert.



**Abb. 2.23: Schematische Darstellung des TA10ETA-F20 Transmitters (siehe vorherige Seite).** A) Empfangselektroden geben das Biopotential-Signal (EKG, EEG, EMG) an die eigentliche Transmittereinheit weiter. Eine biokompatible Außenschicht, die auch die Batterie umfasst, grenzt diese Einheit ab und verhindert Fremdkörperreaktionen post implantationem. B) Originalansicht des TA10ETA-F20 Transmitters.

Das Analogsignal wird von einer Empfängerplatte (RPC-1) empfangen und von dort an eine sog. *Data Exchange Matrix* (DSI) weitergeleitet. Auf den verwendeten Empfängerplatten (RPC-1 *Receiver*-Platten) haben Standard-Makrolonkäfige vom Typ II (26,7 cm X 20,7 cm X 14,0 cm, Grundfläche 410 cm<sup>2</sup>) Platz. Die *Data Exchange Matrix* kann die eingehenden Signale von bis zu sechs Versuchstieren simultan empfangen und fungiert als Multiplexer. Hieran schließt sich die Analog-Digital-Umwandlung der aquirierten Daten an, die mit Hilfe einer Daten-Aquisition und Analyse-Software weiter verarbeitet und analysiert werden können. Auf die Datenanalyse wird zu einem späteren Zeitpunkt genauer eingegangen werden.

#### **2.9.3.1. Chirurgische Implantation des TA10ETA-F20 Transmitters**

Für die telemetrischen Aufzeichnungen von Elektrokardiogrammen (EKG) wurden Ca<sub>v</sub>2.3(+|+) sowie Ca<sub>v</sub>2.3-defiziente (Ca<sub>v</sub>2.3-|-) Mäuse verwandt (Pereverzev et al, 2002), welche mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) anästhesiert/narkotisiert wurden. Die Administration erfolgte intraperitoneal (ip.) im Bereich der rechten Unterbauchregion. Die oben angeführte Ketamin/Xylazin-Kombination in entsprechender Dosierung hat sich in Vorversuchen als vorteilhaft erwiesen. Die alleinige Ketamin-Applikation ist für die Implantation unzureichend, da erst Xylazin aufgrund der begleitenden Muskelrelaxation eine problemlose Transmitterimplantation ermöglicht. Da eine Xylazin-Injektion eine drastische Abnahme der Herzfrequenz zur Folge haben kann, können Überdosierungen u.U. zu Bradykardie und Herzstillstand mit Exitus letalis führen. Auch eine Atemdepression kann eintreten.

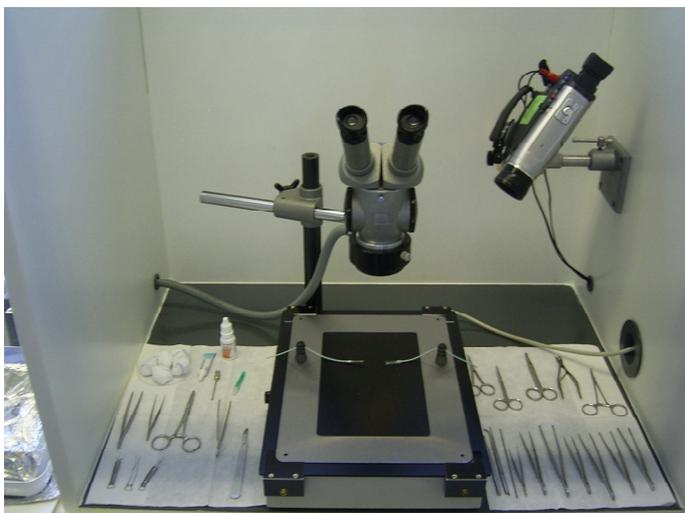
Andere Narkotika, wie Pentobarbital (Narkoren<sup>®</sup>), wurden ebenfalls getestet. Aufgrund der schlechten Dosierfähigkeit und Fehlen muskelrelaxierender Wirkung kam es langfristig nicht zum Einsatz. Eine Inhalationsnarkose (z.B. mit Halothan) wurde nicht durchgeführt, da der häufige Lagewechsel des Versuchstieres während der Implantation sowie die begrenzten Ausmaße des Operationsfeldes eine solche unpraktikabel erscheinen liessen. Im Bereich der Kleintierchirurgie stellt die Narkose

ein zentrales Problem dar, nicht nur wegen des geringen Körpervolumens der Versuchstiere. Systematische Studien zeigen, dass verschiedene Mausstämme (Swiss Webster Mäuse, C57Bl/6, etc.) ganz unterschiedlich auf verschiedene Narkotika reagieren und dass es selbst innerhalb eines Stammes zwischen den Geschlechtern signifikante Abweichungen im Reaktionsverhalten geben kann. Auf das Einführen eines Trachealtubus zur künstlichen Beatmung (artefizielle Ventilationsvorrichtung) wurde verzichtet, da es sich im Operationsprozedere als nicht notwendig erwiesen hat. Nur bei Eröffnung des Thorax zur Vermeidung eines (Entspannungs)pneumothorax ist die artifizielle Respiration mittels eines speziellen Kleintierrespirators angezeigt.

### **2.9.3.2. Operationskautele**

Sterilität ist im Bereich des hier beschriebenen kleintierchirurgischen Vorgehens nur bedingt einhaltbar. Ziel kann und muss daher die Durchführung der Implantation unter maximal möglichen sterilen Kautelen sein. Die Implantation erfolgte daher in einem speziell dafür konstruierten Operationskasten, um Konvektion und damit aerogenen Keimeintrag in das Operationsfeld bzw. Wundfeld zu minimieren.

Die narkotisierten Mäuse wurden auf eine Heizplatte, temperiert auf 37 - 38°C, transferiert, die mit einer sog. Basisplatte, Fixatoren, Elastomeren und Wundretraktoren (5 mm) versehen war. Zur Unterstützung wurde ein Operationsmikroskop (Stereomikroskop) sowie eine Videokamera zur Dokumentation arretiert.



**Abb. 2.24: Kleintierchirurgischer Arbeitsplatz.** Neben dem Basisbesteck ist eine Wärmeverrichtung mit Basisplatte, Fixatoren und Wundretraktoren zu erkennen; ferner ein Stereomikroskop sowie eine Videodokumentationsmöglichkeit.

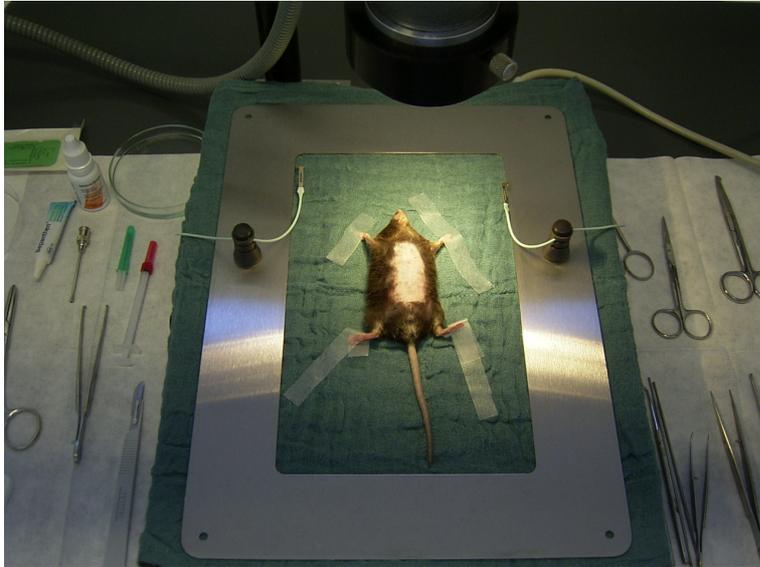
Das Implantationsprozedere beginnt mit der Scherung/Haarentfernung im Bereich des Operationsfeldes (Thorax und Abdomen, Abb. 2.25). Um die Augen (Cornea und Coniunctiva) vor Exsikkation zu schützen, wurden diese zuvor mit Bepanthensalbe<sup>®</sup> bedeckt und die Applikation bei Bedarf wiederholt.

Die vom Haarkleid befreiten Areale wurden mittels Merchuchrom<sup>®</sup> (Merbromin) oder Polyvinylpyrrolidon-Iod<sup>®</sup> (PVP-Iod, Polyvidon-Iod) desinfiziert (Abb. 2.26). Nach fünf Minuten Einwirkdauer erfolgte als erster Schritt der Implantation eine ca. 2 - 3 cm lange Inzision der Bauchhaut im Bereich der Mittellinie. Die Bauchhaut wurde mittels Pinzette oder Sonde stumpf von der Bauchwand getrennt und diese durch ein System aus Wundretractoren, Elastomeren und Fixatoren nach lateral verlegt (Abb. 2.27). Hieran schloss sich die mediale Inzision der Bauchwand (Bauchmuskulatur) im Bereich des Musculus rectus abdominis an. Eine Läsion der Bauchorgane ist hierbei strikt zu vermeiden. Vor allem (versteckte) Läsionen des Gastrointestinaltraktes können zu Darmnekrosen, Durchwanderungsperitonitis und damit letztlich zum Tod des Tieres innerhalb der ersten (meist vier) Tage post implantationem führen. Dieser Schnitt ist daher unter leichtem Anheben der Bauchdecke mittels einer Pinzette durchzuführen. Die Wundretractoren werden sodann neu arretiert, so dass sie auch die Bauchwand mit umfassen. Für den Operateur eröffnet sich sodann ein freier Blick auf den Peritonealraum: Leber (Hepar), Gallenblase (Vesica fellea sive biliaris) und Gastrointestinaltrakt (Ventriculus, Intestinum tenue und Intestinum crassum).

Der Transmitter wird aus seiner sterilen Verpackung entfernt und vorsichtig auf den Gastrointestinaltrakt platziert. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt empfiehlt es sich, den Transmitter zu fixieren. Auf der dem Operateur zugewandten Seite besitzt der Transmitter einen speziellen Steg (*suture rib*) mit drei zusätzlichen Ösen, die der Fixation mit der Bauchwand dienen (Abb. 2.28). Die exakte Positionierung des Transmitters hat sich hierbei als äußerst wichtig in Hinblick auf die postoperative Genesung erwiesen.

Wie bereits oben erwähnt, sollte bei den Versuchstieren ein Mindestalter von 10 Wochen (entspricht bei C57Bl/6 etwa einem Körpergewicht von 20 g) nicht unterschritten werden. Der Transmitter (3,9 g; 1,9 cm<sup>3</sup>) stellt in vielerlei Hinsicht eine Problemquelle dar: so kann es postoperativ z.B. zu einem paralytischen oder auch mechanischen Ileus kommen. Wird der Transmitter zu weit kranial innerhalb der Bauchhöhle platziert, kommt es zu Alterationen der Leberfunktion sowie einer möglichen Verlegung der abführenden Gallenwege; auch eine partielle bis komplette

mechanische Verlegung des Magenausganges mit massiver Dilatation (Magenüberblähung) sind während der Versuchsreihen vereinzelt beobachtet worden. Eine zu tiefe, kaudal gelegene intraabdominale Implantation wiederum kann zu Störungen der Miktion und Defäkation bis zu deren völliger Sistierung führen.



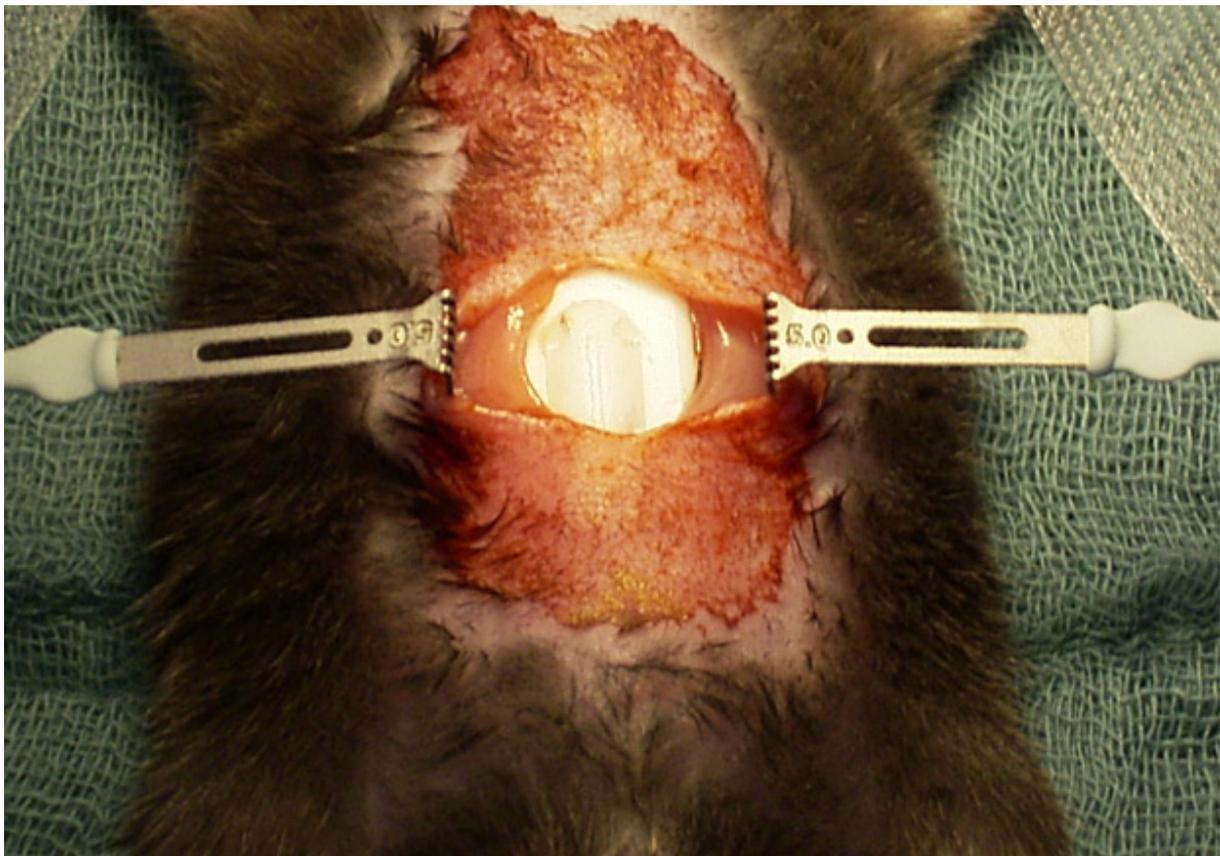
**Abb. 2.25: Haarkleidentfernung im Bereich des OP-Feldes.** Die anästhesierte Maus wurde mit einem speziell für die Kleintierchirurgie entwickelten Rasierer im Abdominalbereich enthaart. Das Tier befindet sich während des gesamten Operationsprozedere auf einer auf 37°C temperierten Wärmeplatte.



**Abb. 2.26: Desinfektion des OP-Feldes.** Die vom Haarkleid befreite Abdominal- und Thorakalregion wurde mit Mercuchrom® vorbehandelt. Nach kurzer Einwirkdauer (5 min) erfolgt mittels Längsinzision die Eröffnung der Bauchhöhle.

Die Platzierung der Ableitungselektroden (*sensing leads*) erfolgte durch subkutane Tunnelung mittels Sonde durch stumpfe Vorpräparation. Im Bereich der finalen Elektrodenposition wurden kleine Einschnitte gemacht, die subkutane Tunnelung bis dort durchgeführt und sodann ein Plastikröhrchen als Führungsrinne eingeführt. Hierdurch kann die Ableitelektrode problemlos vorgeschoben werden. Die Befestigung der Elektroden erfolgt in der sogenannten Manubrium-Xiphoid (MX)

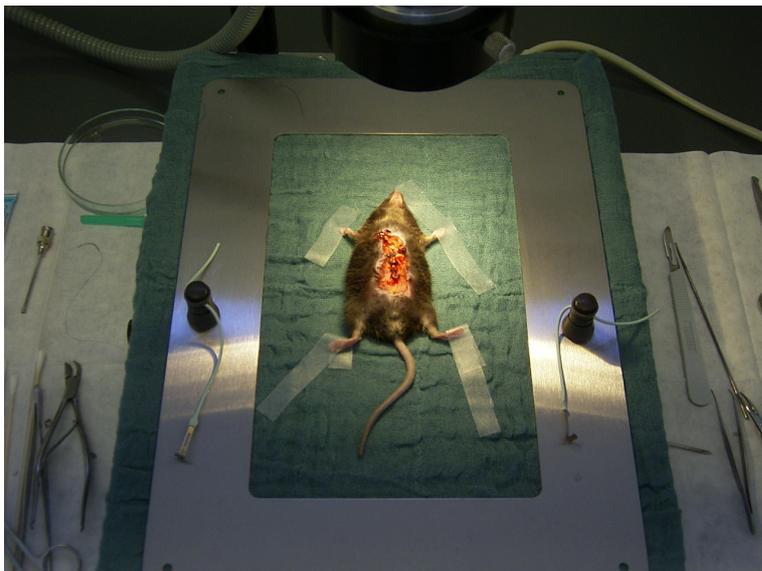
Position (Geddes et al., 1960). Hierbei wird die negative Elektrode direkt über dem Manubrium sterni (M) fixiert, die positive Elektrode über dem Processus xiphoideus (X). Die Fixierung in diesem Bereich ist schwierig, da Muskel- bzw. Bindegewebe zur Anheftung nur begrenzt zur Verfügung steht. Nachdem die Elektroden mittels Einzelknopfnahnt fixiert worden sind, muss zusätzlich eine Silikonkappe auf das Elektrodenende aufgesetzt werden, da es anderenfalls zu Irritationen an der umgebenden Muskulatur und damit zu elektromyographischer Artefaktbildung kommen könnte.



**Abb. 2.27: Intraperitoneale Implantation des Radiofrequenztransmitters.** Nach Desinfektion des OP-Areals erfolgt zunächst die Längsinzision der Bauchhaut. Beide Hautränder werden mittels Wundhaken und Elastomeren, die an Fixatoren an der Basisplatte verankert sind, zurückgehalten. Die Wundhalter erleichtern die spätere Fixation des Transmitters mittels Einzelknopfnähten erheblich. Dann erfolgt die Längseröffnung der Bauchmuskulatur mittels Schere. Die Bauchdecke muss hierbei leicht angehoben werden, um eine versehentliche Verletzung v.a. des Gastrointestinaltraktes zu vermeiden, da eine evtl. auftretende Peritonitis den Erfolg der Implantation zunichte machen würde.



**Abb. 2.28: Bauchwandnaht nach ip. Implantation.** Der implantierte Transmitter verfügt an seiner Ventralseite über einen mit drei Kanälen versehenen Steg (*suture rib*), der der Fixation an der Bauchwand dient. Eine akkurate Fixation ist notwendig, um ein Lösen oder Ausreißen der Nähte und damit eine Mobilisation des Transmitters intraabdominal zu verhindern.



**Abb. 2.29: Finales „Clippen“ der Bauchhaut.** Die Bauchnaht wird abgeschlossen durch den separaten Verschluss der Bauchhaut. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme von Wundklammern. Sie stellen für Mäuse ein größeres Hindernis als Einzelknopfnähte bei dem Versuch dar, das Wundfeld mit den Zähnen bzw. Extremitäten zu manipulieren.

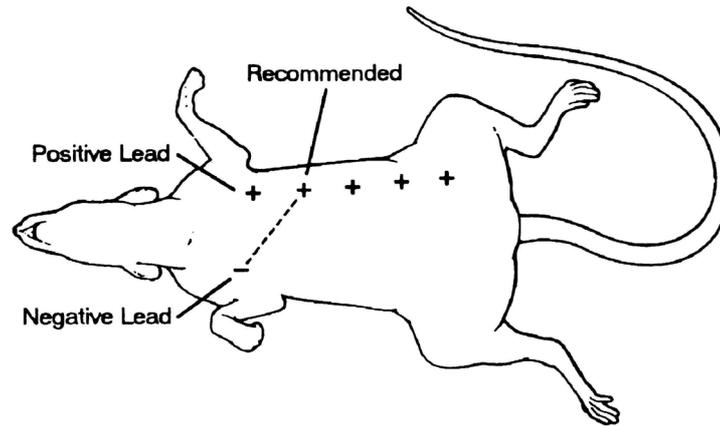
Die Haut direkt über den Elektroden wird sodann durch eine Einzelknopfnäht geschlossen. Gleiches gilt auch für die Bauchwand (Abb. 2.28). Eine Naht der Bauchhaut bietet sich bei Mäusen nicht an, da diese von den Tieren postoperativ meist aufgebissen werden. Gründe hierfür sind v.a. Fremdkörpergefühl und Pruritus im Rahmen des Wundheilungsprozesses. Ein „Klammern“ der Bauchhaut ist daher sinnvoll (Abb. 2.29). Diese Klammern müssen im Rahmen der postoperativen Erholungsphase nicht mehr entfernt werden, da sie i.d.R. im Laufe der ersten zwei bis drei Wochen nach Operation von selbst abfallen.

Die in den hier vorgestellten Versuchen angewandte MX-Ableitungstechnik ist das Resultat einer Reihe von Optimierungsprozessen. So finden sich neben der MX-Ableitungstechnik noch weitere Techniken, die z.T. mit einer Vielzahl von Nachteilen oder einem wesentlich größeren operativen Aufwand und damit auch einer höheren Belastung für das Versuchstier verbunden sind.



**Abb. 2.30: Postoperative Darstellung der Elektrodenplatzierung in der sog. MX (Manubrium-Xiphoid)-Position** (6 Wochen post implantationem). Die negative Elektrode liegt dem Manubrium sterni auf, die positive Elektrode dem Processus xiphoideus. Jede Elektrode ist zusätzlich mit einer Silikonkappe versehen, um Wundheilungsstörungen und eine Irritation der umliegenden Muskulatur zu vermeiden. Besonderes Augenmerk ist auf die Wundheilung zu richten. Die Elektroden (mit Silikonhülle) sind bindegewebig ummantelt; dennoch ist eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion nicht zu detektieren.

Im Rahmen der hier vorgestellten Experimente wurden auch Versuche mit der Eindhoven II-Ableitung durchgeführt. Hierbei wird die negative Elektrode direkt über dem Musculus pectoralis major im Bereich der rechten Axilla platziert, während die positive Elektrode direkt über dem Apex cordis, 5 mm links-lateral des Processus xiphoideus angebracht wird. Beide Elektroden liegen damit unmittelbar der Muskulatur auf, die Ableitung ist daher anfälliger für elektromyographische (EMG) Artefakte.



**Abb. 2.31: Schematische Darstellung einer Eindhoven II-Ableitung bei der Maus.** In der gängigerweise in der Literatur beschriebenen Empfehlung wird die positive Elektrode direkt über dem Apex cordis (Herzspitze) angebracht. Auch andere Positionen sind möglich und können mit Änderungen der Amplituden einhergehen.

### **2.9.3.3. Postoperative Behandlung**

Die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit durchgeführten Implantationen erfolgten an ca. 12 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen mit einem Durchschnittsgewicht von 23,3 g in der Kontroll-Fraktion sowie 26,5 g bei  $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen. Risikoparameter bei der intraperitonealen Implantation wurden bereits weiter oben detailliert erörtert. Im Rahmen des postoperativen Aggressionsstoffwechsels und der Wundheilung kommt es in den ersten vier Tagen post operationem zu einem starken Abfall des Körpergewichts (Abb. 4.14). In diesem kritischen Zeitraum ist eine externe Wärmezufuhr mittels Heizplatte zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zwingend notwendig. Kurzzeitige Messungen innerhalb der ersten vier Tage auf den Empfängerplatten zeigten einen drastischen Abfall der Körperkerntemperatur schon innerhalb weniger Minuten nach Entzug der Wärmezufuhr, bedingt u.a. durch ein großes und damit ungünstiges Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpervolumen. Normalerweise erlangen die Versuchstiere bei einer Ketamin/Xylazin-Dosis von (100 / 10 mg/kg Körpergewicht) innerhalb von 2 - 3 Stunden wieder das Bewusstsein. In den folgenden Stunden ist die Nahrungsaufnahme und v.a. die Wasseraufnahme stark eingeschränkt. Aufgrund der Tatsache, dass es auch über die Wundflächen/offene Bauchhöhle zu Wasserverlusten (Perspiratio insensibilis) kommt, erfolgte kurz nach dem Wundverschluss die intraperitoneale Injektion von 300  $\mu$ l Ringer-Lösung, die zusätzlich mit Novalgin<sup>®</sup> (Metamizol) in einer finalen

Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht versetzt wurde. Die Metamizol-Administration wurde, abhängig vom Erholungszustand des Tieres für 2 - 3 Tage weiter fortgeführt. Prinzipiell ist auch die Verabreichung von Tramadol (Tramal<sup>®</sup>) denkbar, dass in Tropfenform auf die Zunge appliziert oder auch dem Trinkwasser zugesetzt werden kann. Da die Mäuse aber zunächst Schwierigkeiten mit der Trinkwasseraufnahme haben und die tropfenweise Verabreichung hinsichtlich Dosierung schwierig ist, wurde die postoperative Schmerztherapie mittels Novalgin<sup>®</sup> (Metamizol) durchgeführt.

In vielen Fällen wird zur Vorbeugung entzündlicher Prozesse eine systemische Antibiose empfohlen. Diese wurde in den vorliegenden Versuchen nicht durchgeführt. Entzündungen der Wundränder und Nahtstellen sowie Ausbildung von Abszessen (Eiteransammlungen in nicht präformierten Körperhöhlen) oder Empyemen (Eiteransammlungen in präformierten Körperhöhlen) wurden in keinem Falle bei der postmortalen Sektio gefunden. Auch Serome (in nicht präformierten Körperhöhlen, nicht-infektiöser Genese) wurden im Verlaufe der Experimente in keinem Fall detektiert.

Eine wesentliche Reduktion der postoperativen Erholungszeit ließ sich durch die subkutane *Pouch*-Implantation des Radiofrequenztransmitters erzielen. Bereits ein bis zwei Tage nach Implantation zeigten die Versuchstiere ein fast normales Verhaltensrepertoire. Kein Tier verstarb während der postoperativen Erholungsphase.



**Abb. 2.32: Operationsfeld 6 Wochen post implantationem.** Das hohe Regenerationspotential der Versuchstiere zeigt sich hier deutlich. Das ehemalige Operationsfeld im Thorakal- und Abdominalbereich haart wieder zu. Die Wundclips zum Verschluss der Bauchhaut sind bereits abgefallen.

#### **2.9.3.4. Wiederverwendung der TA10ETA-F20-Transmitter**

Die verwendeten Transmitter können nach jeder Implantation erneut implantiert werden. Zu diesem Zweck müssen sie von adhärierendem Gewebe (vornehmlich

Bindegewebe, Blut etc.) befreit und anschließend resterilisiert werden. Das Entfernen von Bindegewebe erfolgte durch Inkubation in enzymatischer Verdauung (Medizyme<sup>®</sup>) über Nacht, die Resterilisation in 2 % Glutaraldehyd ebenfalls über Nacht bzw. bei einer Inkubationsdauer von mindestens 12 Stunden.

#### **2.9.3.5. Pharmakologische Injektionsexperimente**

Telemetrische EKG-Aufzeichnungen wurden täglich post implantationem für bis zu 1 h durchgeführt, sowie 24 h-Aufzeichnungen am Tag 7 sowie Tag 14 nach Implantation. Zusätzlich wurden eine Reihe von Injektionsexperimenten durchgeführt, die Aufschluss über mögliche Alterationen in der kardiovaskulären Kontrolle, v.a. durch das autonome Nervensystem, geben sollten.

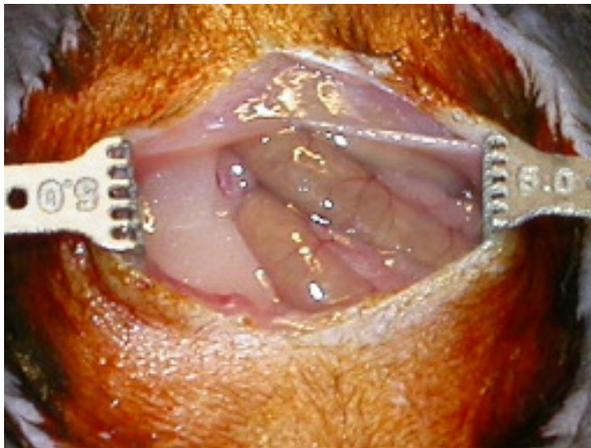
Das Herz ist in seinen Funktionsparametern in Grenzen extrinsisch, d.h. autonom und hormonell modulierbar. Funktionsänderungen können sich auf unterschiedlichen Ebenen abspielen, z.B. im Bereich der Chronotropie, Dromotropie, Inotropie, Bathmotropie und Lusitropie. Das Herz verfügt zum einen über autoregulatorische Mechanismen, in deren Rahmen eine Modulation dieser Eigenschaften erfolgen kann. Neben diesen intrinsischen Eigenschaften sind es aber gerade extrinsische Faktoren, wie z.B. das autonome Nervensystem mit seinem sympathischen und parasympathischen Ast, der Elektrolytstatus und endokrine Komponenten, die eine optimale Adaptation der kardiovaskulären Gesamtsituation an physiologische Notwendigkeiten gewährleisten.

Um den kardiovaskulären Phänotyp  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse näher zu charakterisieren, wurden daher mit pharmakologischen Mitteln modulatorische Eingriffe in das autonome Nervensystem vollzogen. Ein wichtiges Experiment in diesem Zusammenhang ist die autonome Denervation mittels Atropin (1 mg/kg Körpergewicht) und Propranolol (20 mg/kg Körpergewicht). Durch diesen pharmakologischen autonomen Block ist es möglich, qualitative und quantitative intrinsische kardiale Versuchstierparameter zu eruieren und den Beitrag des autonomen Nervensystems in Hinblick auf den beobachteten Phänotyp zu erfassen. Zusätzlich wurden Experimente zur selektiven Ausschaltung des Sympathikus durch systemische Administration von Propranolol (20 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Isoproterenolinjektionen (2 mg/kg Körpergewicht) sollten das Verhalten der Tiere unter hohem sympathischem Stress dokumentieren.

Um die Funktionsfähigkeit des Barorezeptorreflexes beurteilen zu können, schlossen sich Injektionen mittels Methoxamin (6 mg/kg Körpergewicht) an. Methoxamin führt post iniectionem zu einer Vasokonstriktion mit nachfolgender Hypertension, in dessen Verlauf es zu einer Aktivierung des Barorezeptorreflexes und über Aktivierung des parasympathischen und Deaktivierung des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems zu einer Herzfrequenzabnahme kommt.

#### **2.9.4. Telemetrische Erfassung elektroenzephalographischer (EEG) Signale bei Mäusen**

Neben der telemetrischen Erfassung von Elektrokardiogrammen an  $Ca_v2.3(+|+)$  und  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen, wurden auch entsprechende Versuche zur Aufzeichnung von Elektroenzephalogrammen durchgeführt und dieses Verfahren im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die Implantation des Radiofrequenztransmitters wird auf die gleiche Weise vollzogen, wie dies auch für das EKG weiter oben ausgeführt worden ist. Auf einige wichtige abweichende Aspekte des EEG-Implantationsverfahrens wird im Folgenden genauer eingegangen.



**Abb. 2.33: Eröffnung der Bauchhöhle zur Einführung des Radiofrequenztransmitters.** Wundhaken (Retraktoren) erleichtern das Einbringen des Transmitters und bieten eine direkte Ansicht des Gastrointestinaltraktes.

##### **2.9.4.1. Versuchstiere und Haltung**

Im Rahmen der Etablierung der telemetrischen Erfassung elektroenzephalographischer Signale kamen männliche C57Bl/6 Mäuse zum Einsatz mit einem Körpergewicht von 22,3 g bis 31,2 g. Allen Versuchstieren wurde eine Eingewöhnungsphase von einem Tag an die veränderten Räumlichkeiten gewährt. Die Haltung erfolgte, wie auch bei den EKG-Tieren in Makrolon Typ II Käfigen. Alle Aufnahmen wurden bei 20 - 22°C unter konventionellem Licht-Dunkel-Zyklus durchgeführt.

##### **2.9.4.2. Intraperitoneale Implantation**

Das Implantationsprozedere unterscheidet sich zunächst nicht von dem der EKG-Implantation (Abb. 2.25 - 2.29). Nach Einführen des TA10ETA-F20 Transmitters wird dieser mit der Bauchwand vernäht, diese geschlossen und die Bauchhaut mittels Wundclips verschlossen. Anders als beim EKG ist die Verlegung der Elektroden mit

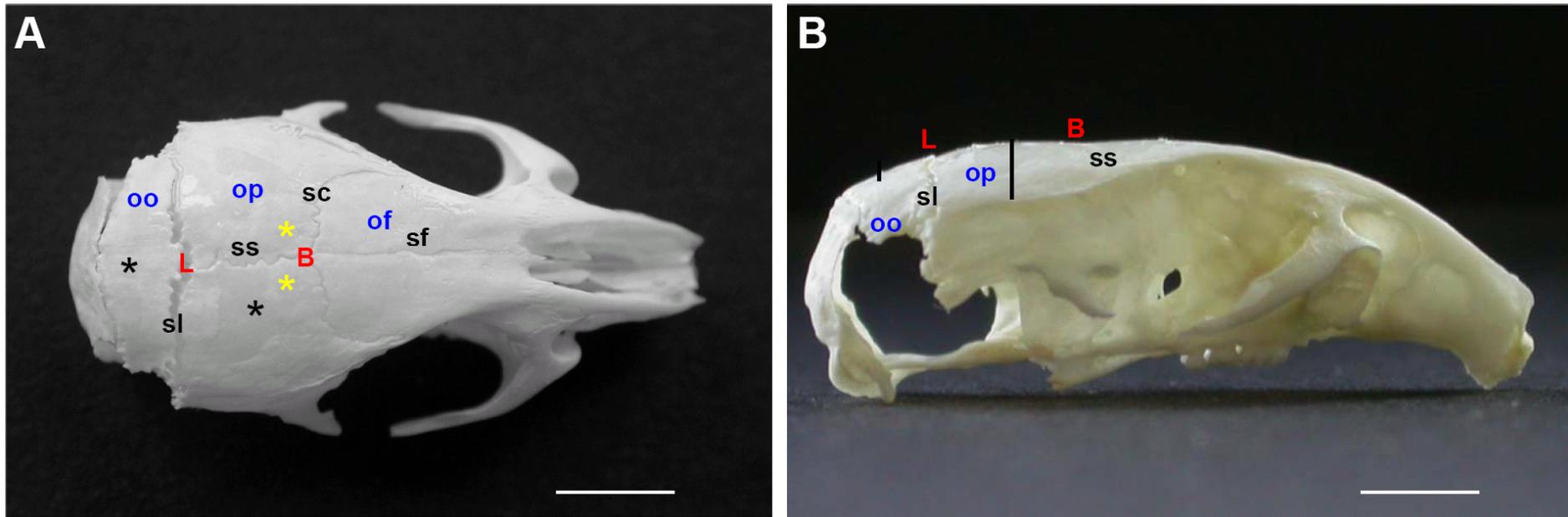
größeren Aufwand verbunden. Mittels einer Sonde wird eine subkutane Tunnelung durchgeführt, in deren Verlauf beide Elektroden zum Nacken hindurchgezogen werden (Abb. 2.35). In diesem Falle bietet es sich an, bereits zuvor eine longitudinale Inszision der Kopfhaut/Kopfschwarte (Galea aponeurotica) von 1 - 1,5 cm durchzuführen. Anschließend muss die Schädelkalotte (Calvaria) von überschüssigem Gewebe befreit werden. Dies geschieht aus zweierlei Gründen. Der für die Fixation der Elektroden verwendete Zahnzement (Glasionomer-Zement) ist zwar von hoher Festigkeit, braucht aber auch eine poröse Oberfläche für eine feste und sichere Fixierung der Elektroden. Weiterhin ist offenliegendes Gewebe eine potentielle Infektionsquelle beim späteren Bohren der Elektrodenimplantationslöcher. Die Entfernung des Bindegewebes erfolgt mittels 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das darüber hinaus zu einem Ausbleichen der Schädelkalotte führt. Allerdings kann auch verdünnte Phosphorsäure hierfür verwendet werden. Positiver Nebeneffekt ist, dass die anatomischen Schlüsselstrukturen, wie Sutura coronalis, Sutura sagittalis und Sutura lambdoidea neben den bedeutsamen kraniometrischen Punkten Bregma und Lambda deutlich zur Geltung kommen (Abb. 2.34). Das Bohren der Löcher zur Einführung der Elektroden machte die Entwicklung eines speziellen modifizierten Stereotakten erforderlich (Abb. 2.36). Neben größenadaptierten Zahnhalter zur Aufnahme der Dentes incisivi, Nasenklammer und Ohrhaltern, wurde ein elektrischer Präzisions-Dentalbohrer auf einem 3-Achsen-Mikromanipulator arretiert. Dies gewährleistet die stereotaktisch präzise Durchführung der Bohrungen, wobei Bohrköpfe mit einem Durchmesser von 0,7 mm verwendet wurden.

Abhängig vom experimentellen Ansatz hat es sich als sinnvoll erwiesen, die Ohrhalter (*ear bars*) mit Baumwolle zu versehen, um eine Verletzung der Membrana tympani sowie des Mittelohres (Auris media) zu vermeiden. Vor allem bei der Untersuchung audiogener Anfallsleiden kann dies von entscheidender Bedeutung sein. Weiterhin ist es notwendig, die Bohrung der Calvaria bei maximaler Umdrehungszahl durchzuführen. Im Gegensatz zum Rattenschädel ist der Mausschädel auch beim adulten Tier relativ weich und damit verformbar. Schlechte Bohrkopfqualität und geringe Umdrehungszahlen des Bohrers führen dann zu einer Applanation der Schädelkalotte beim Absenken, so dass der Bohrer schließlich „durchbricht“ und es zu größeren Verletzungen des Kortex mit Einblutungen kommen kann. Allerdings besteht bei hoher Drehzahl die Gefahr einer exzessiven

Wärmeentwicklung. Genaue Erkenntnisse hierzu liegen für Mäuse und Ratten aber nicht vor.

#### **2.9.4.3. Subkutane Pouch-Implantation**

Die intraperitoneale Implantation des Radiofrequenztransmitters hat sich im Rahmen der Versuche als zuverlässiges Verfahren herausgestellt. Weder kam es nach Eröffnung der Bauchhöhle intraperitoneal zu Infektionen (Peritonitis), noch trat im postoperativen Verlauf eine Mobilisation des Transmitters auf. Die Nahtfixation in der Bauchmuskulatur hat sich als äußerst stabil herausgestellt. Eine weitere Möglichkeit der Transmitterimplantation stellt die subkutane *Pouch*-Implantation dar. Es zeigte sich, dass die postoperative Erholungsdauer bei *Pouch*-implantierten im Gegensatz zu intraperitoneal implantierten Tieren erheblich verkürzt ist. Bei der *Pouch*-Implantation lässt sich der Transmitter über eine kleine, bis zu 1 cm lange Hautinzision in eine vorher mittels Sonde und subkutane Spreizung geformte Tasche einbringen. Unter praktischen Gesichtspunkten gestaltet sich die Fixation des Transmitters schwierig und die gesetzten Nähte tendieren dazu, nach wenigen Wochen auszureissen. Die daraufhin einsetzende subkutane Wanderung des Transmitters kann zu Zugwirkung an den implantierten Elektroden und evtl. zum Ausreissen derselben führen.



**Abb. 2.34: Anatomie des Mausschädels und kranio-metrische Punkte.** A) Präparierter, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelter Mausschädel in Dorsalansicht mit Darstellung der Calvaria mit Os frontale (of), Os parietale (Op) und Os occipitale (oo), abgegrenzt durch die Sutura frontalis (sf), die Sutura sagittalis (ss), Sutura coronalis (sc) sowie die Sutura lambdoidea (sl). Deutlich sind die kranio-metrischen Punkte Lambda (L, Kreuzungspunkt der Lambda- und Sagittalnaht) sowie Bregma (B, Kreuzungspunkt der Sagittal- und Coronarnaht) zu erkennen. Die schwarzen Markierungen (\*) zeigen den Implantationsort für die tiefe Elektrodenimplantation an, die gelben Markierungen (\*) die für die oberflächliche Implantation. B) Lateralansicht des Mausschädels. Die vertikalen Balken spiegeln die Lokalisation und Eindringtiefe der intrazerebralen Elektroden wider. Massstabsbalken: 4 mm.

#### **2.9.4.4. Elektrokortikogramm (ECoG) – Oberflächenelektroden**

Die Implantation von Oberflächenelektroden gestaltet sich i.d.R. einfacher als die tiefer Elektroden (s.u.). Nach erfolgreichem Bohren wurden die Elektrodenenden im 180°-Winkel gebogen und epidural in folgenden Positionen fixiert: (+)-Elektrode: Bregma: -1 mm, mediolateral (rechte Hemisphäre): 1 mm; (-)-Elektrode: Bregma: -1 mm, mediolateral (linke Hemisphäre): 1 mm. Hieran schloss sich die Fixation der Elektroden mit Glas-Ionomerzement an. Die Kopfhaut wird sodann mit Einzelknopfnähten (Ethilon, 6-0) verschlossen. Eine Verletzung von venösen Sinus ist unbedingt zu vermeiden, da es sonst zu massiven Blutungen kommen kann, die den Exitus des Tieres zur Folge haben können. Da der Mausschädel aber recht dünn und transparent ist, sind größere Sinus und Meningealarterien bei der Inspektion sichtbar und können so bei stereotaktischen Bohrungen geschont werden.

#### **2.9.4.5. Tiefe intrazerebrale (intrahippokampale) Ableitungen**

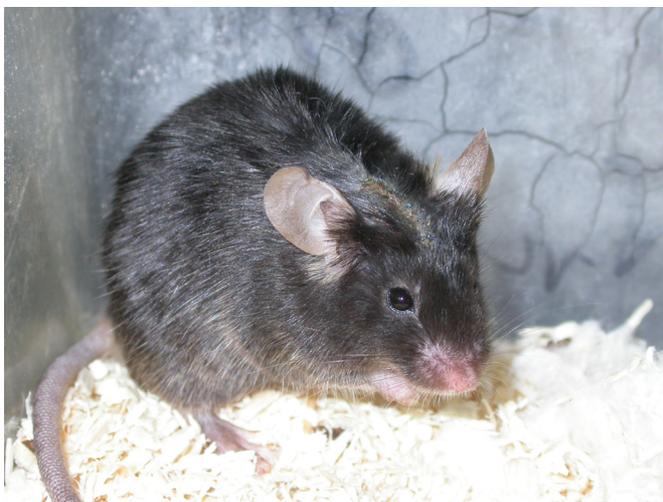
Zum Einsatz tiefer Elektroden wurden die helikalen Drähte um 90° abgewinkelt und dann senkrecht in die Zielregion eingesetzt, bei unseren Versuchen im Hippokampus (CA3-Region). Die positive Elektrode wurde wie folgt positioniert: Bregma: -2 mm, mediolateral (rechte Hemisphäre): 2 mm, dorsoventral (Eindringtiefe): 2 mm. Die Referenzelektrode liegt direkt über dem Cerebellum (Bregma: -6.2 mm, mediolateral: 0 mm, dorsoventral: 0 mm). Eine Verletzung der venösen Blutleiter ist in der angegebenen Position nicht zu erwarten.



**Abb. 2.35: EEG-Telemetrie - Dorsalansicht des Schädels nach Längsinzision der Kopfhaut.** Dorsalansicht der Schädelkalotte. Die Suturen (Sutura frontalis, Sutura coronalis, Sutura sagittalis, Sutura lambdoidea) sowie die kraniometrischen Punkte Bregma und Lambda sind zu diesem Zeitpunkt nur undeutlich zu erkennen.



**Abb. 2.36: Modifizierter stereotaktischer Rahmen für die oberflächliche und tiefe Implantation von EEG-Elektroden.** Eine ringförmige, modifizierte Öse dient der Fixation der Dentis incisivi. Die Nasenklemme (*nose clamp*) wurde den Größenverhältnissen der Maus angepasst. Die Ohrenhalter (*ear bars*) entsprechen Standardgröße, wurden aber mit Watte gepolstert, um eine Verletzung des Mittel- und Innenohres zu vermeiden. Die Ohrenhalter dürfen mit einem Anpressdruck von nur wenigen Gramm positioniert werden, da selbst der adulte Mausschädel sehr fragil ist und es bei zu hohem Druck darüber hinaus zu massiven Alterationen der Respiration kommen kann.

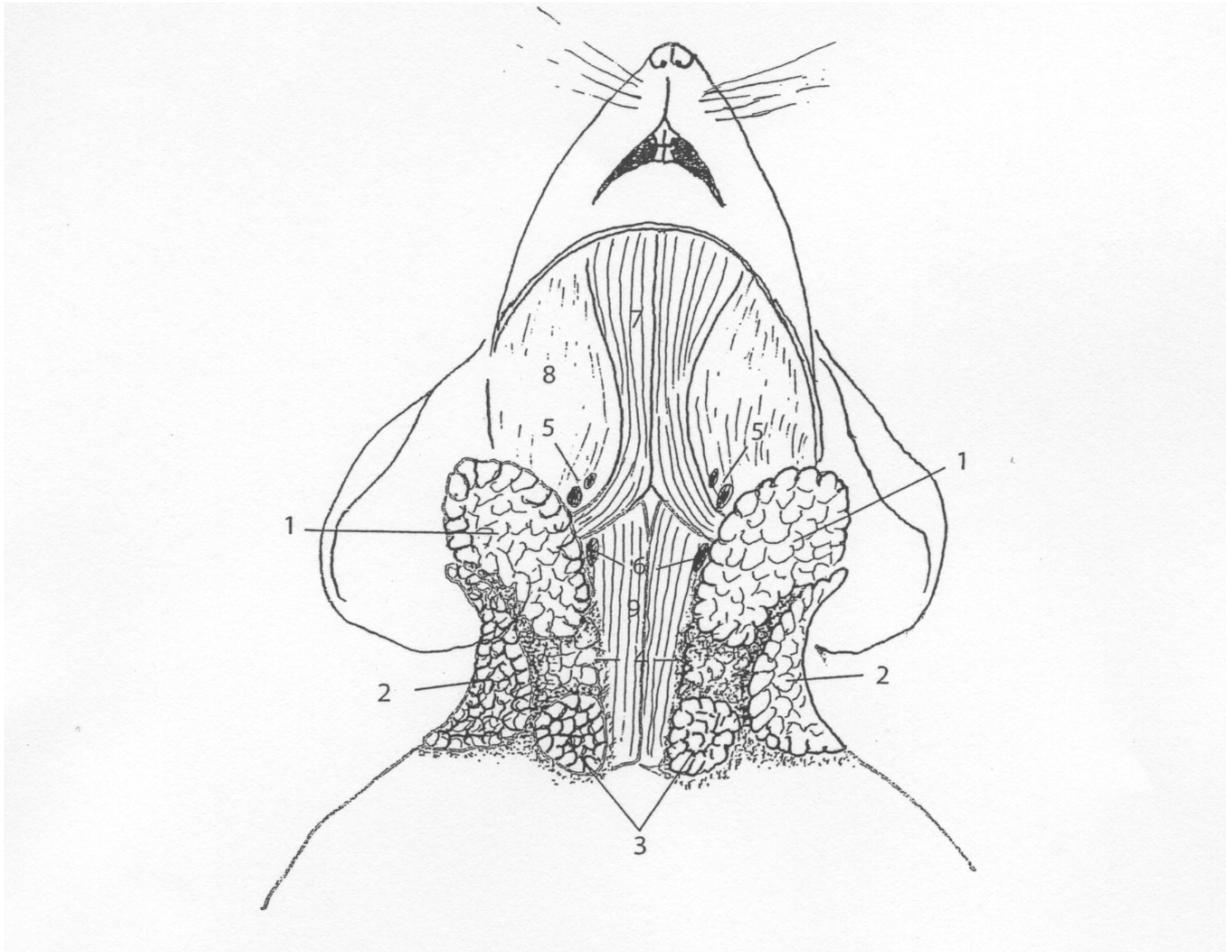


**Abb. 2.37: Postoperative Wundheilung nach EEG-Elektrodenimplantation.** Zwei Wochen nach Implantation ist die Kopfhautnaht gut verheilt. Der TA10ETA-F20-Transmitter wurde intraperitoneal implantiert. Die operierten Tiere zeigen ihr komplettes physiologisches Verhaltensrepertoire.

### **2.9.5. Jugularvenenkatheterisierung der Maus**

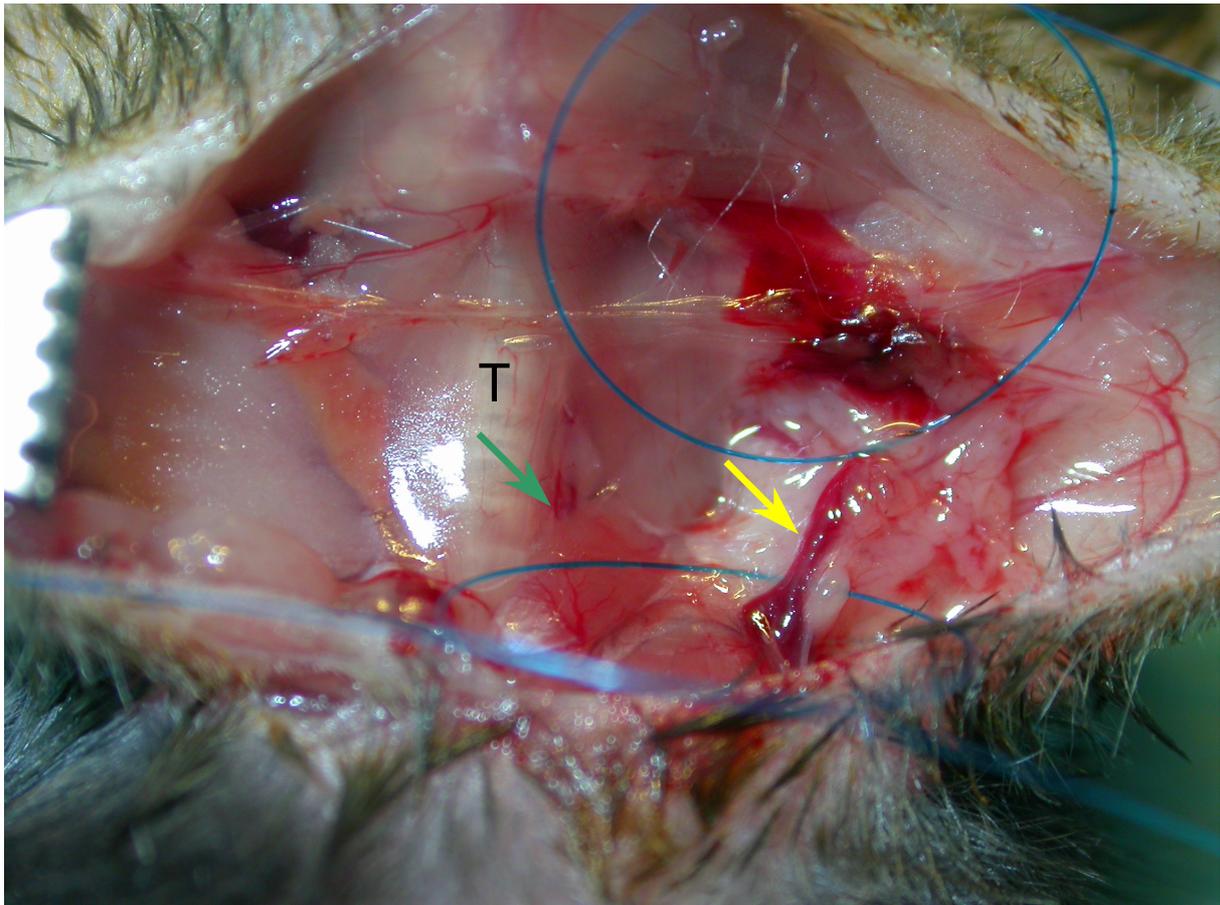
Die Jugularvenenkatheterisierung bei der Maus stellt ein chirurgisch anspruchsvolles Unterfangen dar. Das präoperative Prozedere orientiert sich stark an der intraabdominalen Implantation des Radiofrequenztransmitters zur Aufnahme von Elektrokardiogrammen. Die Tiere wurden präoperativ zunächst gewogen und dann mittels ip. Administration von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) narkotisiert. Die Verwendung eines geeigneten Anästhetikums bzw. einer adäquaten Anästhetikakombination ist generell von der experimentellen Fragestellung abhängig. Xylazin kann z.B. neben einer Atemdepression auch zu einem deutlichen Abfall der Herzfrequenz führen. Um massive Interaktionen mit dem kardiovaskulären System zu vermeiden, wurde daher auch Pentobarbital in Konzentrationen von 33 - 70 mg/kg Körpergewicht verwendet. Anschließend wurde das zervikale Feld mit 70 % Ethanol benetzt und durch einen ca. 1,5 cm langen Medianschnitt die Zervikalregion eröffnet. Dies muss äußerst vorsichtig geschehen, da die Vena jugularis sehr oberflächlich lokalisiert ist (Abb. 2.39 - 2.41). Generell ist die Operation im Halsbereich mit einer Vielzahl von Komplikationen vergesellschaftet. Neben der Möglichkeit der Beschädigung von Gefäßen, ist es vor allem die Manipulation im Bereich der Karotis sowie des innerhalb der Vagina carotica gelegenen Nervus vagus, die kardiovaskuläre Reaktionen nach sich zieht. So führen präparationsbedingte Druckerhöhungen sowie tangentialer Zug an der Karotis wie auch dem Nervus vagus über eine Aktivierung von Barorezeptoren und damit den Barorezeptorreflex/Pressorrezeptorenreflex sowie auch direkt über Vagusaktivierung zu einer massiven Abnahme der Herzfrequenz. Der mediane Zugang zur Vena jugularis ist dem lateralen Zugang vorzuziehen, da bei letzterem die Gefahr der direkten Verletzung der Vena jugularis besteht. Ein einmal läsioniertes Gefäß ist nicht mehr katheterisierbar.

Die Vena jugularis wird zunächst mit einem 6-0 Faden (Ethilon II) distal, d.h. herzfern abgebunden; proximal wird eine Schlaufe mit 6-0 Faden vorgelegt, aber nicht komplett zugezogen. Sie soll nach erfolgreicher Katheterisierung der Fixierung des eingeführten Schlauches dienen. Als Führungsrinne für den Polyethylenschlauch fungiert eine Kanüle, deren scharfes Ende geringgradig nach außen gebogen worden ist. Dies ermöglicht die Eröffnung des Gefäßes und die gleichzeitige Einführung des Katheters (Abb. 2.41).



**Abb. 2.38: Schematische Darstellung der Ventralansicht auf die eröffnete Cervicalregion.** 1. Glandula submandibularis, 2. Glandula parotidea, 3. Pars cervicalis thymi, 4. Glandula sublingualis, 5. Nodi lymphatici mandibulares, 6. Nodus lymphaticus retropharyngeus lateralis, 7. M. digastricus, 8. M. masseter, 9. M. sternohyoideus et M. sternothyroideus (Hedrich, 2004).

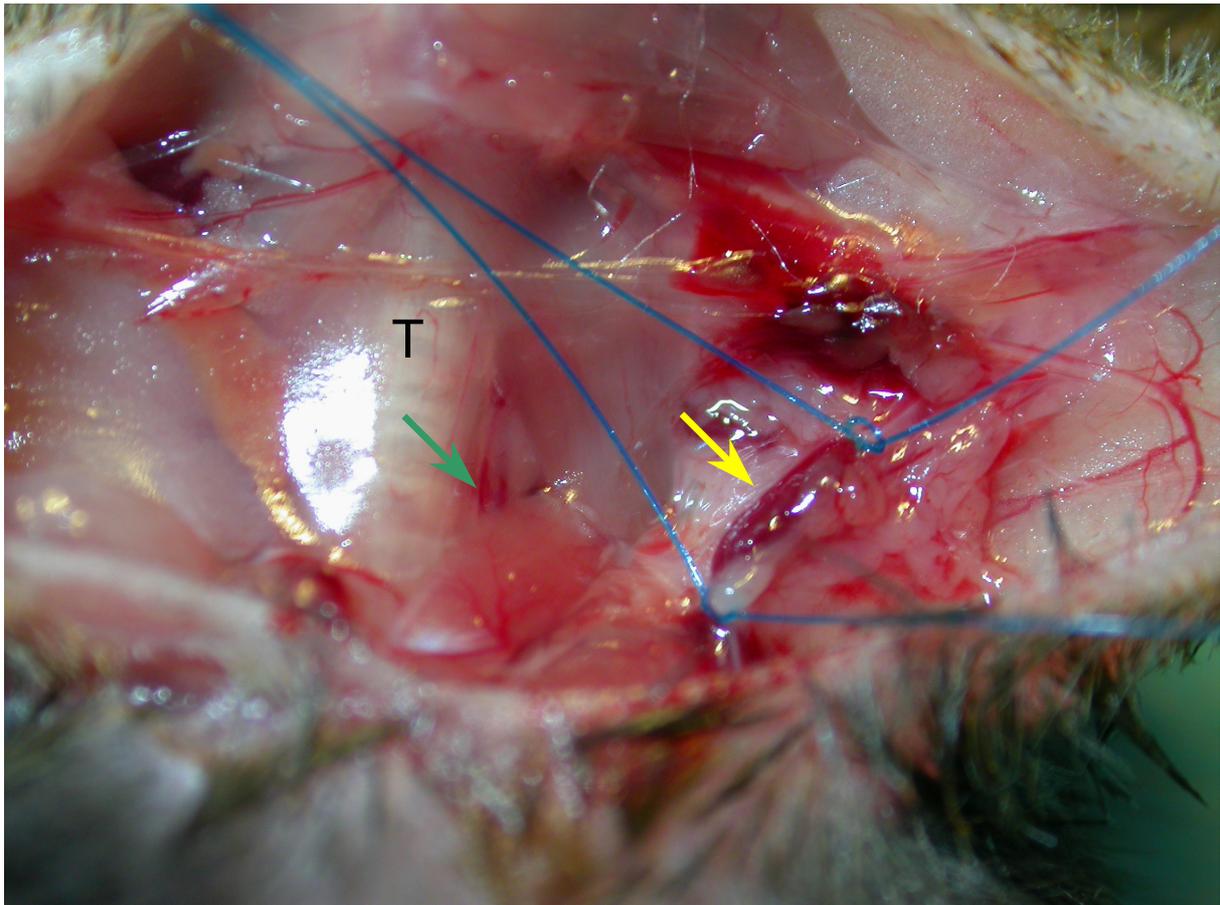
Nach Einführen des Katheters wird dieser mit der proximalen Schlaufe fixiert. Beim Einführen muss darauf geachtet werden, dass die dünnwandige Vene nicht durchstoßen wird. Weiterhin neigt das recht große Operationsfeld zur Exsikkation. Dies kann auch das katheterisierte Gefäß betreffen, wodurch die Gefäßwand nekrotisch und brüchig werden kann. Vielfach wird eine vorherige Heparinisierung des Versuchstieres empfohlen. Bei Implantation eines Langzeit-Jugularvenenkatheters hat sich dies als sinnvoll herausgestellt. Für die temporäre Anlage eines Jugularvenenkatheters wurde allerdings auf eine Heparinisierung verzichtet.



**Abb. 2.39: Jugularvenenkatheterisierung der Maus (I).** Das eröffnete zervikale Operationsfeld in Nahaufnahme. Zentral ist die Trachea (T) sowie die Arteria carotis dextra (grüner Pfeil) erkennbar. Deutlich ist die gefüllte Vena jugularis zu sehen (gelber Pfeil); proximal und distal sind bereits Schlaufen (Ethilon 6-0) um das Gefäß gelegt. Das Operationsfeld wurde zuvor mit 70 % Ethanol benetzt, anschließend durch einen ca. 1,5 cm langen Medianschnitt eröffnet und durch Wundhaken (Wundretractoren) offengehalten.

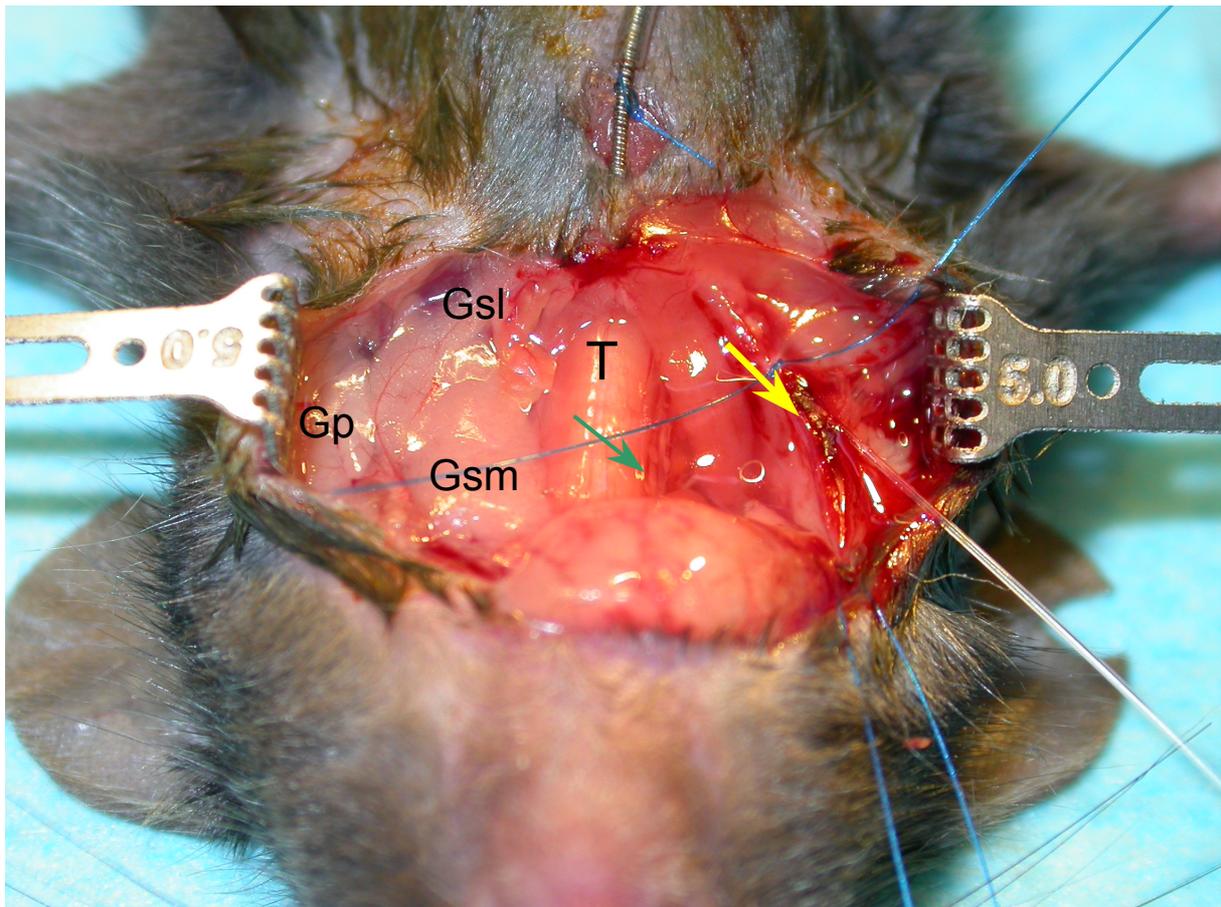
Um das Operationsfeld vor Exsikkation zu schützen, wurde in kurzen Abständen die freie Operationsfläche mit physiologischer (0,9 %iger) Kochsalzlösung benetzt. Ziel des operativen Vorgehens ist es, das EKG unter gleichzeitiger Infusion von Testsubstanzen aufzuzeichnen.

Da die Aufzeichnung nur temporären Charakter hat, ist eine intraperitoneale Implantation des Radiofrequenztransmitters nicht notwendig. Daher wurden die Elektroden nur oberflächlich in MX-Position fixiert, der Transmitter selbst aber nicht implantiert, sondern isoliert auf die Empfängerplatte zur EKG-Aufzeichnung platziert.



**Abb. 2.40: Jugularvenenkatheterisierung der Maus (II).** Nach distaler Ligatur der Vena jugularis (gelber Pfeil) wird proximal nur eine inkomplette Ligatur durchgeführt, da die eingeführte Kanüle mit der proximalen Schlaufe im Gefäß fixiert werden soll (grüner Pfeil: Arteria carotis dextra).

Für das gesamte Operationsprozedere ist von zentraler Bedeutung, dass weder Luft in die Vena jugularis eindringt (Gefahr der Embolie) noch im Schlauchsystem vorliegt. Die Infusion der Testsubstanzen nach erfolgreicher Kanülierung erfolgte unter Zuhilfenahme einer Hamilton-Pipette (20  $\mu$ l). Ein Perfusor wurde nicht verwendet. Die Applikation erfolgte im Bolus.



**Abb. 2.41: Operationsfeld nach erfolgreicher Katheterisierung der Vena jugularis.** Der Katheter ist in die Vena jugularis (gelber Pfeil) eingebracht und mittels Nahtmaterial fixiert. Um ein Austrocknen des Operationsfeldes zu verhindern, ist in Abständen ein Benetzen mit 0,9 %iger NaCl- oder Ringer-Lösung erforderlich. Weiterhin ist die Trachea (T), die Arteria carotis dextra (grüner Pfeil), sowie die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis, Gsm), die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotidea, Gp) und die Unterzungenspeicheldrüse (Glandula sublingualis, Gsl) erkennbar.

#### **2.9.5.1. Injektion physiologischer Kochsalzlösung**

Wie bereits oben erwähnt erfolgt die Applikation der Testsubstanzen in Bolusform; damit ist bei einem Blutvolumen der Maus von 76 - 80 ml/kg Körpergewicht das Injektionsvolumen aus hämodynamischen Gründen limitiert und wurde mit einem Maximum von 20  $\mu$ l angesetzt. Die Analyse der Herzfrequenz nach Bolusinjektion von 20  $\mu$ l 0,9 %iger NaCl-Lösung ergab einen Anstieg der Herzfrequenz (siehe Ergebnisteil). Dies ist u.a. auf eine akute Volumenbelastung des Herzens zurückzuführen, wodurch es über den Frank-Starling-Mechanismus zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (nicht messbar im vorliegenden Ansatz) sowie zu einer Erhöhung der Herzfrequenz kommt.

### 2.9.5.2. Injektionsexperimente mit Isoproterenol

Um die Funktionstüchtigkeit der beschriebenen Jugularvenenkatheterisierung zu überprüfen, wurden Testinjektionen mit Isoproterenol durchgeführt. Wie im Ergebnisteil dargestellt, führt die systemische Administration von 2 mg/kg Körpergewicht zu einem instantanen und rapiden Anstieg der Herzfrequenz und unterstreicht damit die korrekte Platzierung des Katheters in der Vena jugularis.

### 2.9.5.3. Injektionsexperimente mit SNX-482

Taranteln, eine Gattung der Wolfspinnen, sind durch einen braun, beige und schwarz gemusterten Körper gekennzeichnet. Ihr Giftbiss ist für den Menschen zwar schmerzhaft, jedoch nicht gefährlich. Aus dem Venom dieser Tiere wurde das Peptidtoxin SNX-482 mit einer Ausbeute von 0,1 - 0,2 nmol/µl isoliert (Molekulargewicht 4495 Dalton). Seine Primärsequenz (Newcomb et al., 1998) weist ein regelmäßiges Mustern von Cystein-Seitenresten auf (C-C-CC-C-C) wie es auch in Conotoxinen von Meeresschnecken gefunden wird (Abb. 2.42). Obwohl es in Konzentrationsbereichen über 500 nM auch mit anderen hochspannungsaktivierten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen interagiert (Newcomb et al., 1998; Bourinet et al., 2001), wird es als der derzeit brauchbarste Antagonist für Ca<sub>v</sub>2.3-haltige R-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle verwendet (Sochivko et al., 2002).

Das aus der Tarantel *Hysteroocrates gigas* gewonnene Toxin SNX-482 wurde zu Injektionszwecken bei Kontroll-Mäusen verwendet, um zu eruieren, ob die Administration zu einem vergleichbaren kardialen Phänotyp führt, wie bei Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mäusen. Als Verteilungsvolumen wurde das Intravasalvolumen angenommen und SNX-482 in einem 20 µl Bolus, entsprechend einer finalen intravasalen Konzentration von 100 nM bzw. 200 nM, injiziert.

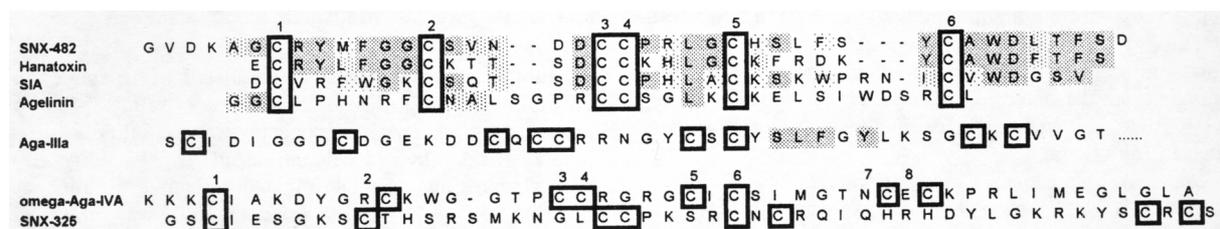
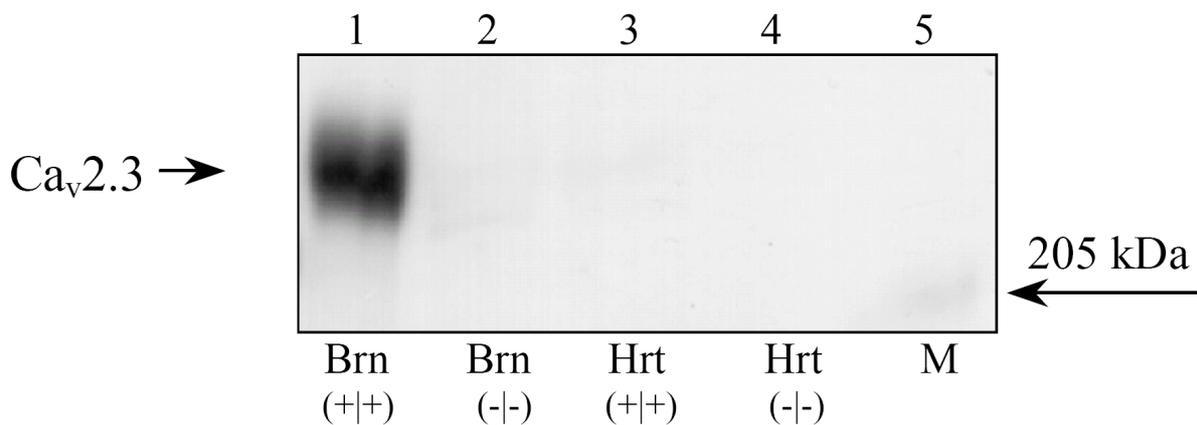


Abb. 2.42: Strukturvergleich des Peptidtoxins SNX-482 mit anderen Toxinen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Detektion von $Ca_v2.3$ im Herzen auf Proteinebene

Um zu eruieren, ob  $Ca_v2.3$  auch auf Proteinebene detektiert werden kann, wurden Mikrosomen aus dem Grosshirn und Herzen von Kontrolltieren sowie  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen isoliert. Wie Abb. 3.1 zeigt, fand sich in den Cerebrum-Proben der Kontrollpopulation eine eindeutige positive Reaktion (Spur 1) im Gegensatz zu der entsprechenden  $Ca_v2.3(-/-)$ -Probe (Spur 2). Im Kontrollherzen gelang der Nachweis von  $Ca_v2.3$  jedoch nicht (Spur 3), was nahelegt, dass sich die Proteinexpression in adulten Kontrollherzen der Maus offensichtlich unterhalb des Detektionsniveaus des *Semi-dry Western-Blot* Verfahrens befindet. In Rattenherzen hingegen ist der Nachweis von  $Ca_v2.3$  auf Proteinebene im *Western-Blot* gelungen (Weiergräber et al., 2000).

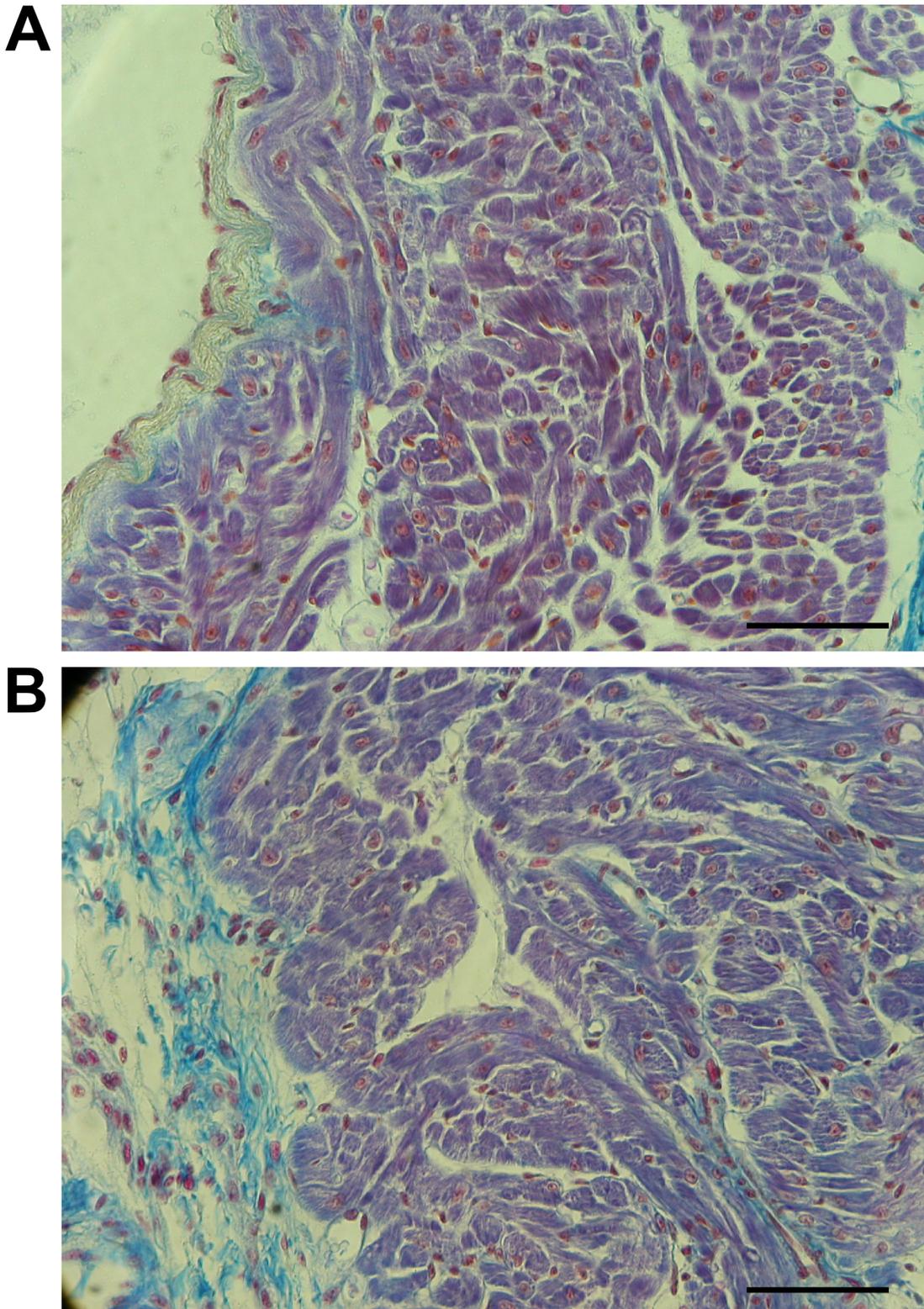


**Abb. 3.1: Detektion von  $Ca_v2.3$  im *Western-Blot*.** Aufgetragen sind Mikrosomen aus dem Cerebrum (Brn) und Herzen (Hrt) sowohl aus Kontrolltieren (+|+) als auch aus  $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen (-|-). In Kontrolltieren zeigt sich eine deutlich positive Reaktion für  $Ca_v2.3$  im Grosshirn (Spur 1), während sich in  $Ca_v2.3(+|+)$ -Herzen keine positive Reaktion darstellt (Spur 3, Weiergräber et al., 2005a).

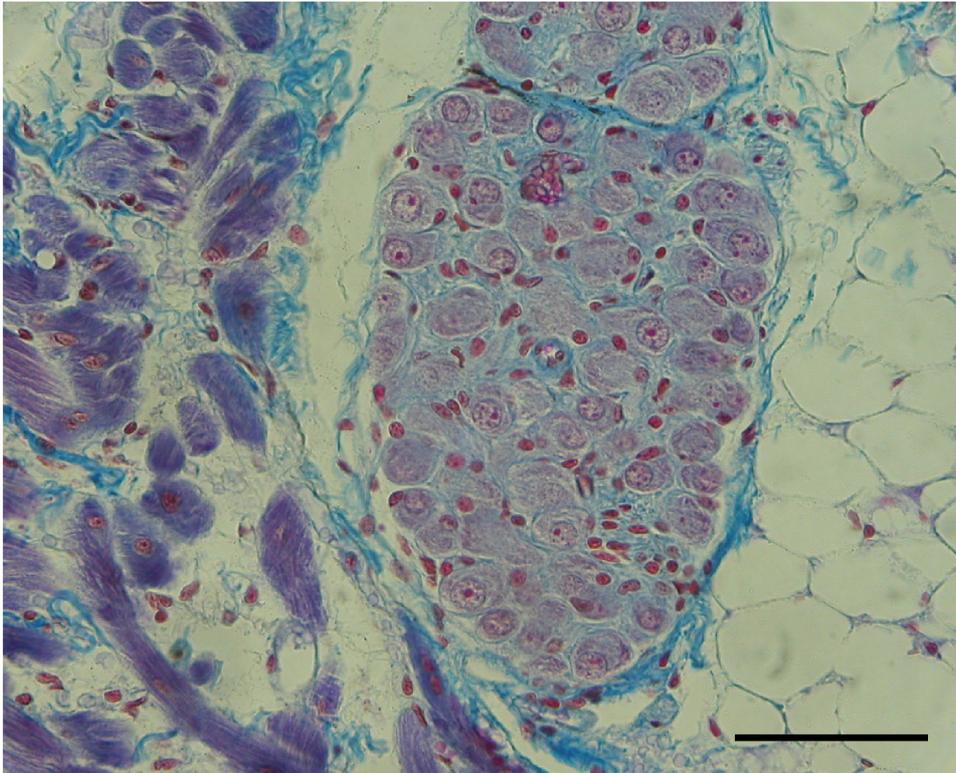
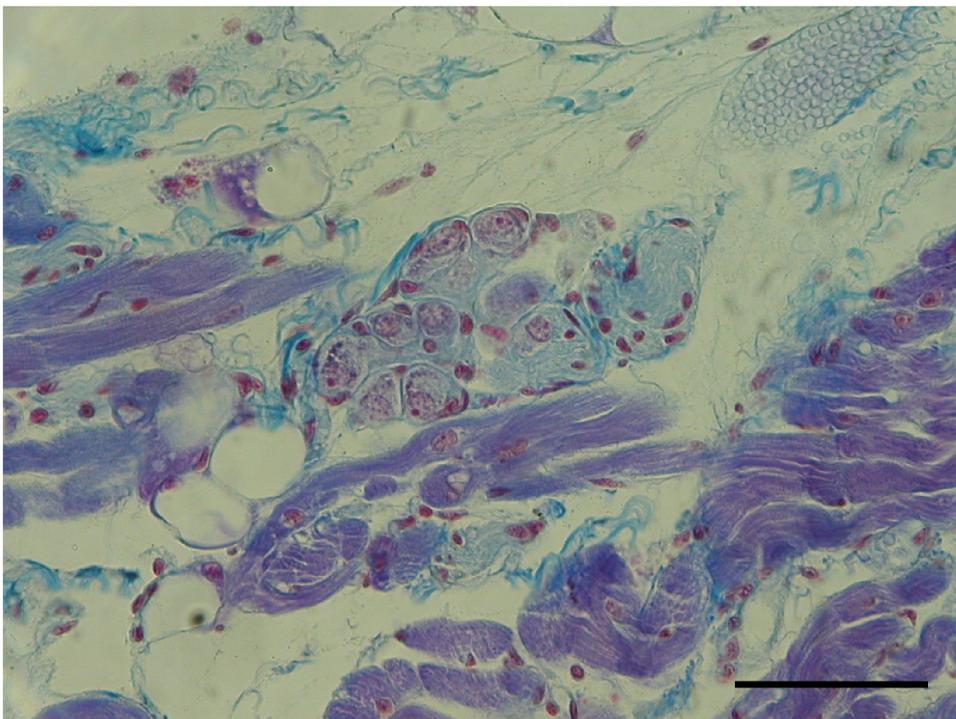
### 3.2. Histochemische Untersuchungen an Kontroll- und $Ca_v2.3(-/-)$ Herzen

Um mögliche morphologische Alterationen zu erfassen, wurden die Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse sowie von Kontrolltieren mit histochemischen Färbemethoden, wie der Trichrom-Färbung nach Masson, untersucht. Histologisch zeigten sich keine morphologischen Auffälligkeiten in Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse. Weder fanden sich nekrotische oder fibrosierte Areale, noch inflammatorische Reaktionen. Auffälligkeiten hinsichtlich Wandstärke von rechtem und linkem Ventrikel sowie der Septumdicke waren ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 3.2). Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass die angeführten histochemischen Färbeverfahren nur der groben Abschätzung histomorphologischer Veränderungen dienen. Distinkte Veränderungen, z.B. auf der Ebene der Architektur des Erregungsbildungs- und Leitungssystems können nicht ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde u.a. darauf Wert gelegt, autonome intrakardiale Ganglien zur Darstellung zu bringen. Frühere Publikationen legen nahe, dass parasymphatische Ganglien  $Ca_v2.3$  exprimieren und für die in ihnen gemessene R-Typ-Stromkomponente verantwortlich sind (Jeong and Wurster, 1997a,b). In der Regel finden sich intrakardiale Ganglien in Zellgruppen organisiert, eingebettet in Adipozyten in der Vorhofmuskulatur. Hinsichtlich Morphologie und Ganglienzellichte fanden sich aber keine Unterschiede zwischen  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren und Kontrolltieren (Abb. 3.3).



**Abb. 3.2: Schnitt durch die Vorhofmuskulatur von  $Ca_v2.3(+/+)$  (A) und  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen (B, beide Trichrom-Färbung).** Histologisch fanden sich keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Kernstrukturen sind rötlich gefärbt, das Vorhofmyokard violett sowie Bindegewebsstrukturen hellblau. Massstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

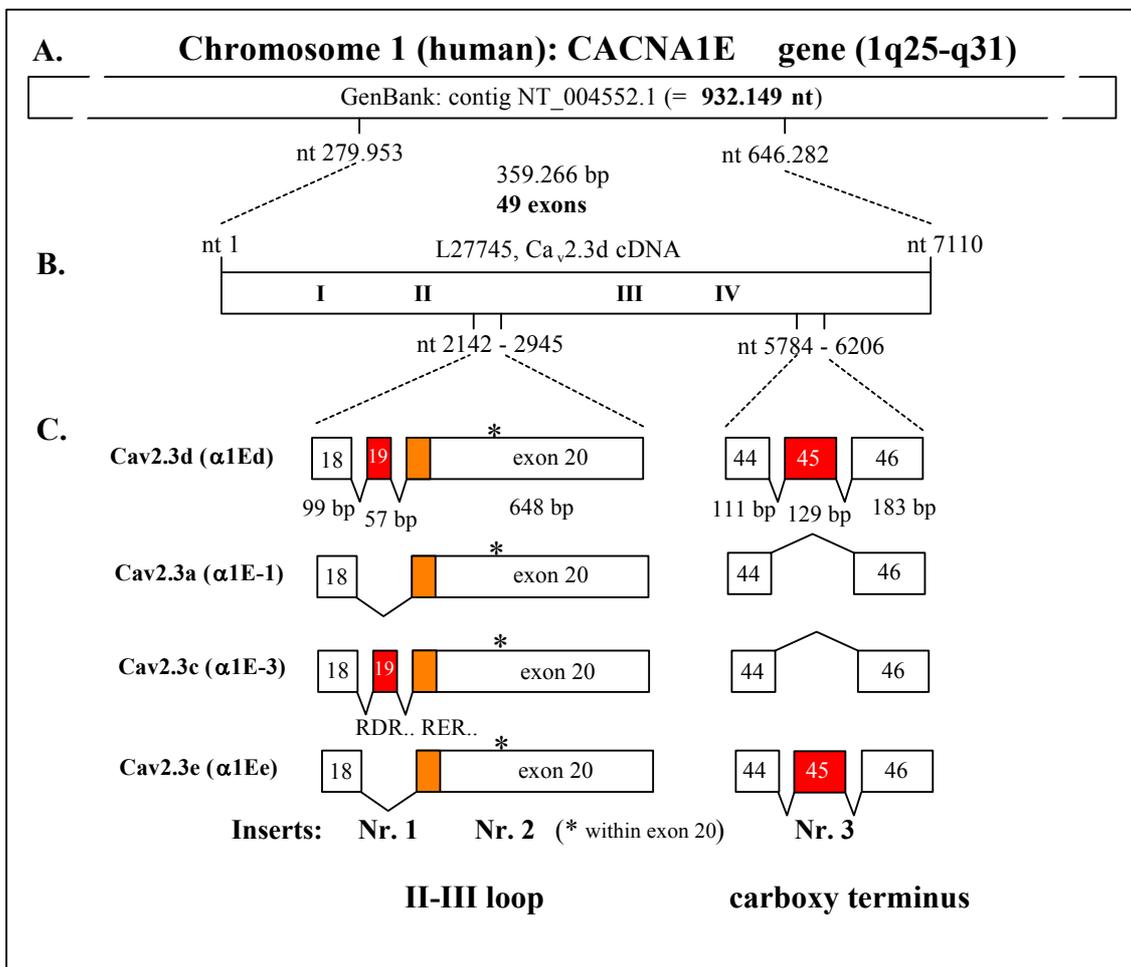
**A****B**

**Abb. 3.3: Intrakardiale Ganglien in den Vorhöfen von  $Ca_v2.3(+/+)$  (A) und  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen (B, beide Trichrom-Färbung).** Ganglienzellen sind typischerweise in Gruppen angeordnet und zusammen mit Adipozyten in das Vorhofmyokard integriert. Charakteristisch ist die ovale bis runde Zellform mit grossem Nukleus und prominentem Nukleolus. Erste Analysen erbrachten keine Unterschiede in Morphologie und Ganglienzellichte zwischen beiden Genotypen. Massstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Detektion von Ca<sub>v</sub>2.3-Spleißvarianten im Herzen

#### 3.3.1. Ca<sub>v</sub>2.3-Transkripte in C57Bl/6 Mäusen

Angaben in der Literatur über die Präsenz von Ca<sub>v</sub>2.3 (α1E) im Herzen sind widersprüchlich. Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe haben bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass im Rattenherzen Ca<sub>v</sub>2.3 (α1E) exprimiert wird (Weiergräber et al., 2000). Dies konnte nicht nur auf immunhistochemischer Ebene nachgewiesen werden, sondern auch unter Zuhilfenahme von RT-PCR Experimenten. Auf diese sei im Folgenden näher eingegangen.



**Abb. 3.4: Darstellung unterschiedlicher Ca<sub>v</sub>2.3 Spleißvarianten.** Alternatives Spleißen tritt im II-III-loop Bereich sowie im C-Terminus auf. Die, wie weiter unten noch ausgeführt wird, dominante Spleißvariante im Herzen ist Ca<sub>v</sub>2.3e, der *Insert* 1 im II-III-loop fehlt, die jedoch im Vergleich zu Ca<sub>v</sub>2.3a und Ca<sub>v</sub>2.3c den längeren C-Terminus aufweist.

Zwei verschiedene Primerpaare wurden im Rahmen des Transkriptionnachweises von  $Ca_v2.3$  im Herzen sowohl bei Maus, Ratte und auch Mensch verwendet. Das erste Primerpaar flankiert den II-III-*loop* Bereich, das zweite Primerpaar ein C-terminales Fragment. In beiden Arealen tritt alternatives Spleißen auf. Im Bereich des II-III-*loop* ist hiervon zum einen Exon 19 betroffen, mit einer Größe von 57 bp (auch *Insert 1* genannt) sowie ein Teilbereich von Exon 20, das nur 21 bp misst und als *Insert 2* bezeichnet wird. Auch im Bereich des C-Terminus tritt alternatives Spleißen auf: Exon 45 ist hiervon betroffen, welches 129 bp umfasst und als *Insert 3* bezeichnet wird (Abb. 3.4).

Aus der Kombination unterschiedlicher Spleiß-Prozesse im II-III-*loop* und C-Terminus resultieren letztendlich die verschiedenen  $Ca_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ) Spleißvarianten. Frühere, eigene RT-PCR Resultate haben gezeigt, dass in der Ratte die  $Ca_v2.3e$  ( $\alpha 1Ee$ )-Spleißvariante die dominante  $Ca_v2.3$  Spleißvariante im Herzen darstellt, ein Ergebnis, das durch nachfolgende Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Philip Best (Mitchell et al., 2002) bestätigt werden konnte. Wie Abb. 3.4 zeigt, ist die  $Ca_v2.3e$  Spleißvariante (endokrine Spleißvariante) im Bereich des II-III-*loop* durch das Fehlen von *Insert 1* und die Präsenz von *Insert 2* gekennzeichnet. C-terminal liegt die längere Variante vor, die Exon 45 (129 bp) enthält.

Wie u.a. die Arbeiten von Philipp Best gezeigt haben, findet sich für  $Ca_v2.3$  eine entwicklungsabhängige Änderung des Transkriptionsniveaus im Rattenatrium mit hohen Transkriptzahlen in der pränatalen und neonatalen Phase, während im adulten Rattenatrium die  $Ca_v2.3$ -Transkripte schließlich wieder abnehmen (Larsen et al., 2002). In Abb. 3.5 ist die Entwicklung der verschiedenen  $Ca_v2.3$  Spleißvarianten bei der Maus vom frühen pränatalen über das späte pränatale Entwicklungsstadium des Herzens bis zum adulten Tier dargelegt. In den frühen pränatalen Entwicklungsstadien (Tag 12.5 p.c. und 14.5 p.c.) findet sich fast ausschließlich die endokrine  $Ca_v2.3e$  Spleißvariante (363 bp). Im späteren pränatalen Entwicklungsstadium (Tag 19.5 p.c.) gesellen sich auch die anderen Spleißvarianten hinzu. Dabei handelt es sich um die  $Ca_v2.3d$  Spleißvariante (420 bp), die *Insert 1* und *Insert 2* enthält sowie  $Ca_v2.3f$  (399 bp), die *Insert 1* enthält während *Insert 2* fehlt. Wiederholte RT-PCR-Versuche mittels Gesamtherz-RNA aus adulten (12 Wochen alten) Mäusen haben gezeigt, dass Fragmente in der Größenordnung aller drei Spleißvarianten  $Ca_v2.3d - f$  amplifiziert werden konnten, wobei  $Ca_v2.3d$  und  $Ca_v2.3e$  durch Sequenzierung bestätigt werden konnten. Dieses Ergebnis wird u.a. durch RT-

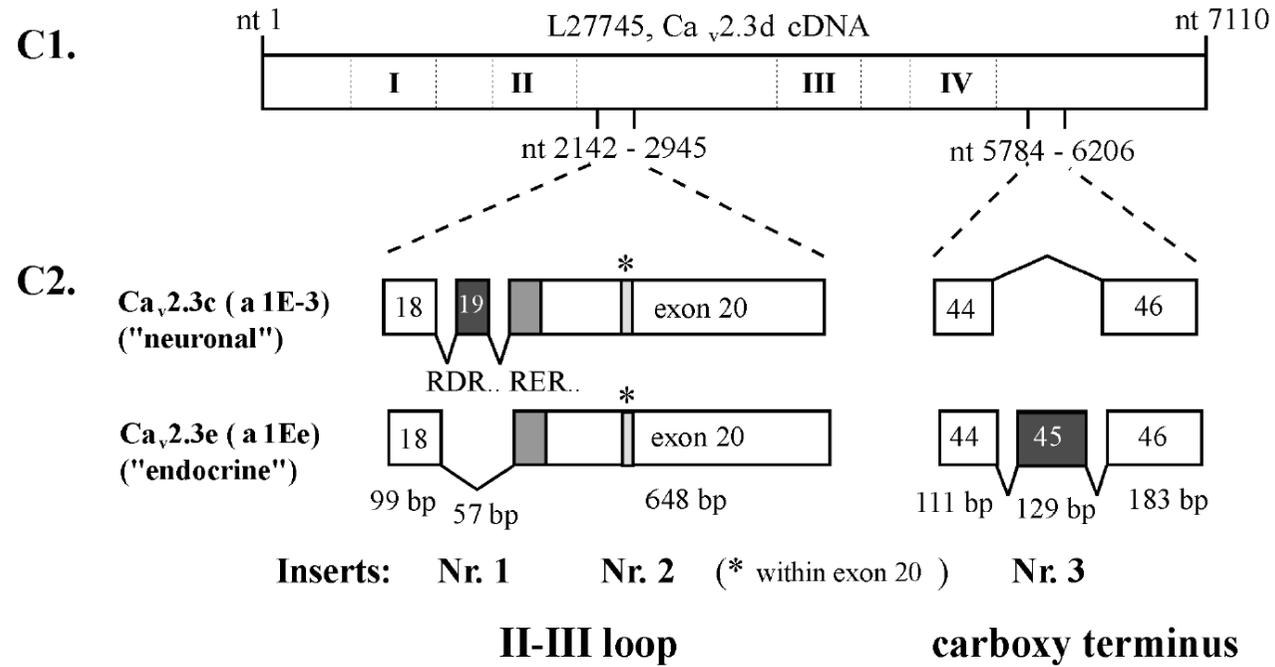
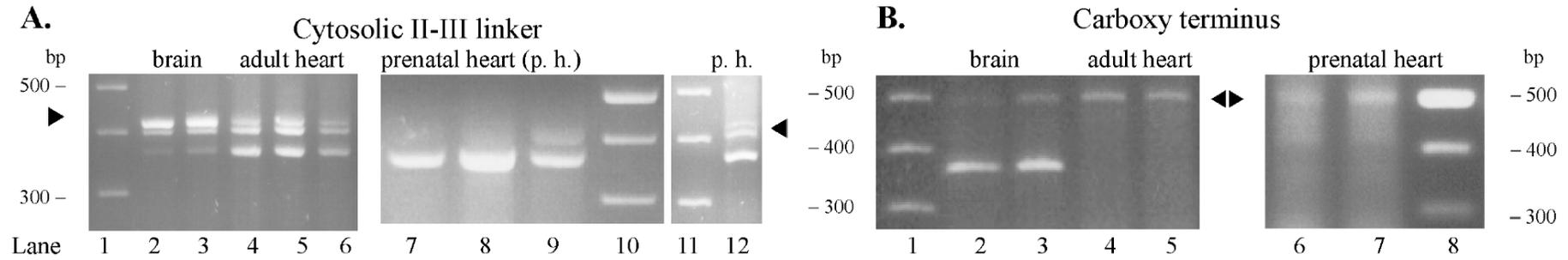
PCR Experimente mit dem zweiten Primerpaar zur Amplifikation des C-Terminus gestützt. Sowohl im pränatalen wie auch im adulten Tier lässt sich das längere C-terminale Fragment amplifizieren. Im ZNS dagegen dominiert die neuronale  $Ca_v2.3$  Spleißvariante mit dem kürzeren C-Terminus ( $Ca_v2.3c$ ).

Gibt es postnatal Unterschiede in der Spleißvarianten-Distribution sowie deren Transkriptniveaus zwischen Atrien und Ventrikeln? Hierzu wurden die Mausherzen nach zervikaler Dislokation entnommen und sodann die Atrien von den Ventrikeln getrennt. Für die Atrien wurden repräsentativ die Herzohren (*Auricula dextra et sinistra*) verwendet, für die Ventrikeln die Herzspitze (*Apex cordis*). Wie Abb. 3.6 (A, D) zeigt, lassen sich nach reverser Transkription von atrialer RNA der C57Bl/6 Mäuse höhere Transkriptmengen nachweisen als im Ventrikel. Im Großhirn finden sich alle drei *II-III-loop* Spleißvarianten. Hier dominiert allerdings im Gegensatz zum Herzen das kürzere C-terminale Fragment, dem Exon 45 fehlt ( $Ca_v2.3c$ ). Auch in den  $Ca_v2.3(-/-)$  Proben kommt es zur Amplifikation von *II-III-loop* Produkten entsprechender Größe, die aber nicht in ein funktionelles Protein umgewandelt werden, da der offene Leserahmen durch Deletion von Exon 2 unterbrochen ist. Auf diese Weise entsteht ein vorzeitiges Stop-Codon.

Ein vergleichbares Experiment mit Rattenherzen (Abb. 3.6 B, E) zeigt die Dominanz der  $Ca_v2.3e$  Spleißvariante, aber keinen vergleichbar markanten Unterschied auf Transkriptebene zwischen Atrien und Ventrikeln bei dieser Spezies wie beispielsweise bei der Maus. Auch die Amplifikation des C-Terminus wurde bei den verschiedenen Spezies Maus, Ratte und Mensch getestet. In allen Spezies fand sich im Herzen das größere C-terminale Fragment, das Exon 45 enthält (Abb. 3.6 D - F).

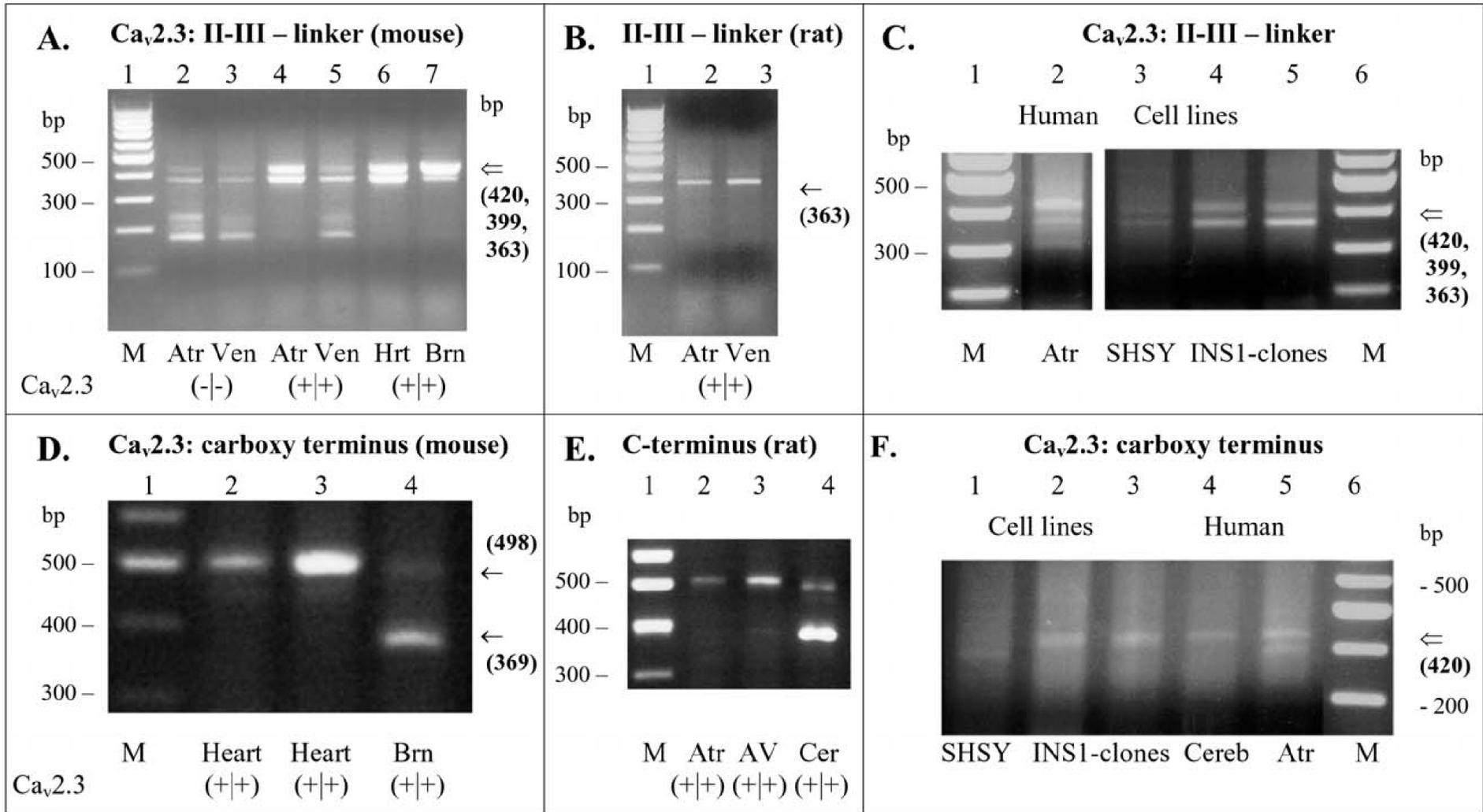
Die hier dargelegten Resultate stellen RT-PCR Ergebnisse aus einer Gesamtherz-RNA-Isolation dar. Es muss somit berücksichtigt werden, dass neben Kardiomyozyten, die zweifelsfrei die Zellmajorität darstellen, auch Transkripte anderer Zelltypen, wie Fibroblasten/Fibrozyten, Adipozyten und insbesondere autonomer intrakardialer Ganglienzellen das Amplifikationsergebnis beeinflussen könnten. Um diese Frage zu erörtern, wurden *Single-Cell-RT-PCR* Versuche an isolierten, mittels Langendorff-Perfusion gewonnenen Kardiomyozyten der Maus durchgeführt. Es zeigte sich, dass in 6 von 29 der analysierten Zellen  $Ca_v2.3$  Transkripte nachweisbar sind. Wie Abb. 3.7 weiterhin deutlich macht, handelt es sich hierbei um Zellen z.T. ganz unterschiedlicher Morphologie, die aber viele Eigenschaften von Zellen des Erregungsbildungs- und Leitungssystems aufweisen:

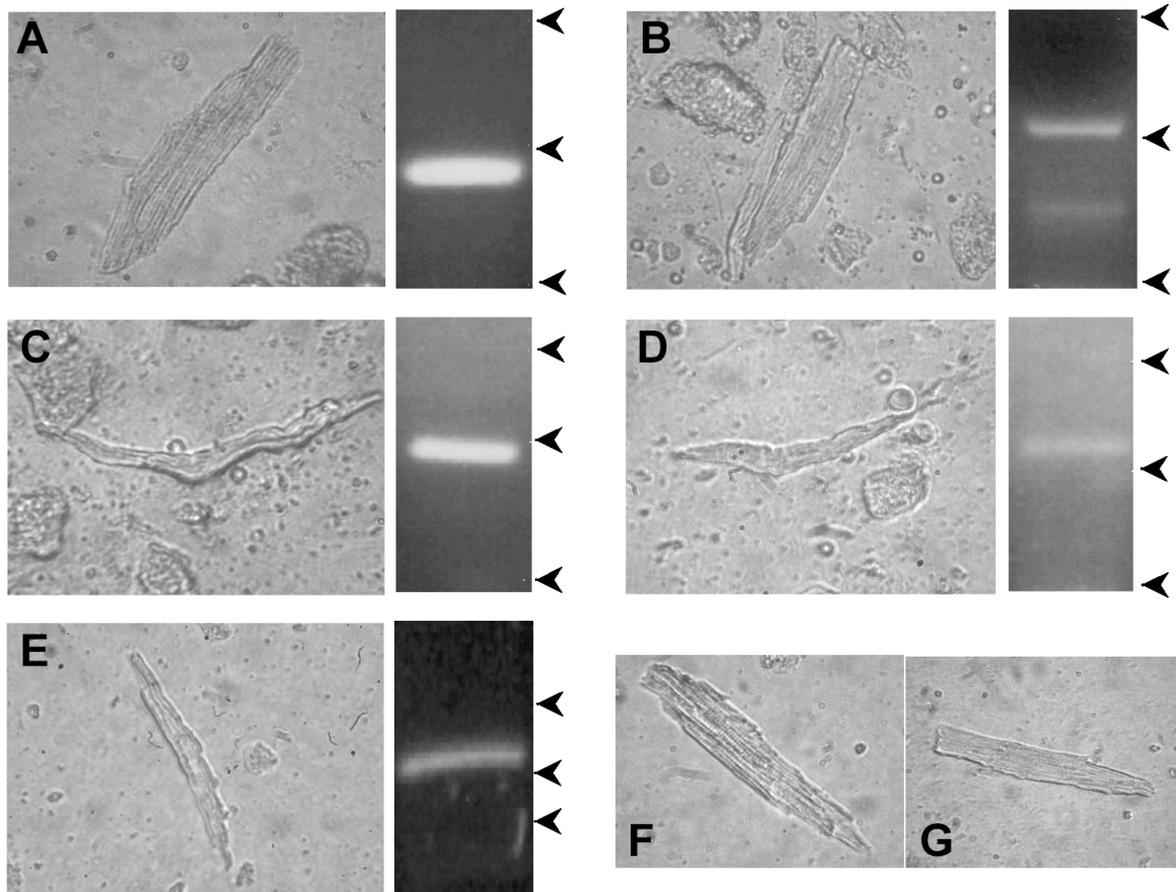
spindelförmige, schrittmacherähnliche Zellen (Abb. 3.7 C, D) oder auch breite, kurze, nur gering quergestreifte Zellen, die an Purkinjefasern erinnern (Abb. 3.7 A, B).  $Ca_v2.3$  Transkripte lassen sich also tatsächlich in Kardiomyozyten der Maus nachweisen - ein Befund, der auch durch in situ Hybridisierungsexperimente am Rattenherzen unterstützt wird (Mitchell et al., 2002).



**Abb. 3.5: Nachweis verschiedener  $Ca_v2.3$  Spleißvarianten in pränatalen und adulten Mausherzen (siehe vorherige Seite).** A) Amplifikation der cDNA-Abschnitte des II-III-*loop* vom Maushirn (Spuren 1, 2) sowie vom adulten Mausherzen (Spuren 4 - 6). Während sich beim adulten Herzen alle drei II-III-*loop* Spleißvarianten finden, zeigt sich im pränatalen Mausherzen eine entwicklungsabhängige Änderung der Verteilung der II-III-*loop* Spleißvarianten (Spur 7: 12,5 d p.c.; Spur 8: 14,5 d p.c.; Spuren 9, 12: 19,5 d p.c.; Spuren 1, 10, 11: Marker). B) Amplifikation der cDNA des C-terminalen Fragmentes. Während sich im Grosshirn der Maus eindeutig die kürzere Spleißvariante nachweisen lässt (ohne Exon 45), wird im pränatalen sowie adulten Herzen ausschließlich cDNA des längeren C-Terminus vorgefunden (Spuren 4 – 7; Spuren 1, 8: Marker). C) Schema der alternativen Spleißregion innerhalb des II-III-*loop* sowie im C-Terminus. Exon 19 im II-III-*loop* korreliert mit *Insert* Nr.1 (57 bp); *Insert* 2 (21 bp) stellt dagegen nur einen Teilbereich von Exon 20 dar (Lu et al., 2004).

**Abb. 3.6: Amplifikation von  $Ca_v2.3$  im Herzen unterschiedlicher Spezies (siehe folgende Seite).** A, B, C) Amplifikation verschiedener II-III-*loop* Spleißvarianten im Atrium (Atr) und Ventrikel (Ven) der Maus (A), Ratte (B) sowie im menschlichen Herzohr (Atr) und verschiedenen menschlichen Zelllinien (SHSY, INS-1, (C)). Der semiquantitative Ansatz macht deutlich, dass sich im Mausherzen durchweg mehr  $Ca_v2.3$ -Transkripte finden als im Ventrikel. Es dominieren mindestens zwei II-III-*loop* Spleißvarianten. Im Rattenherzen (B) hingegen überwiegt die bereits zuvor beschriebene  $Ca_v2.3e$  Spleißvariante, wobei sich zwischen Atrium und Ventrikel kein quantitativer Unterschied zeigt. Das C-terminale Primerpaar amplifiziert in allen Spezies, Maus (D), Ratte (E) und Mensch (F) das längere C-terminale Fragment, das Exon 45 enthält (Weiergräber et al., 2005a). Ich danke Frau Dipl. Biol. Margit Henry für die RNA-Isolation sowie die Durchführung der RT-PCR.



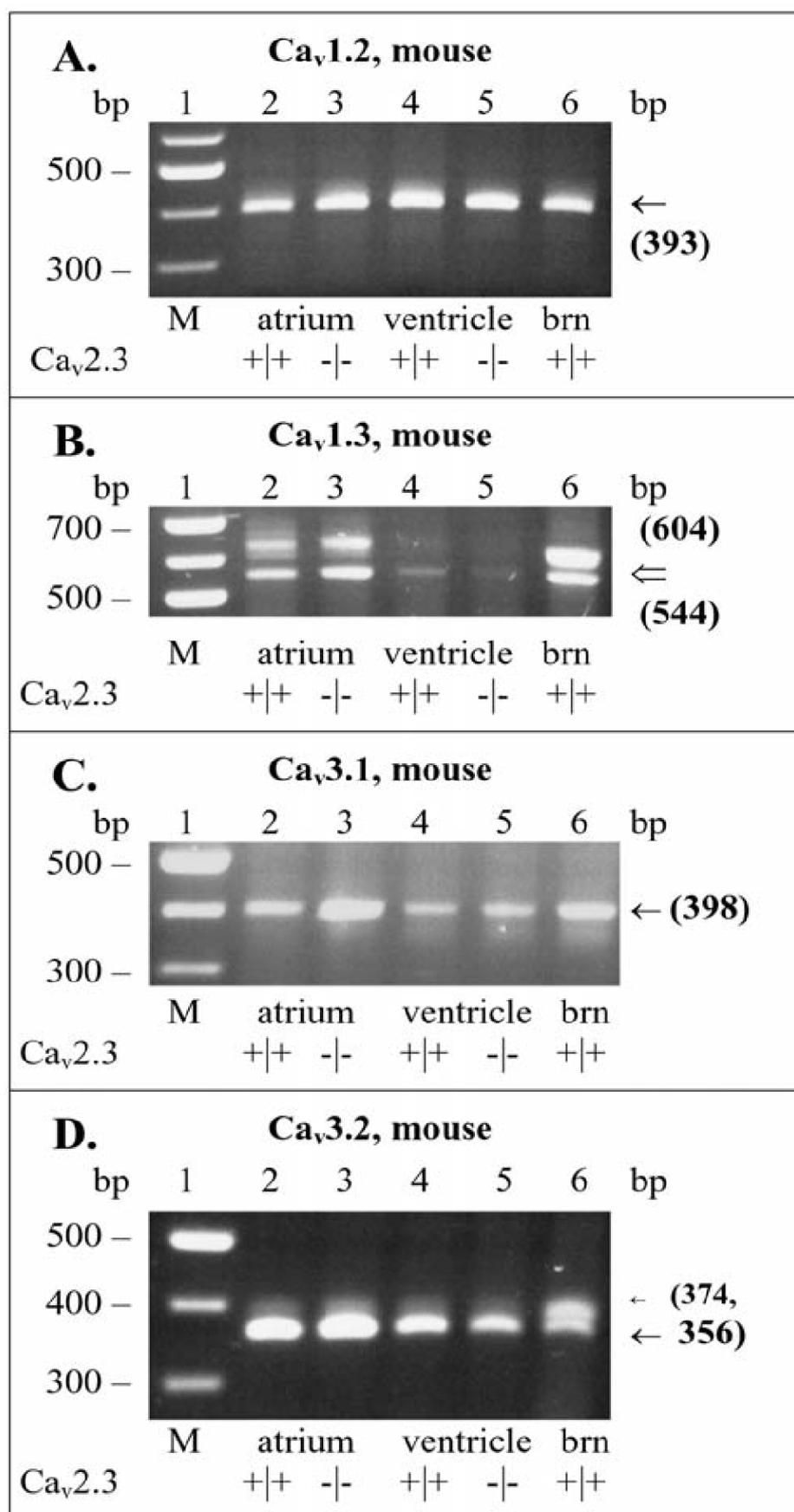


**Abb. 3.7: *Single-cell* RT-PCR Resultate dissoziierter Kardiomyozyten der Maus.**

Die hier dargestellten Mauskardiomyozyten wurden nach dem oben beschriebenen Langendorff-Verfahren dissoziiert und anschließend einer *Single-cell* RT-PCR zugeführt, wobei sich 6 von 29 untersuchten Zellen als  $Ca_v2.3$ -positiv erwiesen haben (exemplarisch dargestellt in A - E). Beispiele für  $Ca_v2.3$  negative Zellen finden sich in F, G (Weiergräber et al., 2005a). Ich danke Frau Dipl. Biol. Margit Henry für die Durchführung der *Single-cell* RT-PCR.

**Abb. 3.8: Amplifikation spannungsgesteuerter L- und T-Typ Kalziumkanäle in Kontroll- und  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen (siehe folgende Seite).**

Für  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) und  $Ca_v1.3$  ( $\alpha1D$ ) fanden sich keine Änderungen auf Transkriptebene zwischen  $Ca_v2.3(+/+)$  und  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen. Für  $Ca_v3.1$  ( $\alpha1G$ ) zeigte sich eine Hochregulation im Atrium (1,9-fach) sowie im Ventrikel (1,4-fach) in  $Ca_v2.3$  defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Weiergräber et al., 2005a). In allen Ansätzen wurde  $1\mu g$  RNA eingesetzt. Parallel erfolgten Negativkontrollen ohne Einsatz von RNA (Leerprobe), Tests auf Vorhandensein bzw. Amplifikation genomischer DNA, sowie *housekeeper*-Amplifikation. Die anschließende Quantifizierung wurde mit dem Programm GelScan 3D Professional V3.1 durchgeführt. Ich danke Frau Dipl. Biol. Margit Henry für die RNA-Isolation sowie die Durchführung der RT-PCR.



### **3.3.2. Analyse weiterer spannungsgesteuerter Kalziumkanäle in Herzen $Ca_v2.3$ defizienter Mäuse**

Wie bereits weiter oben ausführlich dargelegt wurde, sind eine Vielzahl von Ionenkanälen an Erregungsbildungs- und Leitungsvorgängen im Herzen wesentlich beteiligt. Sollte  $Ca_v2.3$  intrinsisch, d.h. im Herzen selbst funktionell relevant sein, so sind Kompensationsmechanismen anderer Ionenkanalkomponenten zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeiten ist daher auch das Verhalten anderer im Herzen vorkommender spannungsgesteuerter Kalziumkanäle näher untersucht worden.

Für die L-Typ Kalziumkanäle  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) sowie  $Ca_v1.3$  ( $\alpha1D$ ) konnten auf Transkriptebene sowohl für Atrien als auch für Ventrikel zwischen Kontroll- und  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen keine Unterschiede detektiert werden (Abb. 3.8 A, B). Für  $Ca_v3.3$  ( $\alpha1I$ ) wurden Literaturergebnisse bestätigt, die besagen, dass dieser T-Typ-Kanal nicht im Herzen exprimiert wird.

Für den niederspannungsaktivierten  $Ca_v3.1$  ( $\alpha1G$ ) Kalziumkanal hingegen zeigte sich auf atrialer Ebene eine deutliche Hochregulation in  $Ca_v2.3$  defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Quantifizierung mittels GelScan 3D Professional V3.1 Software ergab einen Anstieg um den Faktor 1,9 ( $n = 3$ ). Auch auf ventrikulärer Ebene lies sich eine Hochregulation von  $Ca_v3.1$  in  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen um den Faktor 1,4 ( $n = 3$ ) nachweisen (Abb. 3.8 C).

Dieses Resultat ist aus verschiedenen Gründen bemerkenswert. Frühere eigene immunhistochemische Untersuchungen am Rattenherzen haben gezeigt, dass  $Ca_v2.3$  selektiv in Zellen des Erregungsbildungs- und Leitungssystems exprimiert wird. Immunhistochemische Untersuchungen an Serienschnitten des Rattenatriums haben weiterhin verdeutlicht, dass  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v2.3$  kolokalisiert sind (Weiergräber et al., 2000). Die oben angeführten RT-PCR Resultate legen daher nahe, dass es im Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse zu kompensatorischen Modifikationen im Expressionsniveau verschiedener T-Typ Kalziumkanäle kommt. Auf die funktionelle Bedeutung dieses Ergebnisses wird weiter unten im Detail eingegangen.

### **3.3.3. Nachweis von $Ca_v2.3$ im Schweineherzen**

RT-PCR Versuche zum Nachweis von  $Ca_v2.3$  erbrachten positive Resultate in einer Reihe von unterschiedlichen Herzregionen, u.a. auch in Strukturen des Erregungsbildungs- und Leitungssystems.

#### **3.3.4. Nachweis von Ca<sub>v</sub>2.3 im Herzen des Menschen**

In der hier dargelegten Versuchsserie ist es gelungen, Ca<sub>v</sub>2.3 Transkripte im Herzen von Maus, Ratte und Hausschwein nachzuweisen. Als zentrale Fragestellung blieb der Nachweis von Ca<sub>v</sub>2.3-Transkript im Herzen des Menschen. In Kooperation mit Prof. Dr. de Vivie und Dr. M. Südkamp von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität zu Köln konnte auf humanes Material des rechten Herzohres (*Auricula dextra, right atrial appendage*) zurückgegriffen werden. Das Gewebstück wurde nach operativer Entnahme umgehend der RNA-Isolation zugeführt und zeigte in der später durchgeführten RT-PCR sodann auch eine positive Reaktion für die Amplifikation der unterschiedlichen II-III-*loop* Fragmente und des längeren C-terminalen Fragmentes, das Exon 45 enthält (Abb. 3.6 C, F). Dieses Resultat stellt damit auch den ersten Nachweis von Ca<sub>v</sub>2.3 Transkripten im menschlichen Herzen dar.

## 3.4. Patch-Clamp Untersuchungen

### 3.4.1. Datenanalyse und biophysikalische Vorbetrachtungen

Im Rahmen der hier vorgestellten Experimente sollen einige theoretische Vorbetrachtungen angeführt werden. Es werden hier nur einige wenige z.T. aber sehr grundlegende Gleichungen abgeleitet, die in der Folge transformiert wurden und dann zur Berechnung verschiedener Parameter, v.a. der Dissoziationskonstanten des Isradipins für Ca<sub>v</sub>2.3d und Ca<sub>v</sub>2.3e herangezogen wurden.

### 3.4.2. Grundlegende biophysikalische Charakterisierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion

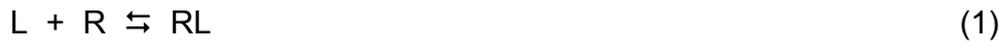
#### 3.4.2.1. Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung erfolgt über die sog. Hill-Langmuir-Adsorptionsisotherme. Sie beruht ursprünglich auf der Betrachtung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen freien Gasmolekülen und adsorbierenden Teilchen (Festkörper). Hieraus ergab sich die Frage nach der Druckabhängigkeit der Teilchenadsorption. Die gewonnenen Kurven werden als Adsorptionsisothermen bezeichnet .

Um letztlich die hier verwendeten Dosis-Wirkungskurven angemessen werten zu können, muss berücksichtigt werden, dass die Berechnung einer Isotherme auf der Annahme beruht, dass alle Adsorptionsplätze äquivalent sind und die Adsorptionswahrscheinlichkeit nicht davon abhängt, dass die Nachbarplätze frei oder besetzt sind.

Im Folgenden wird das Interaktionsprinzip zwischen einem Agonisten/Antagonisten (Liganden L) und einem Rezeptor (R) auf der Basis des Hill-Langmuir-Konzeptes näher betrachtet.

Die Interaktion zwischen einem Liganden (L, in diesem Fall Isradipin) und einem Rezeptor (R, im vorliegenden Fall die Ca<sub>v</sub>2.3 Kalziumkanaluntereinheit) lässt sich durch die sog. einfache Okkupationstheorie beschreiben. Ligand und Rezeptor befinden sich hier im Gleichgewicht mit dem Ligand-Rezeptor-Komplex (RL):



(zur formalen Darstellung der Assoziation),

sowie



(zur formalen Darstellung der Dissoziation).

Im thermodynamischen Gleichgewicht, d.h. unter den Bedingungen des Massenwirkungsgesetzes (MWG) folgt aus (2) für die Geschwindigkeiten der Hinreaktion (Dissoziation)  $v_{\text{diss}}$  und der Rückreaktion (Assoziation)  $v_{\text{ass}}$  die folgende Proportionalitätsbeziehung:

$$v_{\text{diss}} \sim [LR] \quad (3) \quad \text{und} \quad v_{\text{ass}} \sim [L] * [R] \quad (4)$$

Unter Einbeziehung der Geschwindigkeitskonstanten für den dissoziativen ( $k_{-1}$ ) bzw. assoziativen Teilschritt ( $k_1$ ) erhält man:

$$v_{\text{diss}} = k_{-1} * [LR] \quad (3-1) \quad \text{und} \quad v_{\text{ass}} = k_1 * [L] * [R] \quad (4-1)$$

Das Geschwindigkeitsgesetz für die Hinreaktion (Dissoziation) gehorcht einer Kinetik 1. Ordnung (3-1), die Rückreaktion (Assoziation) einer Kinetik 2. Ordnung (4-1).

Es lassen sich nun die Dissoziationskonstante und die Assoziationskonstante (oft allgemein als  $K_d$  bzw.  $K_a$  bezeichnet) für die in (1) und (2) formulierten Gleichungen aufstellen, indem man zunächst die Geschwindigkeiten  $v_{\text{diss}}$  und  $v_{\text{ass}}$  gleichsetzt:

$$v_{\text{diss}} = v_{\text{ass}}$$

Man erhält dann unter Verwendung von (3-1) und (4-1) für den thermodynamischen Gleichgewichtszustand:

$$k_{-1} * [LR] = k_1 * [L] * [R]$$

und durch Umformung

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[L] \cdot [D]}{[LD]}$$

Es handelt sich hierbei um die kinetische Herleitung des Massenwirkungsgesetzes, welche die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand unter kinetischen Aspekten erfasst. Aus Gründen der Vollständigkeit sei erwähnt, dass auch eine thermodynamische Herleitung nach van't Hoff existiert, welche die Rezeptor-Liganden-Interaktion unter energetischen Gesichtspunkten näher betrachtet und für die die Einführung der sog. partiellen, freien (molaren) Enthalpie  $\mu$  als zentrale Größe unerlässlich ist. Da die Darstellung dieser Herleitung den Rahmen sprengen würde, wird hierauf verzichtet. Unter praktischen Gesichtspunkten ist darüber hinaus die kinetische Herleitung handlicher und wird deshalb hier weiterhin betrachtet. Der oben angeführte Quotient  $k_{-1}/k_1$  stellt die Dissoziationskonstante  $K_d$  dar, ihr Kehrwert,  $k_1/k_{-1}$ , die Assoziationskonstante  $K_a$ .

Für die Interaktion des Liganden (L) mit dem gesamten Rezeptorbestand ( $R_t$ , d. h. Rezeptoren im Ruhezustand und inaktiven Zustand) gilt:



Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen erhält man die Dissoziations-Gleichgewichtskonstante, die im Falle des Gesamtrezeptorbestandes ohne Berücksichtigung der Ionenkanalkonformation ( $R_t$ ) als sog. apparente Dissoziationskonstante  $K_{app}$  bezeichnet wird:

$$K_{app} = \frac{[L] \cdot [R_t]}{[LR_t]} \quad (5)$$

Die apparente Dissoziationskonstante ( $K_{app}$ ) steht dabei mit der sog. apparenten Assoziationskonstante ( $K_{ass}$ ) über  $K_{app} = 1/K_{ass}$  in Beziehung. Dies ergibt sich aus obiger Darstellung.

Für den Okkupationsgrad  $\gamma$ , d.h. den Belegungsgrad der Rezeptoren  $R_t$  ergibt sich:

$$\gamma = \frac{[LR_t]}{[LR_t] + [R_t]} \quad (5-1)$$

Löst man (5) nach  $[LR_t]$  auf, erhält man:

$$[LR_t] = \frac{[L] * [R_t]}{K_{app}}$$

Substituiert man den obigen Ausdruck für  $[LR_t]$  in (5-1), folgt:

$$\gamma = \frac{[L] * [R_t]}{K_{app} * \left( \frac{[L] * [R_t]}{K_{app}} + [R_t] \right)}$$

$$\gamma = \frac{[L] * [R_t]}{[L] * [R_t] + K_{app} * [R_t]}$$

$$\gamma = \frac{1}{1 + K_{app} / [L]} \quad (6)$$

Daraus folgt für die Fraktion des unbesetzten Rezeptors  $\gamma' = 1 - \gamma$ :

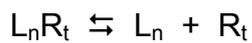
$$\gamma' = \frac{1}{1 + [L] / K_{app}} \quad (7)$$

Gemäß der stöchiometrischen Koeffizienten von Ligand und Rezeptor in den initialen Gleichungen (1) bzw. (2), nimmt die obige Berechnung ein einfaches 1 : 1 Bindungsverhältnis an, womit in der Realität a priori nicht zu rechnen ist. Viele Rezeptoren interagieren komplexer als in einem einfachen 1 : 1-Modell. Bezieht man dies in die Ableitung mit ein, so erhält man die erweiterte Hill-Langmuir-Gleichung (7-1):

$$\gamma' = \frac{1}{1 + [L]^n / K'} \quad (7-1)$$

Die Herleitung erfolgt in analoger Weise zu dem oben für ein 1 : 1-Bindungsverhältnis angeführtem Formalismus.

Ausgehend von der allgemeinen Gleichung :



ergibt sich gemäß des Massenwirkungsgesetzes:

$$K_{app'} = \frac{[L]^n * [R_t]}{[L_n R_t]} \quad (7-2)$$

Für den Okkupationsgrad  $\gamma$ , d.h. den Belegungsgrad der Rezeptoren  $R_t$  erhält man:

$$\gamma = \frac{[L_n R_t]}{[L_n R_t] + [R_t]} \quad (7-3)$$

Löst man (7-2) nach  $[L_n R_t]$  auf, folgt:

$$[L_n R_t] = \frac{[L]^n * [R_t]}{K_{app'}}$$

Substituiert man den obigen Ausdruck für  $[L_n R_t]$  in (7-3), so ergibt sich:

$$\gamma = \frac{[L]^n * [R_t]}{K_{app'} * \left( \frac{[L]^n * [R_t]}{K_{app'}} + [R_t] \right)}$$

$$\gamma = \frac{[L]^n * [R_t]}{[L]^n * [R_t] + K_{app} * [R_t]}$$

$$\gamma = \frac{1}{1 + K_{app} / [L]^n} \quad (7-4)$$

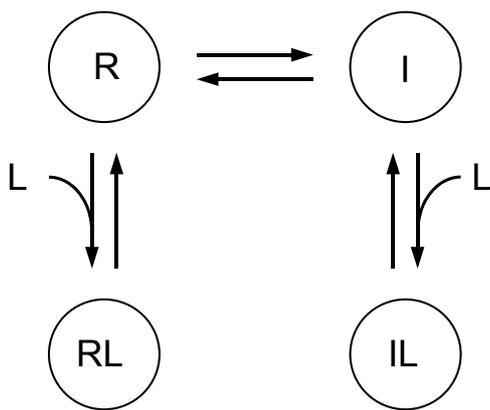
Daraus folgt für die Fraktion des unbesetzten Rezeptors  $\gamma' = 1 - \gamma$ :

$$\gamma' = \frac{1}{1 + [L]^n / K_{app}} \quad (7-5)$$

Mit n wird hierbei der sog. Hill-Koeffizient bezeichnet. Er ist ein Maß für die Ligandenbindung an den Rezeptor und macht eine Aussage über die sog. Kooperativität. Nimmt n den Wert 1 an, so liegt keine Kooperativität vor. Werte für n > 1 kennzeichnen sog. positive Kooperativität, Werte für n < 1 sog. negative Kooperativität.

### **3.4.2.2 Das Rezeptormodulationsmodell (*modulated receptor model*) und seine mathematische Beschreibung**

Die folgende Darstellung orientiert sich am sog. Rezeptormodulationsmodell (*modulated receptor model*), bei dem verschiedene Konformationszustände der porenbildenden  $\alpha$ 1-Untereinheit spannungsgesteuerter Ionenkanäle (Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle) unterschieden werden: ein sog. Ruhezustand (R), geschlossen-aktivierbar), ein Offenzustand ((O), offen-aktiviert) und ein inaktiver Zustand ((I), geschlossen-inaktiviert). Man kann es als eine Art Mehrzustandsmodell mit interkonvertierbaren Rezeptorkonformationen auffassen (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung des Rezeptor-modulationsmodells nach Hondeghem und Katzung (vereinfacht)** R: Kanal im Ruhezustand; I: Kanal im inaktiven Zustand; L: Ligand (der Offenzustand wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt).

Unter den Bedingungen des Ruhemembranpotentials, das in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche Werte annehmen kann, ist das Kanalprotein im Ruhezustand und damit geschlossen, aber aktivierbar; ein Depolarisationsvorgang bewirkt eine Konformationsänderung und führt zum Übergang in den aktivierten Zustand (Offenzustand). An diesem Vorgang sind u.a. positiv geladene Seitenreste der  $\alpha$ -helikalen S4-Segmente der spannungsgesteuerten Ionenkanäle beteiligt. Hieran schließt sich der Übergang in den inaktiven Zustand an, in dem das Kanalprotein auch durch massive Depolarisationsstimuli nicht aktivierbar ist. Erst ein sich anschließendes Repolarisations- bzw. Hyperpolarisationsereignis kann das Protein wieder in den aktivierbaren Zustand zurückversetzen, ein Vorgang, der als Deinaktivierung (*repriming*) bezeichnet wird.

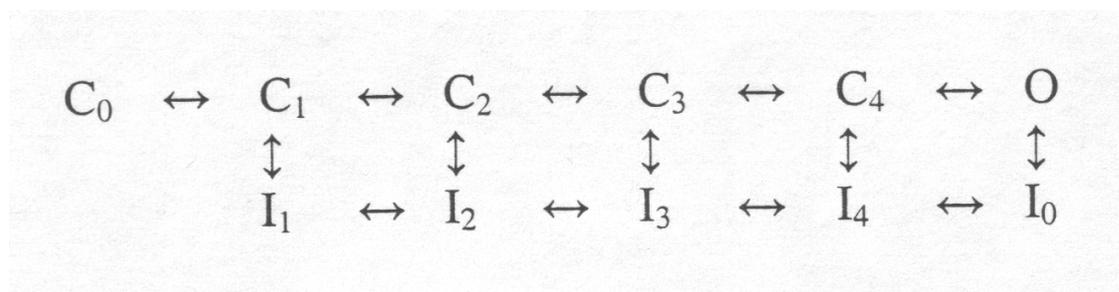
Bereits frühe Untersuchungen zur Wirkung von Lidocain auf kardiale spannungsgesteuerte Natriumkanäle konnten zeigen, dass diese in ihren unterschiedlichen Konformationszustände auch differente Affinitäten zum Natriumkanalblocker Lidocain aufwiesen (Bean et al., 1983). Ähnliches konnte auch für die Wirkung von Dihydropyridinen auf L-Typ-Kalziumkanäle gezeigt werden (Bean, 1984).

Es entstanden Modelle, wie das Rezeptormodulationsmodell, welches die Interaktion eines Liganden L mit den unterschiedlichen zugrunde liegenden Konformationszuständen beschreibt. Unter physikalisch-chemischen Gesichtspunkten lässt sich dies unter Zuhilfenahme des Massenwirkungsgesetzes (Reaktionsisotherme nach Guldberg und Waage, 1867) beschreiben. Das Rezeptormodulationsmodell beschreibt die Gleichgewichtseinstellung zwischen den

verschiedenen Konformationszuständen, welche sich durch die Interaktion mit einem Liganden L, der prinzipiell als Agonist oder Antagonist wirken kann, ergibt:  $[R_r]$ ,  $[R_i]$ ,  $[R_rL]$  und  $[R_iL]$  sowie die Konzentration des Liganden  $[L]$  bilden hier ein komplexes Gleichgewicht, dessen Verschiebungen sich durch Aktivitätsänderungen (vereinfacht Konzentrationsänderungen) der einzelnen Konformationszustände ergeben, sich u.a. aber auch spannungsabhängig einstellen. Die Beschreibung des Modells gehorcht damit im Sinne des Massenwirkungsgesetzes dem Prinzip von LeChatelier (Prinzip des kleinsten Zwanges). Es wird deutlich, dass die Berechnung unter der Annahme erfolgt, dass die realen Verhältnisse durch Betrachtung eines thermodynamischen Gleichgewichts hinreichend genau beschrieben werden können. Es handelt sich also nicht um die Beschreibung eines *steady-state*-Systems, ebenso finden kinetische Aspekte keinen Eingang in das Modell. In der hier dargelegten Analyse wurde auf die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für den geschlossen-aktivierbaren Zustand ( $K_r$ ) sowie den geschlossen-inaktivierten Zustand ( $K_i$ ) verzichtet und sich auf die Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung für Isradipin und  $Ca_v2.3d$  und  $Ca_v2.3e$  beschränkt.

### 3.4.3. Biophysikalische Beschreibung und zelluläre Realität

Bei Betrachtung des Rezeptormodulationsmodells wird sofort deutlich, dass dieses Modell gemessen an dem, was derzeit über die strukturellen Details spannungsgesteuerter Ionenkanäle bekannt ist, eine recht einfache Darstellungsweise ist.



**Abb. 3.11: Interdependenz unterschiedlicher Kanalkonformationszustände.**

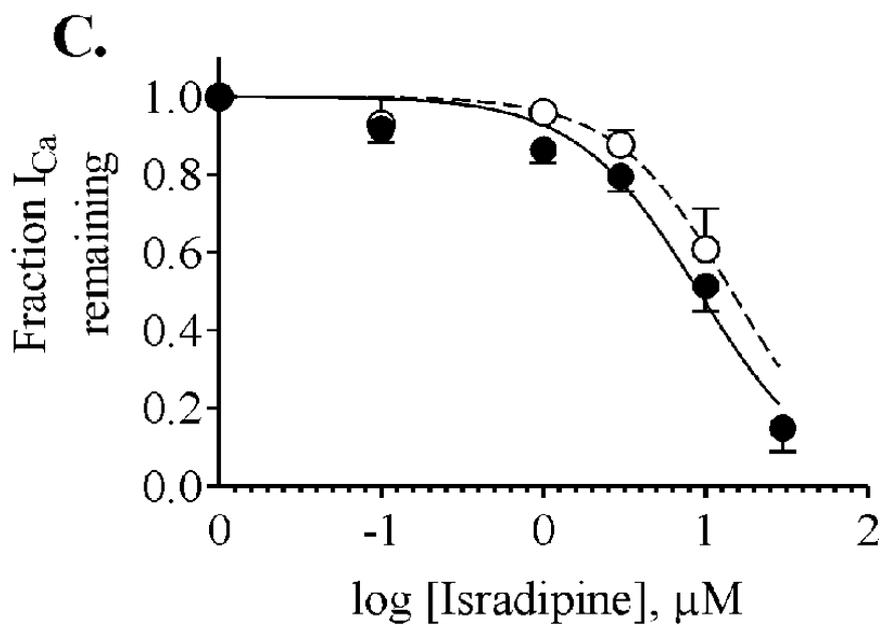
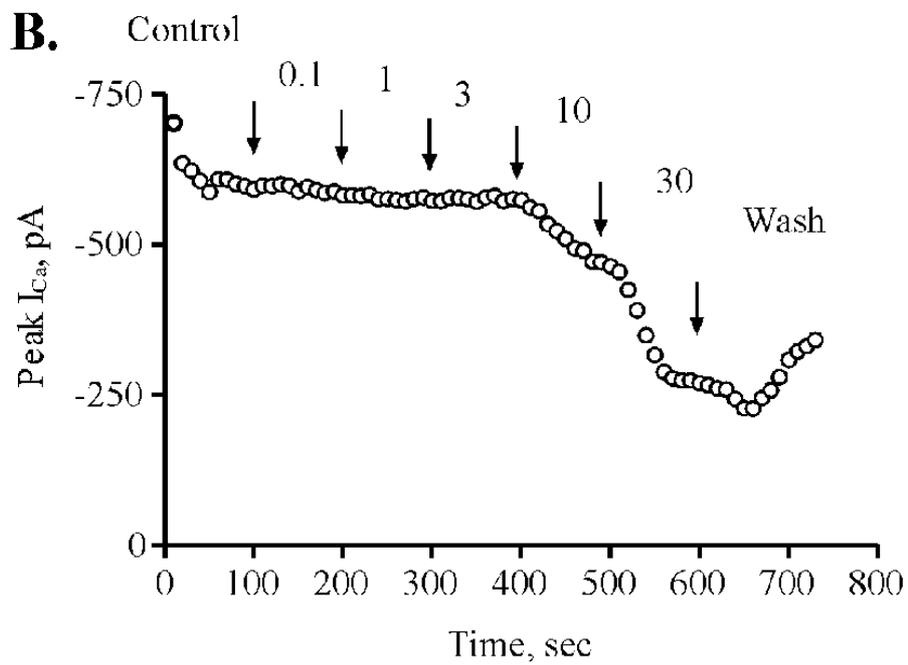
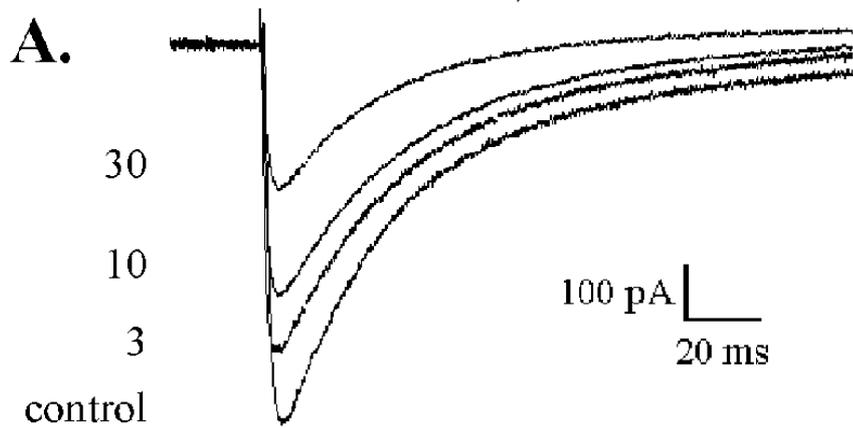
Prinzipiell sind eine Vielzahl verschiedener Konformationen innerhalb des geschlossenen (C: *closed*) und inaktivierten (I: *inactivated*) Zustandes denkbar, deren korrespondierende Paare in einem Gleichgewicht miteinander stehen. Die Komplexität der mathematischen Beschreibung nimmt rapide zu.

Wie oben gezeigt, folgen wir hierbei weiterhin dem Massenwirkungsgesetz, nehmen also stets thermodynamische Gleichgewichts-zustände an; kinetische Betrachtungen gehen nicht ein. Prinzipiell lassen sich für die drei primären Konformationszustände, den Ruhezustand, den inaktivierten Zustand und den Offenzustand eine Reihe weiterer Subkonformationen definieren. Bei genauerer Betrachtung wird aber schnell deutlich, dass der Versuch, weitere untergeordnete Konformationszustände mathematisch in das Modell zu integrieren, einen massiven Anstieg der Komplexität der Gleichungssysteme zur Folge haben würde. Diese sind praktisch kaum noch zu handhaben und ihre Aussagefähigkeit ist kritisch zu bewerten. Da die Mehrzahl der Größen experimentell bestimmt wird, können die aus ihnen mathematisch errechneten Werte nur einen ungefähren Eindruck von der Realität vermitteln.

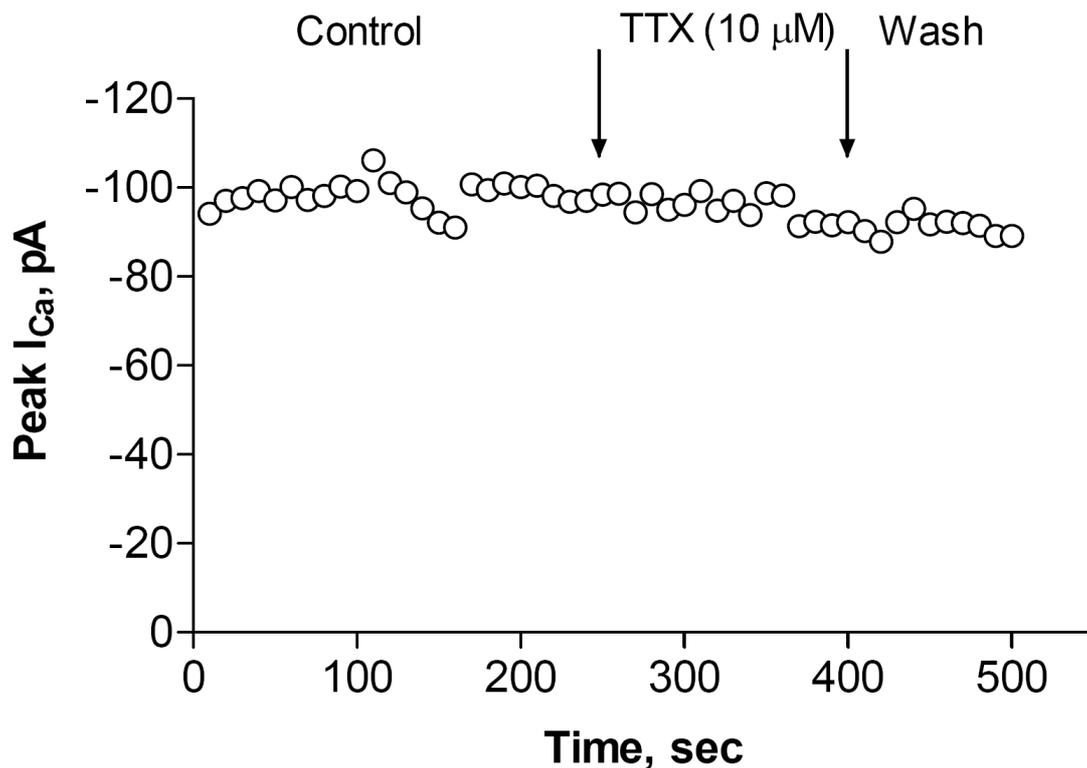
#### **3.4.4. Elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses von Isradipin und Tetrodotoxin auf $Ca_v2.3d$ und $Ca_v2.3e$**

In mit  $Ca_v2.3d$  und  $Ca_v2.3e$  stabil transfizierten HEK-293 Zellen zeigte Isradipin eine dosisabhängige Inhibition des durch die  $Ca_v2.3$  Splicevarianten getragenen Kalziumeinwärtsstromes (Abb. 3.12 A - C). Die sukzessive Applikation ansteigender Isradipinkonzentrationen ergab eine signifikante Inhibition ab einer Konzentration von 3  $\mu M$ , wobei auch nach hohen Isradipinkonzentrationen (30  $\mu M$ ) ein partielles Auswaschen möglich war. Für die (neuronale)  $Ca_v2.3d$  Spleißvariante wurde mittels Hill-Gleichung (siehe oben) der  $IC_{50}$  zu 9,1  $\mu M$  bestimmt, für die kardial dominierende Spleißvariante  $Ca_v2.3e$  zu 14,6  $\mu M$ . Für beide Spleißvarianten wurde weiterhin ein Hill-Koeffizient von 1,2 ermittelt. Diese Resultate korrelieren u.a. gut mit Ergebnissen zur Dihydropyridinempfindlichkeit der  $Ca_v2.3$  Untereinheit des Rattenhirns (Stephens et al., 1997). Damit wird u.a. deutlich, dass  $Ca_v2.3$  in unterschiedlichen Expressionssystemen (HEK-293 Zellen (siehe diese Studie) als auch COS-Zellen (Stephens et al., 1997)), vergleichbare Dihydropyridin-Sensitivitäten aufweist und weiterhin dem in neonatalen Herzen  $Ca_v1.2$  defizienter Mäuse gemessenen „L-Typ ähnlichen“ Strom zugrunde liegen könnte (Seisenberger et al., 2000).

**Abb. 3.12: Isradipin-Empfindlichkeit unterschiedlicher Ca<sub>v</sub>2.3 Spleißvarianten (siehe folgende Seite).** A) Exemplarische Darstellung von Stromkurven unter Kontrollbedingungen (*control*) sowie verschiedenen Isradipinkonzentrationen (3, 10 und 30 μM). Die Versuche wurden an mit Ca<sub>v</sub>2.3d stabil transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt. Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV erfolgte ein Depolarisationsschritt von 400 ms Dauer auf +30 mV mit einer Frequenz von 0,1 Hz. B) Exemplarische Darstellung des Ca<sup>2+</sup>-Spitzeneinwärtsstromes für die sukzessive Applikation eines Testpulses von -50 mV auf +30 mV bei Applikation unterschiedlicher Isradipin-Konzentrationen (0,1; 1; 3; 10 und 30 μM). Der inhibitorische Effekt ist nach Waschen mit Kontrolllösung (Badlösung, *Wash*) partiell reversibel. C) Dosis-Wirkungskurve der Ca<sub>v</sub>2.3 Spleißvarianten Ca<sub>v</sub>2.3d (●) und Ca<sub>v</sub>2.3e (○) unter Isradipin-Applikation. Die Anzahl der untersuchten Zellen je Datenpunkt liegt zwischen 4 und 19. Die dosisabhängige Inhibition wurde mittels Hill-Gleichung approximiert und erbrachte für Ca<sub>v</sub>2.3d einen IC<sub>50</sub> von 9,1 μM sowie für Ca<sub>v</sub>2.3e einen IC<sub>50</sub> von 14,6 μM. Der Hill-Koeffizient beträgt für beide Spleißvarianten 1,2. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM (Lu et al., 2004).



Tetrodotoxin zeigte in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Abnahme des  $\text{Ca}_v2.3$  getragenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstromes (Abb. 3.13). In ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte wurde der  $\text{IC}_{50}$  der  $I_{\text{Ca}(\text{TTX})}$ -Komponente auf 1,7  $\mu\text{M}$  bestimmt (Heubach et al., 2000), so dass davon ausgegangen werden muss, dass  $\text{Ca}_v2.3$  der TTX-sensitiven Kalziumstromkomponente ( $I_{\text{Ca}(\text{TTX})}$ ) im Herzen nicht zugrunde liegt.



**Abb. 3.13: Exemplarische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spitzeneinwärtsstromes für die sukzessive Applikation eines Testpulses von -50 mV auf +30 mV unter Applikation von TTX (10  $\mu\text{M}$ ).** Pipetten- und Badlösung sind mit denen für die Isradipinexperimente verwendeten identisch. Tetrodotoxin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte keine inhibitorischen Effekte auf  $\text{Ca}_v2.3$ .

## 3.5. Elektrokardiographische Untersuchungen an Ca<sub>v</sub>2.3(+|+)- und Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mäusen

### 3.5.1. Grundlegende physiologische Parameter der Maus

Die Maus (*Mus musculus*) unterscheidet sich in einer Vielzahl von physiologischen Parametern z.T. erheblich vom Menschen. Auf wesentliche Unterschiede sei im Folgenden näher eingegangen, da sie u.a. für das operative Vorgehen und die postoperative Behandlung und Nachsorge von zentraler Bedeutung sind. Mäuse zeichnen sich durch eine hohe Herzfrequenz (600 bpm) sowie einen entsprechend hohen Sauerstoffverbrauch aus ( $1,7 \text{ ml O}_2 \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ). Weiterhin sind sie durch eine beeindruckende Fertilität gekennzeichnet, was in theoretischer Betrachtung nach ca. 425 Tage zu ca. 1 Million Nachkommen führen kann. Verschiedene Mausstämme sind in den vergangenen Jahrzehnten gezüchtet worden und werden in der Forschung für eine Vielzahl von Experimenten herangezogen, vor allem für die Erstellung transgener Tiere. Bei der Charakterisierung transgener Tiere sind spezifische anatomische und histologische Eigenarten der Maus besonders zu berücksichtigen. So ist z.B. die Milz bei männlichen Mäusen ca. 50 % größer als bei weiblichen Tieren. Mäuse besitzen nur 1 Schneidezahn (Incisivus) pro Quadrant, keinen Caninus oder Prämolaren, aber drei Molaren. Weibliche Tiere weisen drei Paar thorakale Milchdrüsen sowie zwei Paar inguinale Milchdrüsen auf. Der Magen ist dreigliedrig, bestehend aus einem squamösen, aglandulären und einem glandulären Anteil.

Mäuse zeichnen sich in der täglichen Laborarbeit durch ihre leichte Handhabbarkeit aus. Im Verband demonstrieren sie ein komplexes Sozialverhalten, aber auch territoriale Abgrenzung. Obwohl die für Versuchszwecke gehaltenen Labormäuse mit wenig Platz auskommen, führt der Gedrängefaktor schnell zu Stresssituationen, in deren Verlauf sich die Tiere gegenseitig z.T. massiv verletzen können. Fremdmutilation und Kannibalismus sind dann zu beobachten. Häufig bleibt es bei Bisswunden, die sich meist am Schwanzansatz oder am Rücken finden lassen. Dennoch können derartige Verletzungen auch zu Abszessen, Dermatitisen, Septikämien und schließlich zum Tode führen. Alle verwendeten Tiere wurden daher in Einzelkäfigen gehalten.

Mit maximal zwei bis drei Jahren ist die Lebensdauer von Mäusen recht gering. Weibliche Jungtiere bekommen mit 28 - 40 Tagen ihre Menarche, wobei das

Einsetzen der sexuellen Reife durch eine Reihe von Faktoren, wie den Mausstamm selbst, Jahreszeit, Ernährungsstatus und die Wachstumsrate determiniert wird.

Wie bereits weiter oben ausgeführt, benötigen Mäuse aufgrund ihres ungünstigen Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpervolumen eine im Idealfall auf 21 - 23°C temperierte Umgebung. Die Körpertemperatur von Mäusen kann subkutan, rektal und auch, wie im Falle dieser Arbeit, telemetrisch über die implantierten Transmitter als Körperkerntemperatur gemessen werden. Die Literaturangaben zeigen, dass die subkutane Körpertemperatur bei Mäusen im Mittel 0,6 - 0,8°C unter den rektalen Körpertemperaturmesswerten zurückbleibt. Bei Ratten beträgt der Wert sogar 0,9 - 1,0°C. Weiterhin ist hervorzuheben, dass sowohl bei Mäusen, wie bei Ratten, die Weibchen eine signifikant höhere Körpertemperatur haben als männliche Tiere. Da Mäuse, wie erwähnt, ein ungünstiges Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpervolumen haben, weisen sie eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Hypo- und Hyperthermien auf. So liegen die kritischen Körperkerntemperaturen bei Unterschreiten von 36,5°C sowie Überschreiten von 40,5°C. Temperaturen von > 42°C sind i.d.R. letal. Die Möglichkeit, die Körperkerntemperatur in den hier vorgestellten Versuchen telemetrisch zu erfassen, hat wichtige Hinweise und Erkenntnisse zur postoperativen Erholung geliefert.

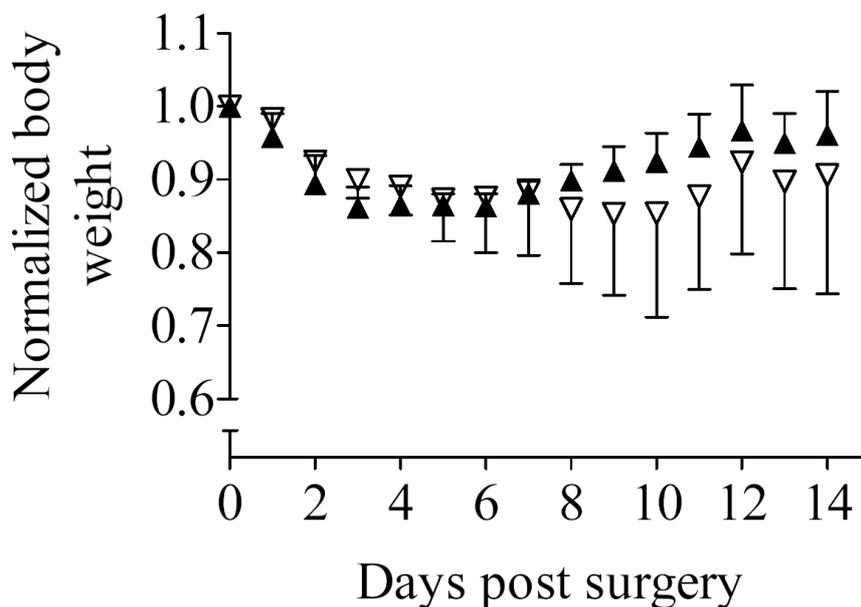
Die wichtigsten physiologischen Parameter sind in der folgenden Zusammenstellung aufgelistet:

Körpergewicht (erwachsenes Männchen)	20 - 40 g
Körpergewicht (erwachsenes Weibchen)	25 - 40 g
Geburtsgewicht	0,5 - 1,5 g
Körperoberfläche (20 g)	36 cm <sup>2</sup>
Körperkerntemperatur	37 - 38°C
Chromosomenzahl (diploid)	40
Lebenserwartung	1,5 - 3 a
Gastrointestinale Passagedauer	8 - 14 h
Fortpflanzungsbeginn (männlich)	50 d
Fortpflanzungsbeginn (weiblich)	50 - 60 d
Zyklusdauer	4 - 5 d
Gestationsdauer	19 - 21 d
Wurfgrösse	bis 10 - 12

Zusammensetzung der Muttermilch	12,1 % Fett; 9 % Protein; 3,2 % Lactose
Herzfrequenz	300 - 650 bpm
Blutdruck (systolisch/diastolisch)	113 - 147 / 81 - 106 mmHg
Blutvolumen	76 - 80 ml/kg
Atemfrequenz	90 - 180 /min
Sauerstoffverbrauch	1,63 - 2,17 ml/g/h
Tägliche Futtermaufnahme	5 g / 24 h
Tägliche Wasseraufnahme	5 ml / 24 h
Umgebungstemperatur	21 - 23°C
Umgebungstemperatur während der postoperativen Erholung	26 - 28°C
Relative Luftfeuchtigkeit	50 - 60 %
Blut-pH	7,35 ± 0,09
Kohlendioxidpartialdruck (pCO <sub>2</sub> )	42 ± 5,7 mmHg
Sauerstoffpartialdruck (pO <sub>2</sub> )	80 - 100 mmHg
[Na <sup>+</sup> ]	128 - 145 mmol/l
[K <sup>+</sup> ]	4,8 - 5,8 mmol/l
Erythrozyten	7,0 - 12,5 X 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
Hämatokrit	39 - 49 %
Hämoglobin	10,2 - 16,6 mg/dl
Leukozyten	6 - 15 X 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Thrombozyten	160 - 410 X 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Serumproteine	3,5 - 7,2 g/dl
Albumin	2,5 - 4,8 g/dl
Globulin	0,6 g/dl
Serumglucose	62 - 175 mg/dl
Harnstoff	17 - 28 mg/dl
Kreatinin	0,3 - 1,0 mg/dl
Cholesterin	26 - 82 mg/dl
Serumkalzium	3,2 - 8,5 mg/dl
Serumphosphat	2,3 - 9,2 mg/dl

### 3.5.2. Postoperative Erholung nach intraperitonealer Implantation des Radiofrequenztransmitters

Nach intraperitonealer Implantation des Radiofrequenztransmitters wurde eine maximale Reduktion des Körpergewichtes zum Tag 4 - 5 post implantationem in  $Ca_v2.3(-/-)$  und  $Ca_v2.3(+/+)$  Tieren ermittelt (siehe Abb. 3.14,  $n = 4$  je Genotyp). Von diesem Zeitpunkt an kam es zu einer langsamen, aber stetigen Zunahme des Körpergewichtes in beiden Genotypen. Obwohl sich  $Ca_v2.3$  geninaktivierte Tiere im Mittel langsamer erholten, liesen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen nachweisen. Zwei Wochen nach Implantation sind schliesslich 90 % ( $Ca_v2.3(-/-)$ ) bzw. 95 % ( $Ca_v2.3(+/+)$ ) des Ausgangsgewichtes wieder erreicht. Zuletzt sei noch erwähnt, dass es im Rahmen des postoperativen Aggressionsstoffwechsels in den ersten Tagen (1 - 4) in beiden Genotypen zu einer uniformen Gewichtsabnahme kommt (man beachte den kleinen SEM). Erst im Zuge der postoperativen Erholung (> 4. Tag) treten dann massive, auch interindividuelle Schwankungen im Körpergewicht auf, was sich im starken Anstieg des SEM widerspiegelt.



**Abb. 3.14: Postoperative Entwicklung des Körpergewichtes nach intraperitonealer Implantation des Radiofrequenztransmitters (TA10ETA-F20).**

Obwohl die  $Ca_v2.3$  defizienten Mäuse (offene Symbole) ihr Körpergewicht langsamer wiedererlangen als die Kontrollgruppe (geschlossene Symbole), finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Man achte auf die starken interindividuellen Schwankungen bei  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen.

### 3.5.3. Elektrokardiographische Aufzeichnungen bei Mäusen

Verschiedene Verfahren sind in der Vergangenheit zur Aufzeichnung von Elektrokardiogrammen bei Mäusen und Ratten angewendet worden und weisen eine Vielzahl von Vor- und Nachteilen auf. In frühen Experimenten wurden Versuchstiere (z.B. Ratten) in eine Röhrenvorrichtung transferiert und immobilisiert (*restraining methods*). Die Extremitäten wurden lateral aus der Röhre ausgelagert und zur Ableitung (analog zu den Extremitätenableitungen des Menschen) herangezogen. Für eine Oberflächenableitung kamen dabei Klemmen zum Einsatz, die zusätzlich durch eine Elektrolytlösung oder ein Kontaktgel leitend mit der Extremitätenoberfläche verbunden werden mussten. Führt man auf diese Weise EKG-Ableitungen z.B. an nicht-narkotisierten Ratten durch, so kann man einen Anstieg der Herzfrequenz von ca. 300 bpm auf 450 - 600 bpm beobachten. Ursache hierfür ist eine stressbedingte sympathische Stimulation, die auch eine Reihe von Arrhythmien zu beeinflussen vermag. Die Qualität der so gewonnenen EKG-Daten ist erwartungsgemäß gering, das Signal-Rausch-Verhältnis niedrig. Zudem besteht ein Verletzungs- und Infektionsrisiko des Versuchstieres und Langzeitaufnahmen über mehrere Stunden sind nicht möglich.

Eine Alternative bietet die Ableitung des EKGs unter Narkose. Hierbei können Oberflächenableitungen in der oben beschriebenen Form durchgeführt werden, oder auch über eine subkutane Platzierung von Kanülen als Ableitelektroden. Beide Verfahren müssen dennoch kritisch beurteilt werden: Die Aufnahme eines EKGs unter Narkosebedingungen ist ähnlich artefaktanfällig wie die Fixierung eines Tieres in einer Plexiglasröhre, da eine Vielzahl von Anästhetika / Narkotika z.T. erhebliche Auswirkungen auf die Herzfrequenz sowie wichtige EKG-Parameter wie PQ-Zeit, QRS-Dauer oder auch das QT-Intervall hat. So ist z.B. die im Rahmen der hier vorgestellten Injektionsexperimente verwendete Ketamin/Xylazin-Kombination für eine *online*-EKG Analyse unter Narkose nur eingeschränkt nutzbar, da Xylazin neben seiner muskelrelaxierenden Eigenschaft auch zu einer markanten Bradykardie führt. Eigene Vorversuche mit C57Bl/6 Mäusen haben gezeigt, dass Xylazin-Konzentrationen von 10 mg/kg Körpergewicht die Herzfrequenz auf bis zu 100 bpm absenken können. In neuerer Zeit kommen auch Kontaktverfahren zum Einsatz, bei denen das Versuchstier auf eine mit Elektroden versehene Kontaktplatte zur Ableitung eines Oberflächen-EKGs positioniert wird. Allerdings sind diese Verfahren

wiederum artefaktanfällig, was sich in einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis widerspiegelt (Chu et al., 2001).

Implantierbare Radiotelemetrie-Vorrichtungen sind dagegen weniger suszeptibel gegenüber Artefakten und ähneln hinsichtlich Qualität und Aussagekraft dem *Monitoring* entsprechender Parameter beim Menschen. Durch die Implantation wird die Gefahr einer Infektion nach vollständiger Wundheilung minimiert und die Datenaufnahme kann ohne Unterbrechung erfolgen. Als Nachteile der telemetrischen Datenerfassung sind allerdings die immer noch hohen Kosten sowie die begrenzte zeitliche Funktionsdauer der Transmitterbatterie zu sehen.

#### **3.5.4. Das Elektrokardiogramm (EKG) einer Wildtyp-Maus**

Das telemetrisch gewonnene Elektrokardiogramm (EKG) einer Wildtyp-Maus unterscheidet sich in einigen Gesichtspunkten z.T. markant vom Elektrokardiogramm des Menschen. Der wohl auffälligste Unterschied ist das Fehlen der ST-Strecke. Die Ursache hierfür ist neben den anatomischen Besonderheiten (v.a. geringe Größe des Mausherzens) in einer partiellen, zeitlichen Koinzidenz von Depolarisations und Repolarisationsprozessen im Ventrikel zu suchen. Elektrophysiologisch betrachtet beruht dieses Phänomen darauf, dass die ventrikulären Repolarisations- und damit Erschlaffungsprozesse bereits zu einem Zeitpunkt einsetzen, zu dem die Depolarisationsfront das komplette Herz noch nicht erfasst hat. Weiterhin fehlt dem Aktionspotential einer ventrikulären Arbeitsmyokardzelle der Maus eine Plateauphase, wie sie für das Aktionspotential ventrikulärer Arbeitsmyokardzellen des Menschen typisch ist. Unterschiede zum EKG des Menschen bestehen darüber hinaus in einer inkonsistenten bis fehlenden Q-Zacke sowie einer fehlenden isoelektrischen Linie. Ansonsten zeigt das Maus-EKG aber alle Charakteristika des Mensch-EKGs. In den hier verwendeten Ableitungen (Einthoven II und v.a. MX-Ableitung) muss eine positive Deflektion der P-Welle erwartet werden. Als primärer Schrittmacher fungiert der Sinusknoten; die orthograde Vorhoferregung bzw. Vorhofdepolarisation in Richtung AV-Knoten führt sodann zur Entstehung der P-Welle. Während die Q-Zacke, wie bereits erwähnt, inkonsistent ist, findet sich der typische Kammerkomplex ((Q)RS). Direkt daran anschließend folgt die T-Welle, repräsentativ für die ventrikuläre Repolarisationsphase. Die T-Welle der Maus findet sich aber nicht in allen Ableitungen. Das hochspezialisierte Erregungsleitungssystem des Herzens, in seinen terminalen Ausläufern das Purkinjefaser-System, sorgt dann

für eine regelrechte Ausbreitung der Depolarisationsfront über das Myokard hinweg. Beim Menschen beträgt die normale QRS-Breite 0,07 - 0,11 s; eine QRS-Verbreiterung weist auf eine pathologische Veränderung hin, wie z.B. einen kompletten Rechts- oder Linksschenkel-Block. Eine Dauer von 0,16 s wird aber auch dann selten überschritten. Das QT-Intervall beträgt im Mittel ca. 400 ms, wobei es bei genauer Betrachtung einer sog. Frequenzkorrektur bedarf (London, 2001).

Der hochamplitudige QRS-Komplex der Maus dauert i.d.R. nur ca. 20 ms oder weniger. Optische sog. *Mapping*-Studien haben gezeigt, dass sich das Aktionspotential bei der Maus bei Vorliegen eines Sinusrhythmus in 5 - 10 ms über die Ventrikel ausbreitet (Baker et al., 2000). Da dem Kardiomyozyten-Aktionspotential der Maus ein Plateau, wie es beim Menschen typisch ist, fehlt, beträgt die  $APD_{75}$  nur ca. 15 ms.

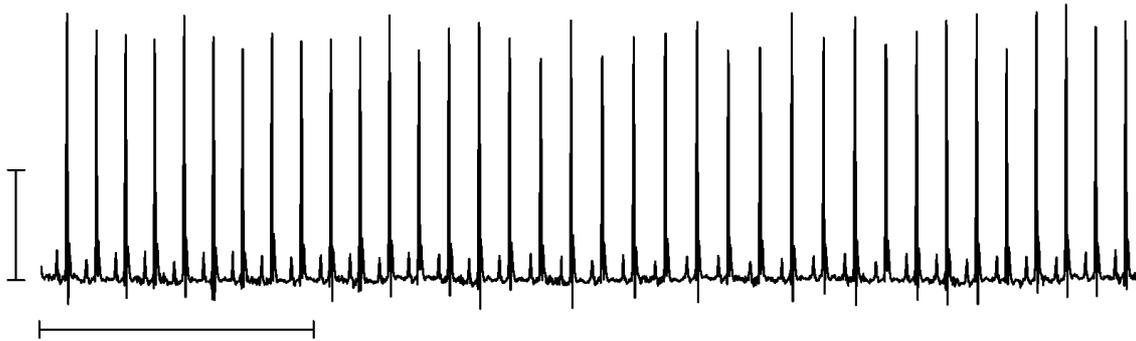
Auch andere Nagetiere, z.B. Ratten, zeigen die oben beschriebenen EKG-Auffälligkeiten. Wie bereits weiter oben dargelegt wurde, resultieren eine Vielzahl von Ergebnissen zum Elektrokardiogramm von Nagetieren aus frühen Rattenversuchen, die z.T. unter Narkose, z.T. aber auch unter immobilisierenden Maßnahmen am nicht-narkotisierten Tier durchgeführt worden sind. Derartige Untersuchungen an großen Rattenpopulationen haben gezeigt, dass es innerhalb dieser Spezies keine geschlechtsspezifischen Unterschiede geben soll. Dies betrifft u.a. die Herzfrequenz, aber auch EKG-Intervalle und Strecken. Neuere Untersuchungen haben allerdings dargelegt, dass diese generelle Annahme kritisch hinterfragt werden muss. So finden sich bei Mäusen durchaus geschlechtsspezifische Unterschiede wichtiger kardiovaskulärer Parameter sowie des Elektrokardiogramms.

Veränderungen des Maus-EKGs sowie deren Interpretation müssen mit Vorsicht betrachtet werden. Berücksichtigt man das oben dargelegte, so kann z.B. eine Prolongation des QRS Komplexes sowohl auf einer Alteration der ventrikulären Erregungsausbreitung beruhen als auch auf einer verzögerten Repolarisation.

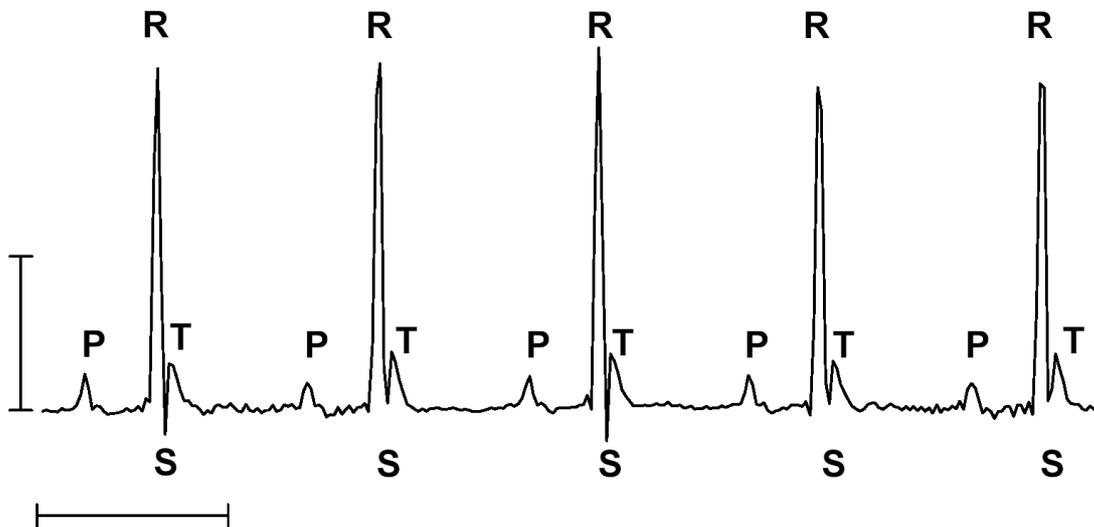
Die offensichtlichen anatomischen Größenunterschiede zwischen Maus und Menschherzen haben auch funktionelle Konsequenzen. Die mittlere Herzfrequenz der Maus bewegt sich so z.B. zwischen 600 - 700 bpm und ist damit um den Faktor 10 höher als beim Menschen. Es hat sich gezeigt, dass u.a. die geringe Größe des Mausherzen das Auftreten und Sistieren anhaltender Arrhythmien unter elektrophysiologischen Gesichtspunkten beeinflusst. So lassen sich zwar ventrikuläre Tachykardien und ventrikuläre Fibrillationen (Kammerflimmern) beim Mausherzen

auslösen, i.d.R. kommt es aber zu einer spontanen Reversion zum Sinusrhythmus. Diese Besonderheit wurde auch in den eigenen Versuchen bestätigt, wie Abb. 3.26 zeigt.

**A**



**B**



**Abb. 3.15: Elektrokardiogramm einer Kontrollmaus.** Regelmäßige EKG-Spur in A) sowie in höherer Auflösung in B). Deutlich ist die positive P-Welle, der Kammerkomplex ((Q)RS) sowie die T-Welle zu erkennen. Sie folgt unmittelbar der S-Zacke während die ST-Strecke fehlt. Die Ableitung erfolgte mit Elektroden in der MX-Anordnung.

Studien haben gezeigt, dass es zwischen verschiedenen Maustämmen (C57Bl/6, 129Sv etc. ) Unterschiede in wesentlichen kardiovaskulären Parametern wie z.B. der Herzfrequenz gibt. So wurden in C57Bl/6 und 129Sv-Mäusen signifikant höherer Herzfrequenzen bei weiblichen Tieren als bei männlichen Tieren gefunden (Chu et

al., 2001). Die geschlechts- und auch stammabhängigen Unterschiede der Herzfrequenz sind wahrscheinlich das Resultat unterschiedlicher Hormonstatus, die die kardiovaskuläre Regulation auch auf Ebene des autonomen Nervensystems mit beeinflussen. Nur eine geringe Anzahl von Studien hat sich bislang mit der Entwicklung des EKGs bei neonatalen Mäusen beschäftigt. Interessanterweise sind geschlechtsspezifische Unterschiede wie man sie z.B. bei erwachsenen C57Bl/6 Mäusen findet, bei neonatalen Mäusen desselben Stammes noch nicht vorhanden (Chu et al., 2001). Dies wird u.a. auf eine reduzierte sympathische bzw. parasympathische Aktivität zurückgeführt (Sugihara et al., 1996). Auch nimmt der RR-Abstand im Laufe der neonatalen Entwicklung immer mehr ab, was eine Zunahme der Herzfrequenz zur Folge hat.

### **3.5.5. Qualitative Analyse des Elektrokardiogramms $Ca_v2.3$ defizienter sowie $Ca_v2.3(+/+)$ Mäuse**

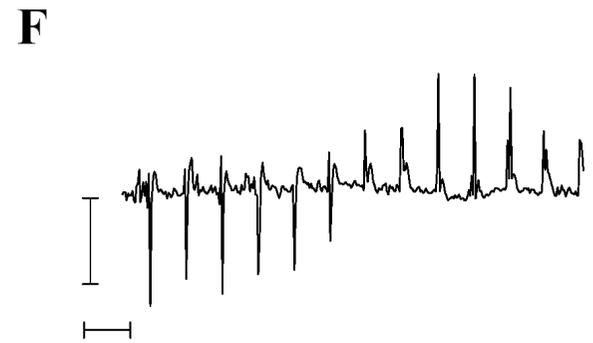
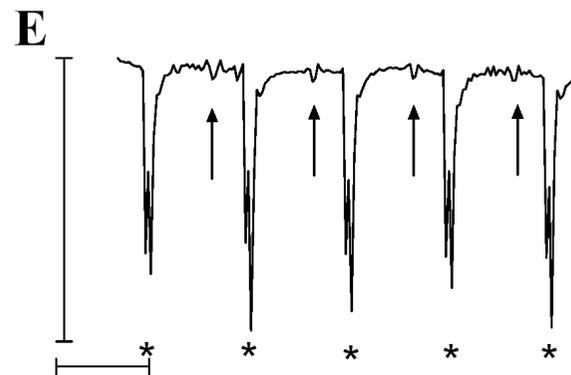
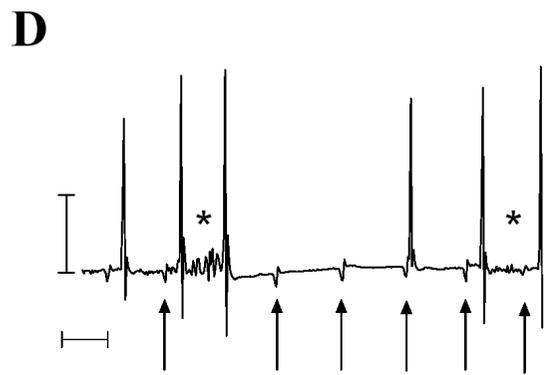
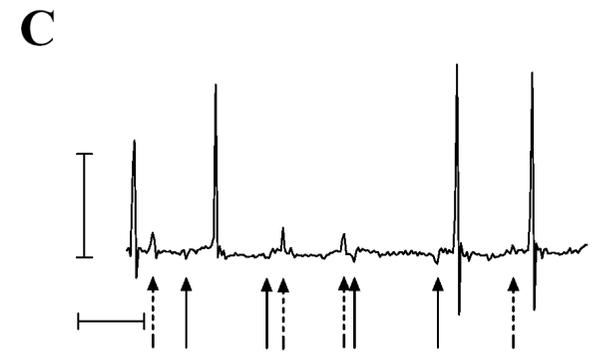
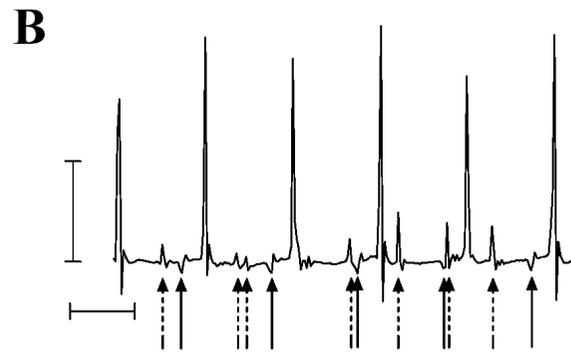
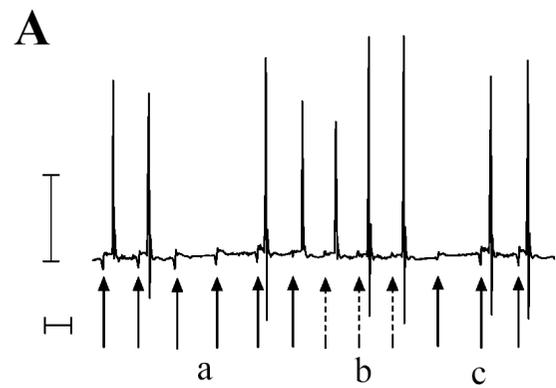
Im Vergleich zu den obigen Ausführungen zum Elektrokardiogramm von Kontrollmäusen fanden sich bei  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen z.T. deutliche Alterationen. Zunächst muss man darauf hinweisen, dass auch Kontrolltiere Arrhythmien aufweisen können. Dies ist nicht weiter erstaunlich, wenn man bedenkt, dass auch gesunde Menschen (Probanden) vereinzelt z.B. Extrasystolen aufweisen und berücksichtigt, dass es viele elektrophysiologische Gemeinsamkeiten zwischen Maus- und Menschherzen gibt. Allerdings sind Schweregrad und Häufigkeit dieser Rhythmusstörungen unter kardiovaskulären Gesichtspunkten pathologisch irrelevant. Bei verschiedenen Mausstämmen wurden so in der Vergangenheit z.B. bradykarde Rhythmusstörungen, aber auch AV-Blöcke 1. und 2. Grades Typ I (Wenckebach) sowie Typ II (Mobitz) beschrieben (London, 2001). Auch Sinuspausen bis hin zum Sinusarrest sowie wandernde Schrittmacheraktivität im Bereich des Sinusknotens wurden schon bei Wildtyp-Mausstämmen beschrieben. Spontane Arrhythmien können also auch in der Kontrollpopulation auftreten, die keinem experimentellen Prozedere ausgesetzt wurde. Es muss noch berücksichtigt werden, dass auch die EKG-Ableitung selbst (über die Elektrodenplatzierung sowie die intraperitoneale Transmitterimplantation) einen potentiellen arrhythmogenen Stimulus darstellen kann.

Dennoch stellen Arrhythmien in der Kontrollpopulation ein seltenes Ereignis dar. Sie markieren den elektrokardiographischen Kontrollhintergrund in der hier vorgestellten qualitativen EKG-Analyse  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse.

Insgesamt wurden vier  $Ca_v2.3$  defiziente und vier Kontrollmäuse elektrokardiographisch untersucht. Wie Abb. 3.16 zeigt, liegen bei  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen eine Reihe von deutlichen EKG-Alterationen vor, die auf eine Beteiligung unterschiedlicher Bereiche des Erregungsbildungs- und Leitungssystems hindeuten. So fanden sich zunächst Störungen der atrioventrikulären Überleitung, d.h. AV-Blöcke 2. Grades mit 2 : 1 und auch 3 : 1- Überleitungsstörung (Typ Mobitz, Abb. 3.16 A, C).  $Ca_v2.3$  defiziente Tiere wiesen darüber hinaus überwiegend P-Wellen negativer Amplitude auf (> 90 % der Aufnahmedauer). In der hier angewandten Ableittechnik muss bei orthograder Vorhoferregung jedoch mit einer positiven Deflektion gerechnet werden. Es liegt daher nahe, dass eine Störung der atrialen Erregungsausbreitung vorliegt, deren Ursprung allerdings mit einer einzelnen Ableitung, wie hier dargestellt, nicht sicher bestimmt werden kann. So ist eine wandernde Schrittmacheraktivität im Sinusknoten, ektope Erregungsbildung in den Atrien oder auch ein Sinusarrest/Sinuspause mit untergeordneter sekundärer Schrittmacheraktivität denkbar (Abb. 3.16 A - C). In  $Ca_v2.3$  geninaktivierten Tieren fanden sich zudem auch komplexe atriale Aktivierungsstörungen mit P-Wellen unterschiedlicher Morphologie, Amplitude und Polarität (Abb. 3.16 B). Durchweg zeigte sich jedoch, dass die in diesem Zusammenhang auftretenden positiven P-Wellen nicht übergeleitet wurden. Gelegentlich fanden sich auch Kombinationen aus 3 : 1 Blockbildern und atrialen Aktivierungsstörungen (Abb. 3.16 C). Auf ventrikulärer Ebene zeigten sich Störungen der QRS-Morphologie. So fanden sich neben invertierten und gesplitteten QRS-Komplexen auch Umkehrungen der *Peak*-Polarität der Kammerkomplexe (Abb. 3.16 E - F). Sie deuten auf eine Störung der ventrikulären Erregungsausbreitung hin.

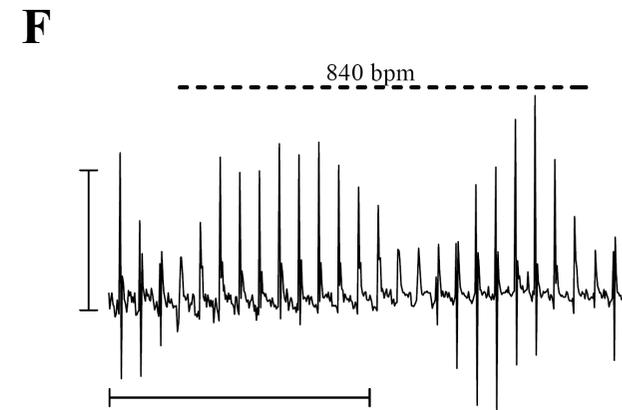
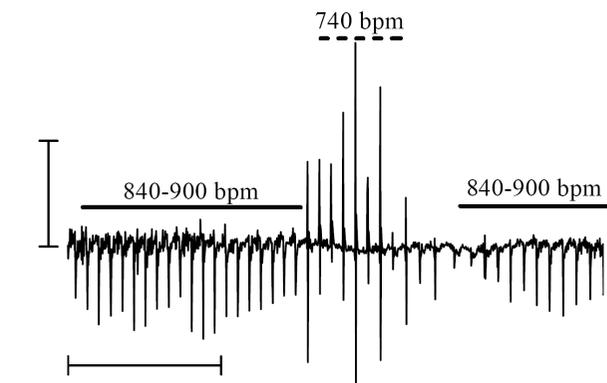
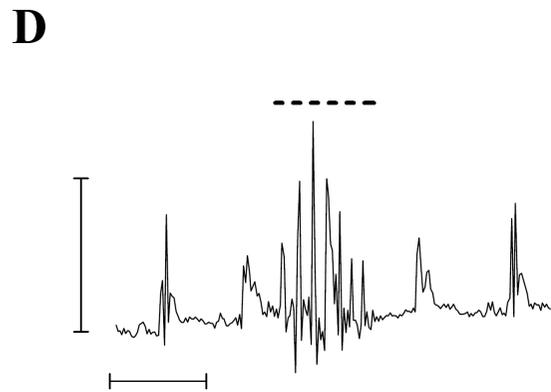
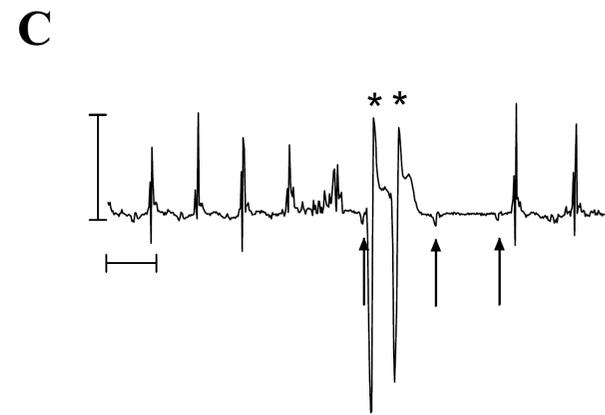
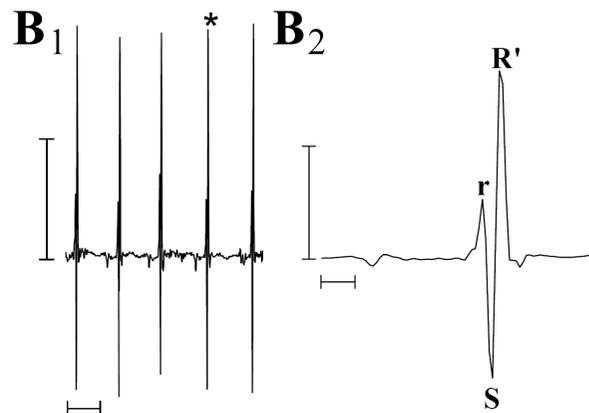
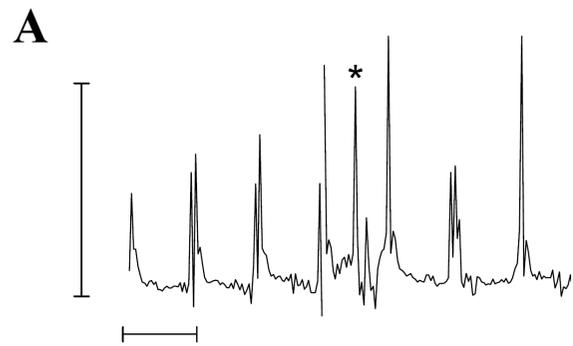
Während die obigen EKG-Alterationen ein zeitlich konstantes Merkmal  $Ca_v2.3$  geninaktivierter Tiere darstellen, traten eine Reihe von Rhythmusstörungen nur selten bei  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren auf, nicht jedoch bei Kontrolltieren (siehe Tab. 3.1). Hierzu gehörten ventrikuläre Extrasystolen, rSR'-Morphologien, Couplets, transiente und langandauernde ventrikuläre Tachykardien sowie supraventrikuläre Tachykardien (Abb. 3.17).

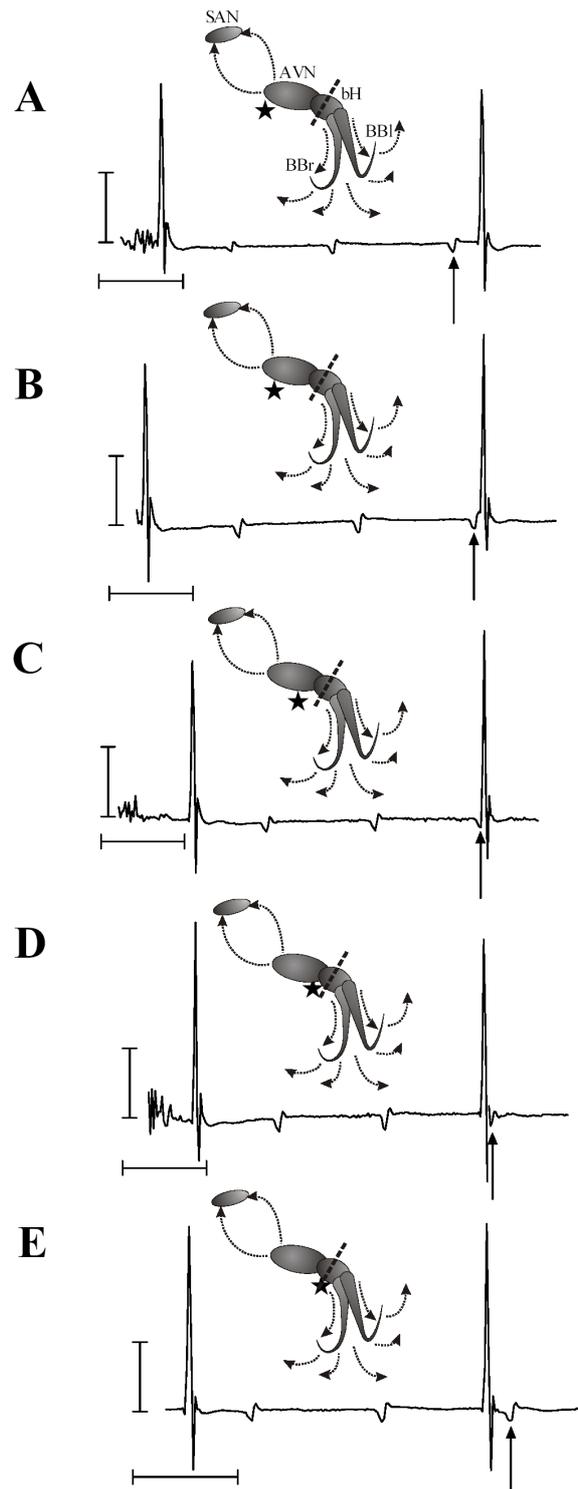
In einigen Fällen zeigten sich interessante 3 : 1-Blockbilder mit alterierter P-Wellen-Morphologie, die auf eine wandernde Schrittmacheraktivität entweder ektop in den Atrien oder im AV-Knoten bis oberem His-Bündel zurückzuführen ist. Wie Abb. 3.18 zeigt, kommt es dabei zum sukzessiven Zusammenfallen der P-Welle mit der Q-Zacke, der S-Zacke und zuletzt auch der T-Welle, so dass diese fast vollständig ausgelöscht wird. Schliesslich folgt die P-Welle dem QRS-Komplex und täuscht damit sogar ein 2 : 1 Blockbild vor. Diese Änderung der zeitlichen Relation von P-Welle zu QRS-Komplex deutet darauf hin, dass eine wandernde Aktivität in einem untergeordneten Schrittmacherzentrum vorliegt, die zunehmend eine frühzeitige Aktivierung der Ventrikel bei verzögerter Aktivierung der Atrien zur Folge hat. Zur Quantifizierung der einzelnen Rhythmusstörungen siehe auch Tab. 3.1.



**Abb. 3.16: Qualitative Analyse des Elektrokardiogramms  $Ca_v2.3$  defizienter Tiere (I) (siehe vorherige Seite).** Vertikale Balken: 0,5 mV; horizontale Balken: 0,1 s. A) Darstellung einer atrioventrikulären Überleitungsstörung (AV-Block 2. Grades Typ II (3:1 (a)- und 2:1 (c)-Block). Man achte auf die Änderung der P-Wellen-Morphologie (b, gestrichelte Pfeile). B) Atriale Aktivierungsstörung. Man berücksichtige v.a. die unterschiedliche P-Wellenmorphologie, Amplitude und Polarität. C) Kombination aus den in A) und B) beschriebenen Phänomenen: AV-Block (3 : 1) und atriale Erregungsstörung. D) 3:1-Block mit möglichem ektopten atrialen Schrittmacher oder tiefem Schrittmacher im His-Bündel. Die dritte P-Welle koinzidiert mit der Q-Zacke. Deutlich sind die Respirationsartefakte (EMG-Artefakte der Respirationsmuskulatur, \*) zu sehen. E) QRS-Dysmorphologie mit invertierten und gesplitteten QRS-Komplexen (\*). F) QRS-Dysmorphologie mit alternierender Polarität der Kammerkomplexe. P-Wellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

**Abb. 3.17: Qualitative Analyse des Elektrokardiogramms  $Ca_v2.3$  defizienter Tiere (II) (siehe folgende Seite).** Vertikal Balken: 0,5 mV; horizontale Balken: 0,1 s (anderenfalls gesondert gekennzeichnet). A) Darstellung einer vorzeitigen ventrikulären Erregung ohne kompensatorische Pause.  $B_{1/2}$ ) rSR'-Phänomen als Hinweis auf eine Leitungsverzögerung in einem Tawara-Schenkel (Schenkel-Block). Horizontaler Balken in  $B_2$ : 0,01 s. C) Seltenes Phänomen einer Koinzidenz von AV-Block 2. Grades mit 3 : 1-Überleitungsstörung (Pfeile) und dem Auftreten eines Couplets. D) Kurzanhaltende (transiente) ventrikuläre Tachykardie (*nonsustained ventricular tachycardia*). E) Ventrikuläre Tachykardie mit Frequenzen von 840 - 900 bpm. Horizontaler Balken: 1 s. F) Supraventrikuläre Tachykardie (840 bpm). Horizontaler Balken: 1 s.





**Abb. 3.18: Wandernde Schrittmacheraktivität und atrioventrikuläre Überleitungsstörungen bei  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen.** Darstellung von AV-Blöcken 2. Grades mit einer 3 : 1 Überleitungsstörung (Typ Mobitz), wobei sich die räumliche und damit auch zeitliche Relation zwischen der dritten atrialen Erregung (P-Welle) und der Kammererregung im Laufe der Zeit ändert. Mit zunehmender Deszendenz des Schrittmacherzentrums wird die ventrikuläre Erregung zeitlich begünstigt und die atriale relativ dazu verzögert.

ECG Phenotype	Frequency	Control mice					Ca <sub>v</sub> 2.3(-/-) Mice				
		WT1	WT2	WT3	WT4	total	KO1	KO2	KO3	KO4	total
Escape rhythm		<10 %	<10 %	<10 %	<10 %		>90 %	>90 %	>90 %	>90 %	
2 <sup>nd</sup> degree AV block	2:1 (>10/h)	-	-	-	-	0/4	+	+	+	+	4/4
	3:1 (>10/h)	-	-	-	-	0/4	+	+	+	-	3/4
Atrial premature contraction (APC)	>10/h	-	-	-	-	0/4	+	+	-	+	3/4
Supraventricular tachycardia		-	-	-	-	0/4	+	-	-	-	1/4
Ventricular premature contraction (VPC, ventricular ectopic beats)	>10/h	-	-	-	-	0/4	+	+	+	-	3/4
Couplets		-	-	-	-	0/4	-	-	-	+	1/4
Nonsustained ventricular tachycardia (<1 s)	>10/h	-	-	-	-	0/4	+	+	+	+	4/4
Sustained ventricular tachycardia (>5 s)		-	-	-	-	0/4	+	-	-	-	1/4
QRS-dysmorphology (split/inverted QRS complex, rSR' morphology)		-	(+)	-	-	1/4	+	+	+	+	4/4

**Tab. 3.1: Auftreten unterschiedlicher Rhythmusstörungen in vier Kontroll- und vier Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mäusen (siehe folgende Seite).** Vier Tiere jeden Genotyps (4. Rückkreuzung) wurden auf das Auftreten unterschiedlicher EKG-Entitäten analysiert. Die Analyse erfolgte aus einer Langzeitaufzeichnung (24 h) zwei Wochen post implantationem.

### **3.5.6. Quantitative Analyse des Elektrokardiogramms - Herzfrequenzvariabilität**

#### **3.5.6.1. Allgemeine Grundlagen**

Neben der qualitativen Analyse des Elektrokardiogramms spielt die quantitative, statistische Analyse der Herzfrequenzvariabilität eine zentrale Rolle. Die quantitative Analyse beinhaltet zum einen die sog. zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität als auch die sog. frequenzbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität. In der hier vorliegenden Arbeit werden die Resultate der zeitbasierten Analyse dargelegt. Hinsichtlich des Beobachtungszeitraumes kann man sog. Kurzzeitanalysen (*short-term analysis*), die sich meist auf Minutenzeiträume beschränken, und sog. Langzeitanalysen (*long-term analysis*), die sich über Stunden oder Tage erstrecken können, unterscheiden.

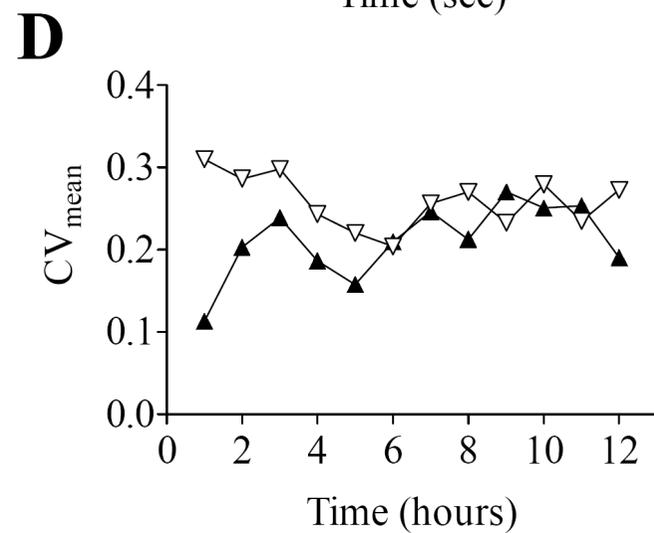
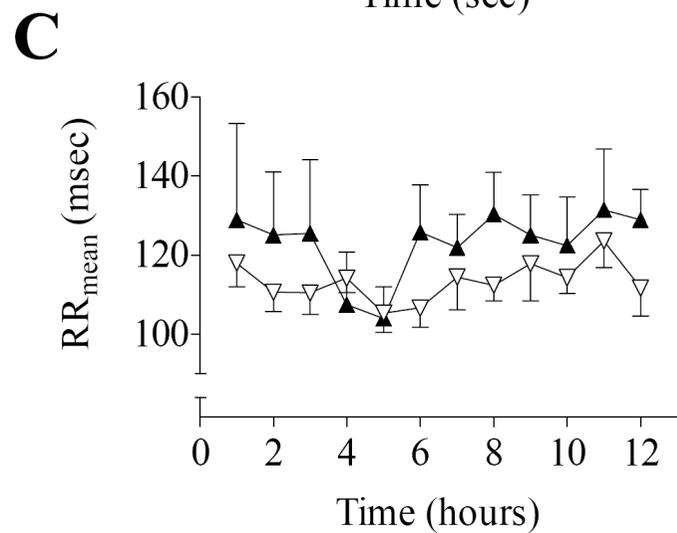
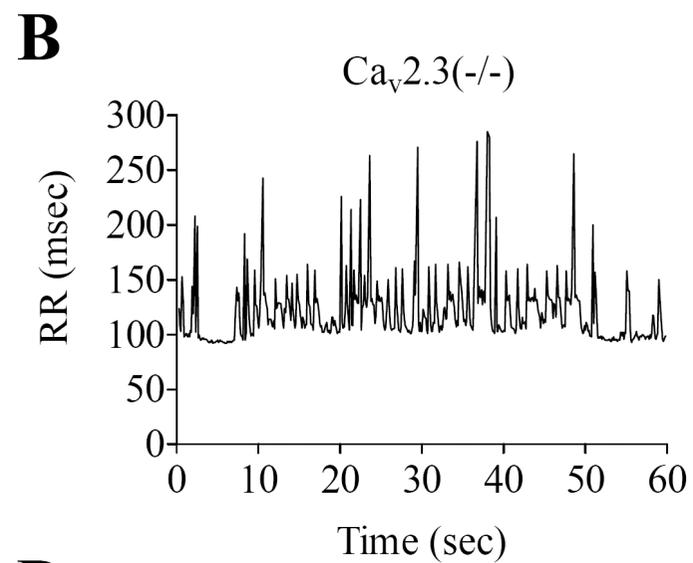
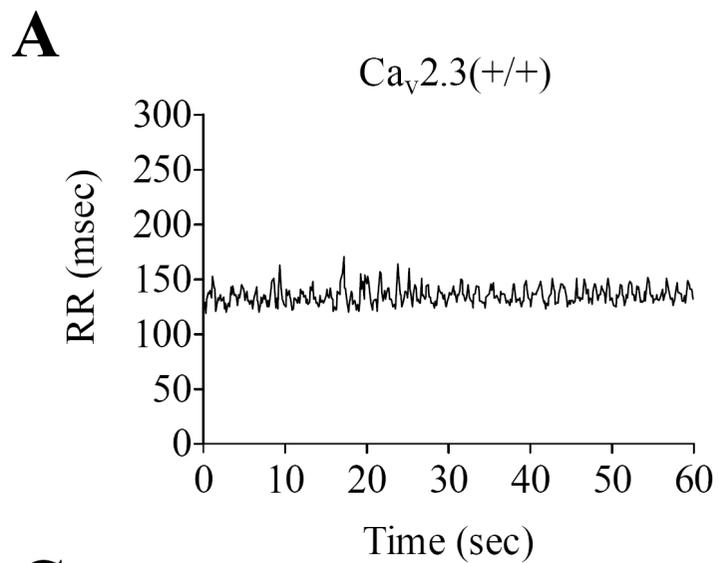
#### **3.5.6.2. Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität (*time domain analysis of heart rate variability*)**

Die sog. zeitbasierte (oder Zeitbereichs-) Analyse der Herzfrequenzvariabilität umfasst die ermittelten RR-Abstände (in s oder ms) bzw. die Herzfrequenz (in Schlägen/min bzw. bpm). Die im Rahmen der vorgestellten Versuche verwendete Software (Dataquest™ A.R.T.™ 2.2 (DSI)) analysiert RR-Abstände (*interbeat intervals*, IBI), so dass die Ergebnisdarstellung in RR-Abständen und nicht unmittelbar in Frequenzwerten erfolgt.

Die zeitbasierte Langzeitanalyse der Herzfrequenzvariabilität für 12 h (18<sup>00</sup> - 6<sup>00</sup>) zwei Wochen nach Implantation ergab, dass Ca<sub>v</sub>2.3 defiziente Mäuse einen signifikant geringeren mittleren RR-Abstand aufwiesen als die Kontrolltiere (113,3 ± 1,5 ms v. 123,0 ± 2,5 ms, p = 0,0012, Abb. 3.19 A, B, C). In den Nachtstunden, v.a. zwischen 22<sup>00</sup> und 0<sup>00</sup> Uhr fällt ein aktivitätsbedingter Anstieg der Herzfrequenz bei den Kontrolltieren auf, der sich in der Ca<sub>v</sub>2.3 geninaktivierten Population nicht findet (Abb. 3.19 C). Auf die Bedeutung dieses Phänomens wird noch weiter unten genauer eingegangen. Neben einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz zeigte sich darüber hinaus auch eine signifikante Erhöhung des Variationskoeffizienten (CV) bei Ca<sub>v</sub>2.3(-/-) Tieren (0,259 ± 0,009 v. 0,211 ± 0,01; p = 0,0202), eine Beobachtung, die nicht überrascht, wenn man sich die im vorherigen Abschnitt dargelegten Rhythmusstörungen vergegenwärtigt. Das Telemetriesystem ermöglicht es weiterhin, auch die Horizontalbewegungen der Versuchstiere zu erfassen. Interessanterweise stellte sich heraus, dass der hieraus abgeleitete Aktivitätsindex bei Ca<sub>v</sub>2.3(-/-) Tieren

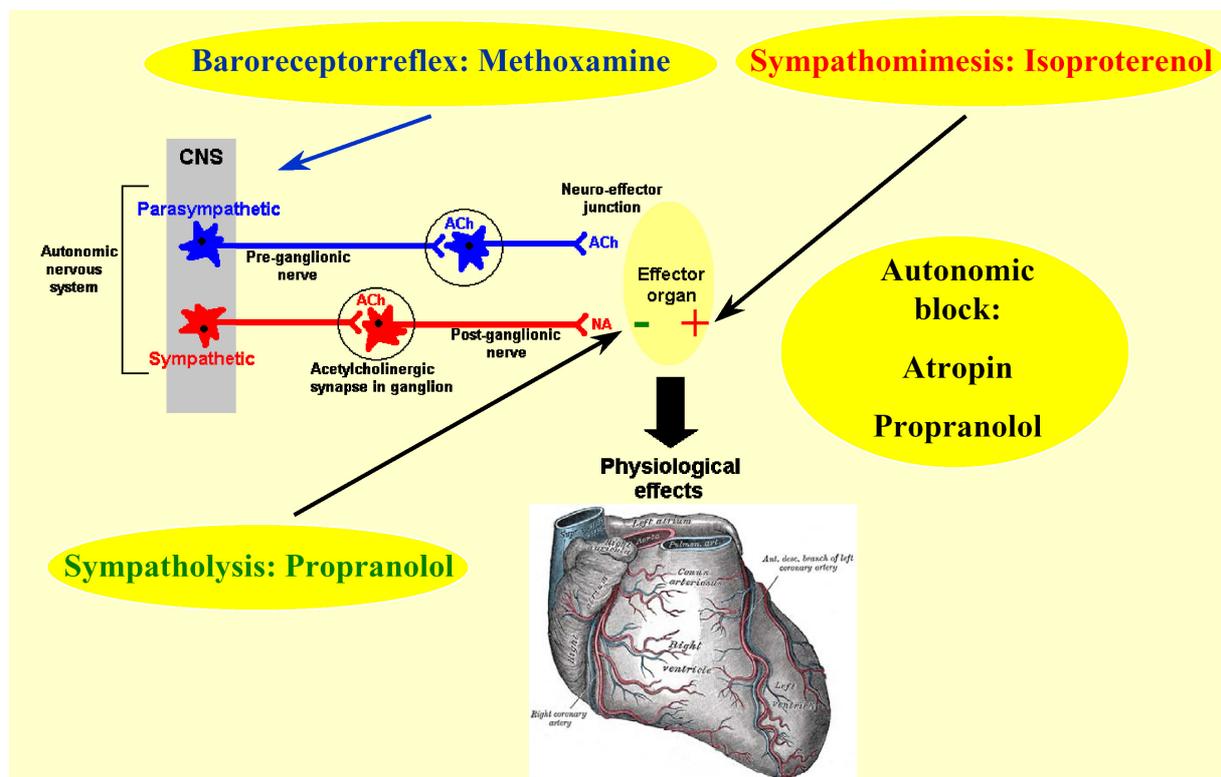
signifikant geringer ist ( $3,14 \pm 0,24$  v.  $5,31 \pm 0,73$ ,  $p = 0,013$ ), trotz erhöhter Herzfrequenz.

**Abb. 3.19: Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität in  $Ca_v2.3(+|+)$ - und  $Ca_v2.3(-|-)$  Mäusen (siehe folgende Seite).** A, B) Repräsentative Darstellung des RR-Abstandes über einen Beobachtungszeitraum von 60 s. Der erste visuelle Eindruck eines verringerten RR-Abstandes sowie einer erhöhten Frequenzvariabilität bestätigte sich in Langzeitbeobachtungen (12 h) für den mittleren RR-Abstand (C) sowie den mittleren Variationskoeffizienten (D, Weiergräber et al., 2005a).



### 3.5.7. Qualitative und quantitative Analyse pharmakologischer Injektions- experimente

Einer der wohl wichtigsten extrakardialen Modulatoren des kardiovaskulären Systems und des Herzens im Besonderen ist das autonome Nervensystem. Um den Einfluss des Sympathikus und Parasympathikus auf den kardiovaskulären Phänotyp einer transgenen Maus zu eruieren, können eine Reihe von Injektionsexperimenten durchgeführt werden (Abb. 3.20). Um herzeigene von herzfremden Eigenschaften zu differenzieren, eignet sich der pharmakologische Block mittels Atropin und Propranolol. Zur Testung der Reaktivität des sympathischen Astes kann Propranolol zur Simulation einer Sympathikolyse und Isoproterenol zur Simulation einer Sympathikomimese herangezogen werden. Will man den parasympathischen Ast auf Reaktivität testen, so liegt eine Provokation des Barorezeptorreflexes (Testung der sog. kardiinhibitorischen Funktion) nahe, zu dessen Auslösung i.d.R. Methoxamin dient. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Injektionsexperimente in  $Ca_v2.3(+|+)$  sowie  $Ca_v2.3$  defizienten Tieren im Detail dargelegt.



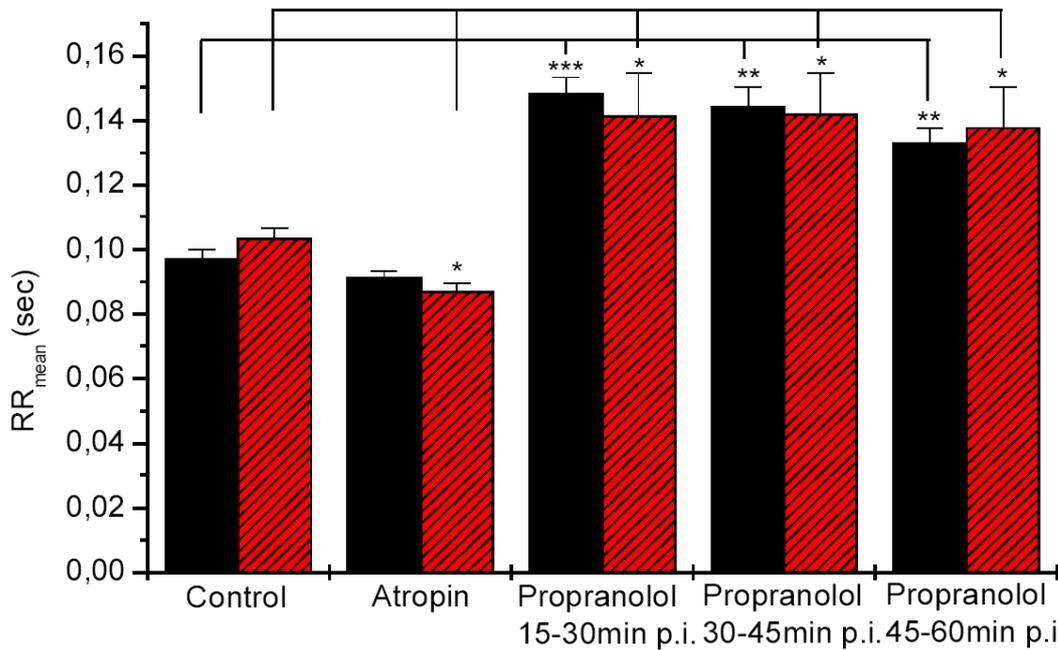
**Abb. 3.20: Autonome (sympathische und parasympathische) Modulation des Herzens:** Eine Auswahl von Substanzen, die zur pharmakologischen Interaktion mit dem sympathischen und parasympathischen Ast verwendet wurden.

### **3.5.8. Pharmakologische autonome Denervation (autonomer Block) mittels Atropin und Propranolol**

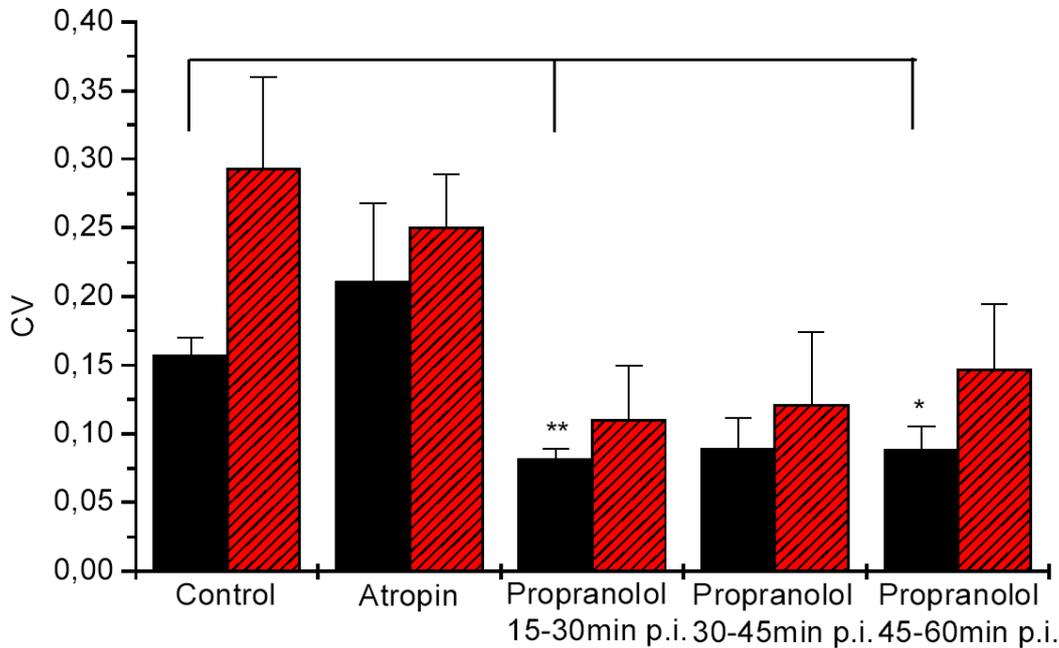
Wie bereits weiter oben ausgeführt, zeigen  $Ca_v2.3$  geninaktivierte Tiere nicht nur eine Reihe von EKG-Auffälligkeiten, sondern auch eine Erhöhung der Herzfrequenz sowie des zugehörigen Variationskoeffizienten. Um zu erfassen, ob dies das Resultat einer intrinsisch kardialen Alteration oder einer Tonusänderung im autonomen Nervensystem ist, wurde eine autonome pharmakologische Denervierung mit Atropin (1 mg/kg) und Propranolol (20 mg/kg) durchgeführt.

Wie Abb. 3.21 (A) zeigt, kommt es bei Kontrolltieren und  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen im Vergleich zu Ruheaufzeichnungen zwar zu signifikanten Anstiegen des RR-Abstandes, aber signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen zeigen sich nach autonomem Block nicht mehr. Damit wird deutlich, dass die erhöhte Herzfrequenz bei  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen offensichtlich keine intrinsisch-kardiale Alteration ist, sondern das Resultat eines veränderten autonomen Inputs. Da Mäuse eine hohe Basalaktivität des sympathischen Nervensystems aufweisen, die u.a. die hohen Ruhefrequenzen bedingt, muss davon ausgegangen werden, dass der Parasympathikotonus vernachlässigbar gering ist. Qualitativ finden sich in Kontrolltieren nach autonomem Block keine Auffälligkeiten (Abb. 3.22 A). In  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen zeigen sich weiterhin atriale Aktivierungsstörungen sowie QRS-Dysmorphologien, jedoch sind die AV-Blöcke nicht mehr vorhanden (Abb. 3.22 B, C). Dies hat auch entsprechende Konsequenzen für den Variationskoeffizienten. Wie zu erwarten, findet sich zunächst in beiden Genotypen nach autonomem Block eine Reduktion des Variationskoeffizienten (Abb. 3.21 B). Während dieser Rückgang jedoch in der Kontrollgruppe signifikant ist, zeigt sich bei  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen keine signifikante Reduktion – ein Effekt, der u.a. auf die verbliebenen Rhythmusstörungen zurückgeführt werden kann.

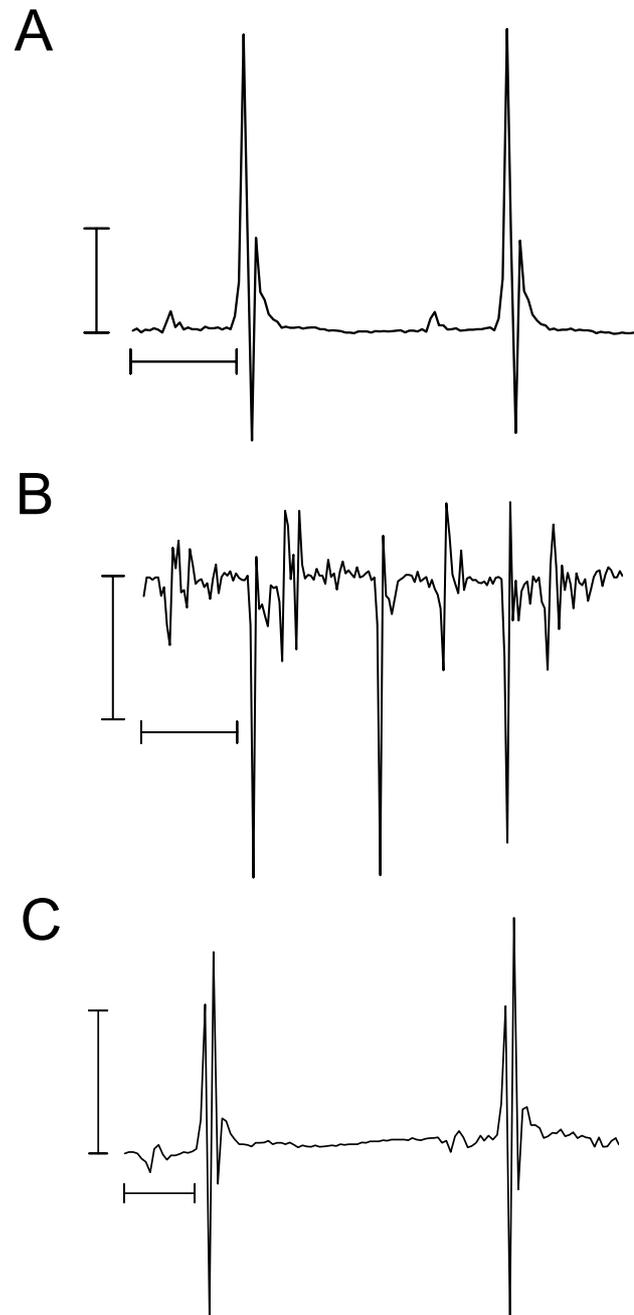
**A** RR-intervals after autonomic blockade following i.p. administration of atropin (1mg/kg) and propranolol (20mg/kg)



**B** Coefficient of variance after autonomic blockade following i.p. administration of atropin (1mg/kg) and propranolol (20mg/kg)



**Abb. 3.21: Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität nach autonomem Block mittels Atropin (1 mg/kg) und Propranolol (20 mg/kg).** Darstellung der mittleren RR-Abstände (A) sowie des Variationskoeffizienten (B). Fünfzehn Minuten nach Atropin-Administration erfolgte die Injektion von Propranolol, dessen Effekte über drei Intervalle (15 - 30 min, 30 - 45 min und 45 - 60 min p.i.) analysiert wurden.



**Abb. 3.22: Elektrokardiogramm nach pharmakologischer autonomer Denervation mittels Atropin und Propranolol. A)  $Ca_v2.3(+|+)$ -EKG. B, C) EKG  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse. Die AV-Blöcke 2. Grades (Mobitz-Typ) sind nach autonomem Block nicht mehr nachweisbar. Verikale Balken: 0,25 mV. Horizontale Balken: 0,05 s (A, C); 0,1 s (B).**

### **3.5.9. Barorezeptorreflex-Aktivierung und Testung des parasympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Methoxamin**

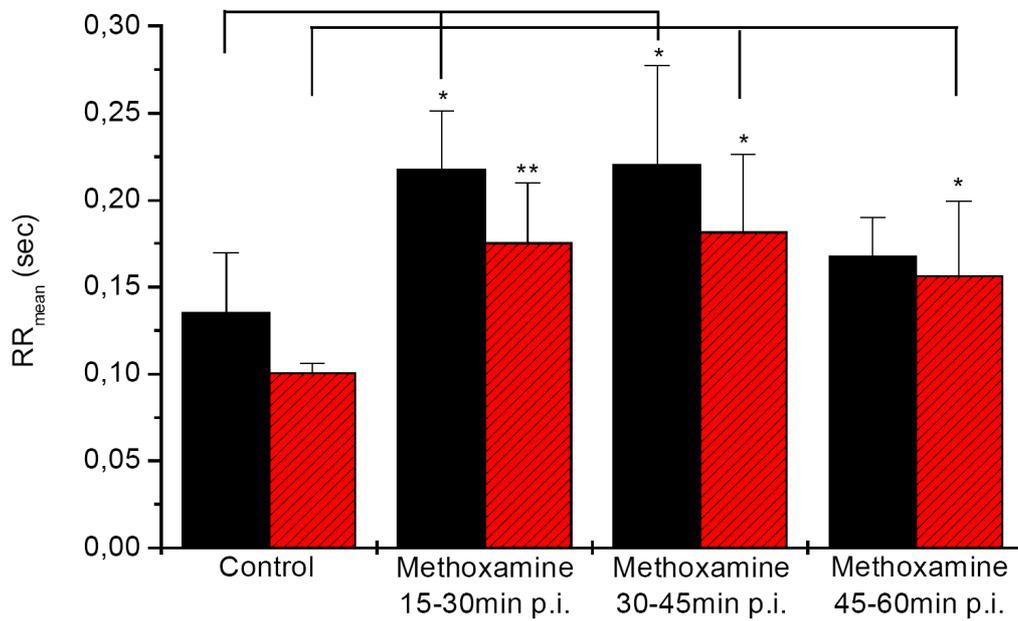
Der Barorezeptorreflex stellt eine wesentliche Komponente bei der neuronalen Kontrolle des Herz-Kreislaufsystems dar. Im Folgenden werden die physiologischen Grundlagen des Barorezeptorreflexes, Verfahren zur methodologischen Erfassung sowie pathologische Veränderungen näher erläutert. Zentrale Aufgabe des Barorezeptorreflexes ist die Regulation des Blutdrucks, um die ausreichende Perfusion des Gehirns und anderer Organe auch bei sich ändernder Position im dreidimensionalen Raum zu gewährleisten. Die Druckperzeption im Herz-Kreislaufsystem erfolgt auf mechanoelektrischem Weg über Barorezeptoren im Arcus aortae sowie im Sinus caroticus.

Nach Verabreichung von Methoxamin (6 mg/kg) kommt es zu einer reflektorischen Aktivierung des Parasympathikus (u.a. auch einer Reduktion des Sympathikotonus) und damit zu einer Verlängerung des RR-Abstandes, d.h. einer Frequenzabnahme (Abb. 3.23 A). In beiden Genotypen findet sich eine signifikante Zunahme des RR-Abstandes, wobei sich zum späten Zeitpunkt nach Injektion (45 - 60 min) nur noch bei  $Ca_v2.3$  geninaktivierten Tieren eine signifikante Verlängerung bleibt. Diesem Wert ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken, da zum späten Zeitpunkt nach Applikation Injektionsartefakte oder Unterschiede in der Verteilung des Pharmakons von geringerer Bedeutung sind. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen ließen sich nicht nachweisen.

Kontrolltiere weisen, wie Abb. 3.23 B zeigt, eine signifikante Erhöhung des Variationskoeffizienten auf, die mit einer erhöhten parasympathischen Aktivität nach Methoxamininjektion korreliert. Interessanterweise zeigt sich ein solcher Anstieg bei  $Ca_v2.3$  geninaktivierten Tieren nicht. Zu einem späteren Zeitpunkt nach Injektion (45 - 60 min) liefert der Variationskoeffizient bei  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren in Relation zur Vorphase vergleichbare Werte. Trotz Funktionstüchtigkeit des Barorezeptorreflexes (Abb. 3.23 A) ist dessen stimulierende Wirkung auf die Herzfrequenzvariabilität in  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren offensichtlich eingeschränkt. Die statistische Analyse dieser Daten ist in Tab. 3.3 zusammengefasst.

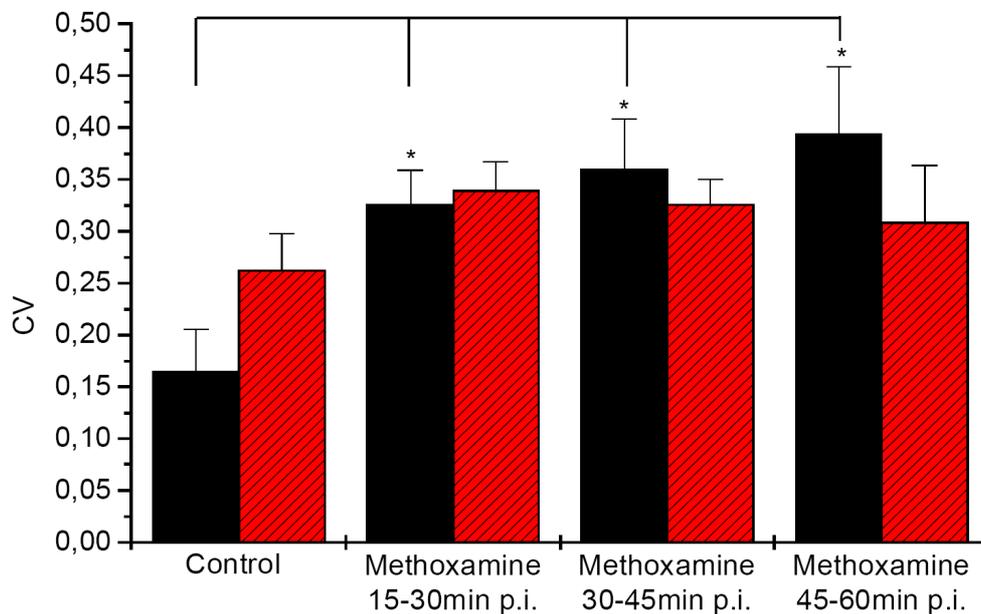
**A**

**RR-Intervals after baroreceptor reflex activation following i.p. administration of methoxamine (6mg/kg)**



**B**

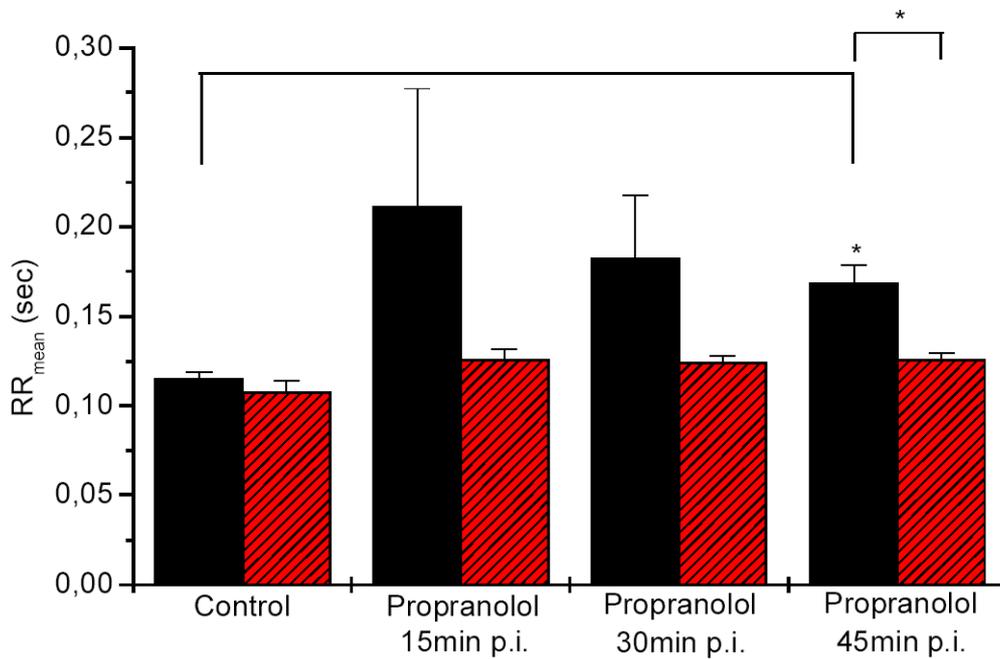
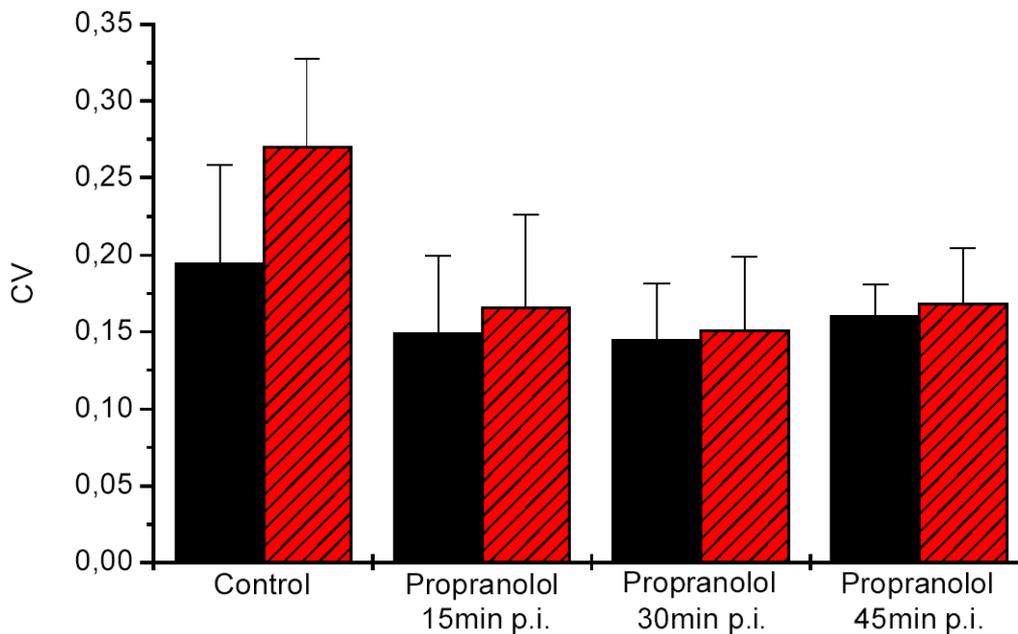
**Coefficient of variance after baroreceptor reflex activation following i.p. administration of methoxamine (6mg/kg)**



**Abb. 3.23: Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität nach Administration von Methoxamin (6 mg/kg) zur Testung des kardi-inhibitorischen Effektes (Barorezeptorreflex)** Darstellung der mittleren RR-Abstände (A) sowie des Variationskoeffizienten (B).

### **3.5.10. Inhibition des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Propranolol**

Die Administration von Propranolol in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht lässt eine markante Reduktion der Herzfrequenz (Zunahme des RR-Abstandes) erwarten. Wie Abb. 3.24 zeigt, tritt in der Kontrollpopulation dieser Effekt auch ein, wobei sich zu einem späteren Zeitpunkt nach Injektion schließlich eine signifikante Abnahme der Herzfrequenz vorfindet. Erstaunlicherweise zeigen  $Ca_v2.3$  defiziente Tiere keine Reduktion der Herzfrequenz auf den  $\beta$ -Adrenorezeptorantagonisten Propranolol. Zu keinem Zeitpunkt nach Injektion zeigt sich eine Abnahme der Herzfrequenz und 45 - 60 min nach Injektion weichen die Daten beider Genotypen auch signifikant voneinander ab. Bezüglich des Variationskoeffizienten traten keine signifikanten Änderungen auf. Auf mögliche physiologische Ursachen dieses außergewöhnlichen Antwortverhaltens  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse auf Propranolol wird weiter unten im Detail eingegangen. Die statistische Analyse dieser Daten ist in Tab. 3.3 zusammengefasst.

**A****RR-Interval following i.p. administration of propranolol (20mg/kg)****B****Coefficient of variance following i.p. administration of propranolol (20mg/kg)**

**Abb. 3.24: Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität nach Administration von Propranolol (20 mg/kg) zur selektiven Inhibition des sympathischen Astes.** Darstellung der mittleren RR-Abstände (A) sowie des Variationskoeffizienten (B). Man beachte die fehlende RR-Reaktion auf Propranolol in der Ca<sub>v</sub>2.3(-/-) Population.

### **3.5.11. Stimulation des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems mittels Isoproterenol**

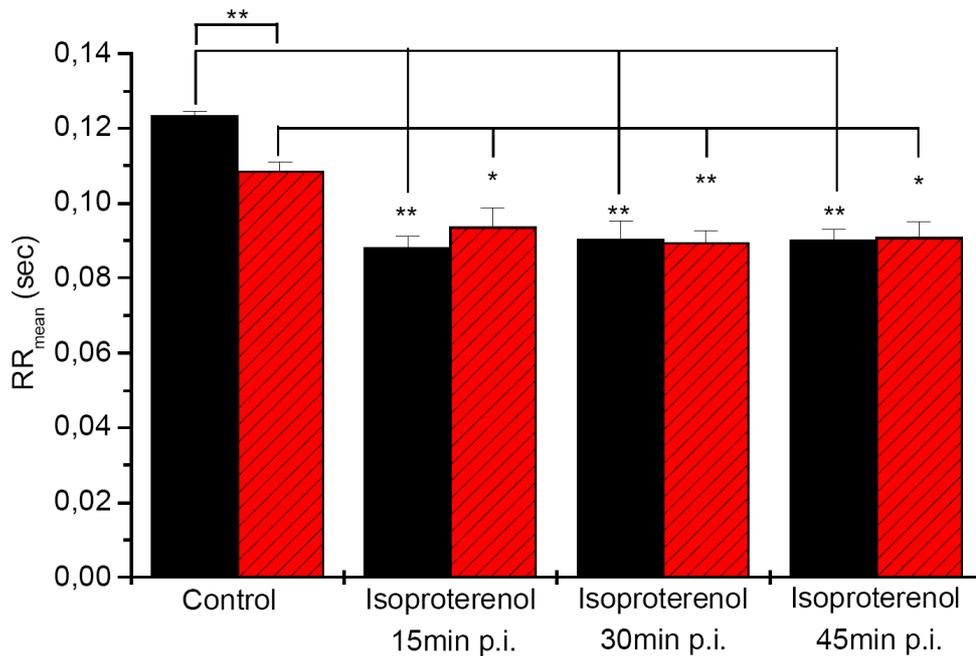
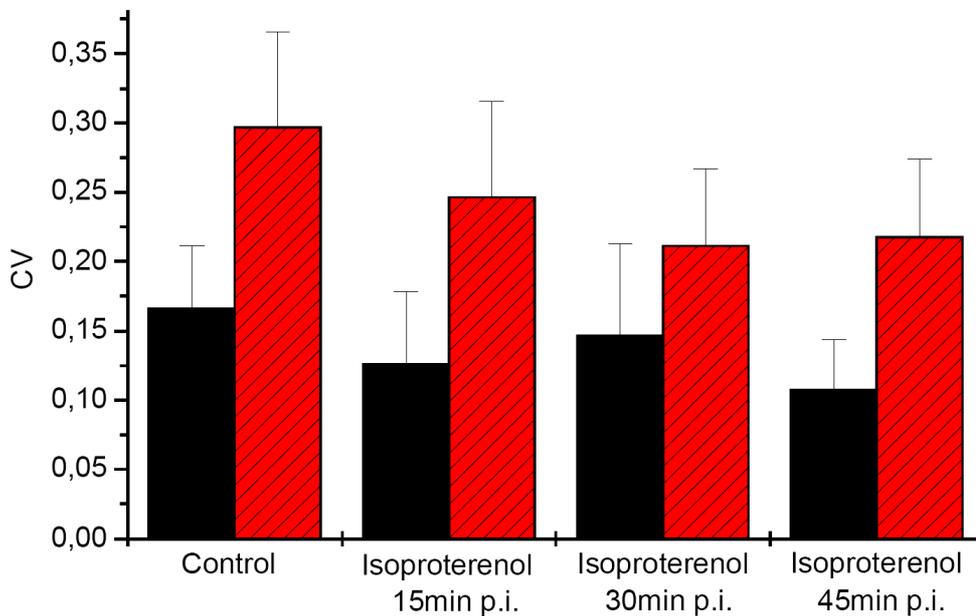
Isoproterenol wurde intraperitoneal in einer Konzentration von 2 mg/kg verabreicht, wobei es zu einem raschen Anstieg der Herzfrequenz auf bis zu 840 bpm kommt. Sowohl in  $Ca_v2.3(+|+)$  als auch  $Ca_v2.3(-|-)$  Mäusen kam es zu einer signifikanten Reduktion des RR-Abstandes (Erhöhung der Herzfrequenz). Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen fanden sich nicht. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Unterschied der Herzfrequenz bei  $Ca_v2.3(-|-)$  Tieren im Vergleich zur Kontrollphase wesentlich geringer ausfällt als bei Kontrolltieren, basierend auf der höheren Ausgangsfrequenz der  $Ca_v2.3(-|-)$  Mäuse. Auf die physiologische Bedeutung wird im Abschnitt „Diskussion“ näher eingegangen.

Mit zunehmender Herzfrequenz finden sich auffällige morphologische Veränderungen des EKG, wie z.B. eine Absenkung der „ST-Strecke“ als Ausdruck einer transienten subendokardialen Ischämie (Chu et al., 2001). Eigentlich handelt es sich um eine Absenkung der S-Zacke und der sich direkt anschließenden T-Welle (eine ST-Strecke ist bei der Maus, wie auch anderen Rodentien (z.B. Ratte) eigentlich nicht vorhanden, wird aber dennoch in der Literatur häufig beschrieben), so dass die T-Welle i.d.R. gar nicht mehr als solche zu erkennen ist und im langsamen Anstieg der S-Zacke höchstens noch als Rudiment auffindbar ist.

Änderungen der EKG-Morphologie unter Isoproterenol sind eindeutig reversibel und nach Abklingen der Isoproterenol-Wirkung nicht mehr nachweisbar. Interessanterweise findet sich diese qualitative Änderung unter Sympathomimetika nur bei männlichen Mäusen und nicht bei weiblichen Tieren. Eine Vielzahl von Ursachen wird diskutiert, eine genaue Erklärung fehlt jedoch weiterhin (siehe Diskussion). Die hier dargelegten EKG-Studien wurden an männlichen Tieren (ausgenommen ein weibliches Kontrolltier) durchgeführt, um zyklusbedingte Schwankungen im Hormonstatus als Interferenzquelle mit dem kardiovaskulären System auszuschliessen. Alle männlichen Versuchstiere zeigten eine „ST-Strecken“-Senkung nach Isoproterenolgabe. Das einzige weibliche Versuchstier in dieser Studie hingegen lieferte eine andere Reaktion: Hier fand sich eine leichte Abnahme der R-Zacke in Kombination mit einer dominanten T-Welle, wie in der Literatur beschrieben (Chu et al., 2001).

Neben diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden in der EKG-Morphologie nach Isoproterenol-Applikation zeigten sowohl  $Ca_v2.3$  defiziente als auch Kontrolltiere eine

Reihe von ventrikulären und supraventrikulären Rhythmusstörungen. Eine verblüffende Eigenschaft des Mausherzens unter Sympathomimetikaeinwirkung ist das auftreten von kurzen, mehrere Sekunden andauernden Episoden ventrikulärer Fibrillation (Kammerflimmern). Derartige Episoden treten spontan auf und können auch spontan wieder sistieren, indem das flimmernde Herz wieder in einen regelmäßigen Sinusrhythmus rekonvertiert (Abb. 3.26). Dies ist eine typische Eigenheit des Mausherzens und hat seine Ursache in morphologisch-anatomischen sowie elektrophysiologischen Charakteristika, die einen langandauernden *Reentry*-Mechanismus verhindern. Wie bereits erwähnt, fand sich dieses Phänomen bei beiden Genotypen.

**A****RR-Interval following i.p. administration of isoproterenol (2mg/kg)****B****Coefficient of variance following i.p. administration of isoproterenol (2mg/kg)**

**Abb. 3.25: Zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität nach Administration von Isoproterenol (2 mg/kg) zur selektiven Stimulation des sympathischen Astes.** Darstellung der mittleren RR-Abstände (A) sowie des Variationskoeffizienten (B). Beide Genotypen weisen eine signifikante Reduktion des RR-Abstandes auf.

In Einzelfällen fanden sich sowohl bei  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen als auch in der Kontrollgruppe Beispiele für komplexe ventrikuläre Rhythmusstörungen nach Isoproterenolgabe. Diese werden in der Humanmedizin nach Lown in fünf Hauptgruppen untergliedert.

**Tab. 3.2: Klassifikation ventrikulärer Arrhythmien nach Lown**

0: keine ventrikuläre Extrasystole (VES)

I: monomorphe VES, < 30 /min

II: monomorphe VES, > 30 /min

IIIa: polymorphe, multifokale VES

IIIb: Bigeminus

IVa: Couplet (Trigeminus)

IVb: Salven (> 2 VES aufeinanderfolgend)

V: R auf T Phänomen (früh einfallende VES in der vulnerablen Phase der T-Welle)

In den EKG-Aufzeichnungen fanden sich Beispiele für ventrikuläre und supraventrikuläre Bigeminie. Dabei handelt es sich um die regelmäßige Abfolge eines Normalschlages (N) und einer Extrasystole (E), die entweder ventrikulären Ursprungs ist (der QRS-Komplex ist dann i.d.R. verbreitert) oder supraventrikulären Ursprungs ist (der Erregungsursprung liegt dann meist ektop im Atrium und die zugehörigen QRS-Komplexe sind von regelrechter Dauer). Das Muster stellt sich wie folgt dar:

Bigeminie

N E N E N E N E N E N E N E N E N

Man spricht bei der Bigeminie auch von der sog. 1:1 Extrasystolie. Zusätzlich fanden sich Beispiele für eine 2:1 Extrasystolie, die im internationalen Sprachgebrauch den Terminus Trigeminie führt. Hierbei handelt es sich um die regelmäßige Abfolge von zwei Normalschlägen und einer Extrasystole (NNE). In dem in Abb. 3.27 dargestellten Beispiel sind die den Extrasystolen zugehörigen Kammerkomplexe breiter als die orthograd übergeleiteten Normalschläge und damit ventrikulären Ursprungs. Eine Trigeminie hat somit die folgende Struktur:

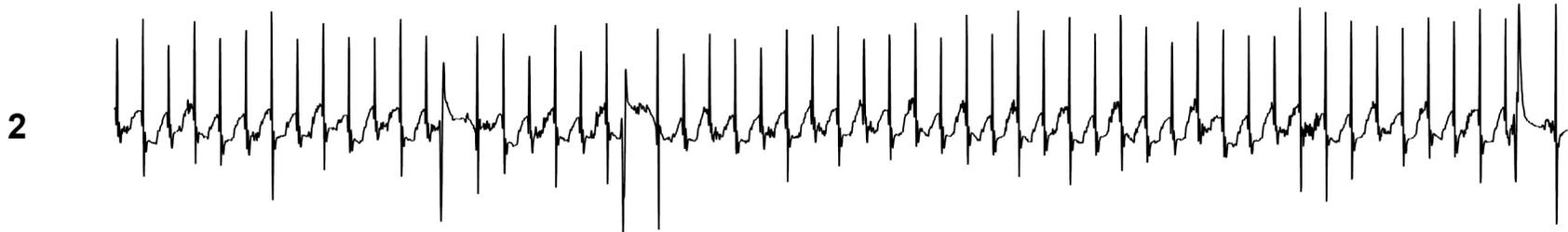
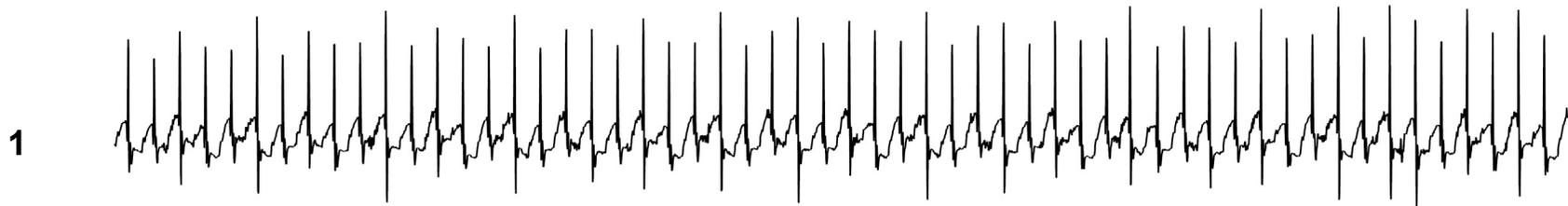
## NNE NNE NNE NNE NNE NNE NNE NNE

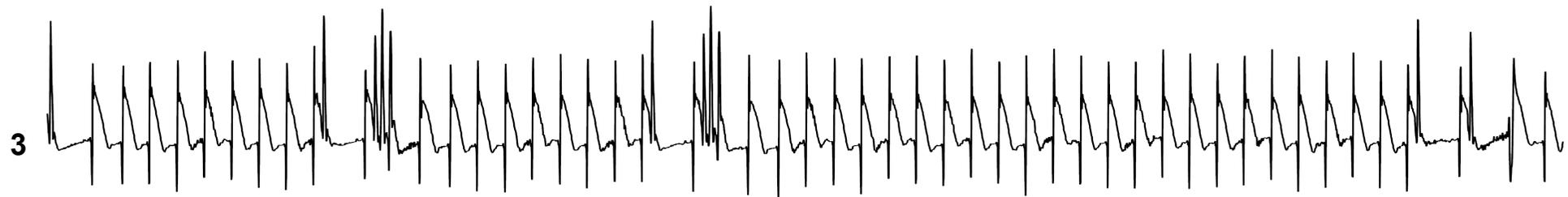
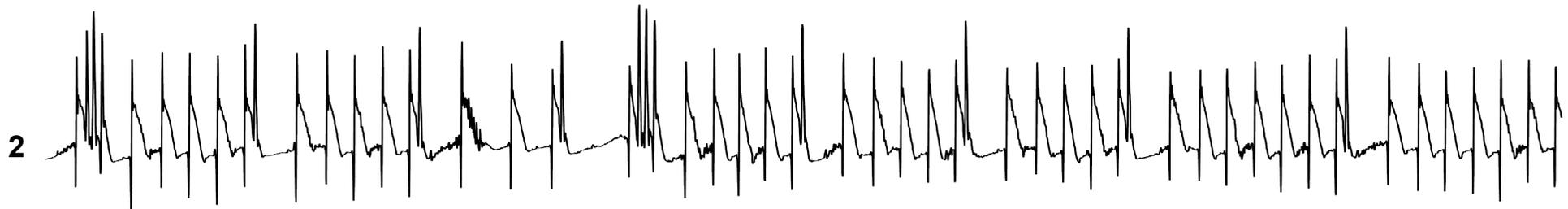
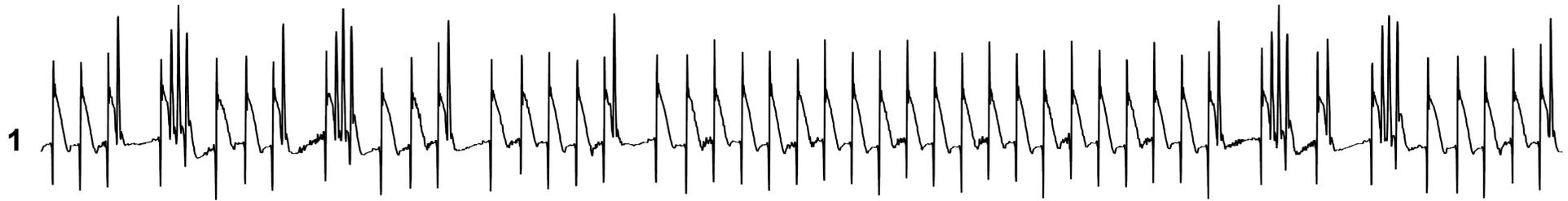
Angemerkt sei, dass die deutschsprachige Fachliteratur unter Trigeminiie, anders als die internationale, die regelmäßige Abfolge eines Normalschlages und zweier Extrasystolen (NEE) versteht. Eine solche kleinste „Einheit“ (NEE) wird auch als Couplet bezeichnet. Teilweise traten im Anschluss an einzelne Normalschläge auch ventrikuläre Extrasystolen in Salvenformation auf (Abb. 3.28). Derartige komplexe ventrikuläre Rhythmusstörungen traten, wie bereits erwähnt, in beiden Genotypen auf, also nicht exklusiv in  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen.



**Abb. 3.26: Elektrokardiogramm nach Injektion von Isoproterenol (2 mg/kg, Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)-Maus, siehe vorherige Seite).** Zur Darstellung kommen sechs aufeinanderfolgende 5s-Segmente, die einige der typischen Reaktionen nach adrenerger sympathischer Stimulation zeigen. Neben der deutlichen Erhöhung der Herzfrequenz (Verminderung der RR-Abstände, Segment 1 und 2) kommt es zu einer Absenkung der „ST-Strecke“. Diese ist entweder abgesenkt oder aszendierend. Dieses in der Literatur bei männlichen Mäusen beschriebene Phänomen wird als Ausdruck einer akuten subendokardialen Ischämie interpretiert (Chu et al., 2001). Interessanterweise findet sich unter adrenerger Stimulation sowohl bei Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Tieren als auch bei Kontrolltieren ein sporadisches Auftreten von Kammerflimmern/Kammerflattern, das von variabler Dauer sein kann. Die spezifischen anatomischen und elektrophysiologischen Eigenschaften des Mauserzens bedingen, dass, im Gegensatz zum Menschen, derartige ventrikuläre Fibrillationen spontan zu sistieren vermögen (Segment 3 und 4). Langsam kehrt das Herz in der Folge wieder in den Sinusrhythmus zurück (Segment 5 und 6).

**Abb. 3.27: Komplexe ventrikuläre Arrhythmien nach Isoproterenol-Injektion (siehe folgende Seite).** Elektrokardiogramm einer Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Maus nach Isoproterenol-Injektion (5s-Segmente in 1 - 3, Ausschnittsvergrößerung in 4). Neben der typischen „ST-Strecken“-Senkung als Ausdruck einer akuten subendokardialen Ischämie zeigt sich bei diesem Versuchstier eine komplexe ventrikuläre Arrhythmie, die durch ein typisches Muster von zwei Normalschlägen (NN) und einer darauffolgenden Extrasystole (E) gekennzeichnet ist (Segmente 3 und 4). Dieses Muster NNE NNE NNE etc. stellt eine höhergradige ventrikuläre Arrhythmie dar. Auch diese Rhythmusstörung sistierte spontan. Bei Kontrolltieren wurde dieses Phänomen nicht beobachtet, allerdings auch nicht durchgängig in Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mäusen.





**Abb. 3.28: Komplexe Rhythmusstörungen nach Administration von Isoproterenol (2 mg/kg, siehe vorherige Seite).** Zur Darstellung kommen drei 5s-Segmente. Die R-Zacken sind relativ zur T-Welle erniedrigt und die „ST-Strecke“ erhöht. Dies bedeutet interpretatorisch ein frühzeitiges Auftreten von Repolarisations- im Vergleich zu Depolarisationsprozessen, wie nach Isoproterenol erwartet. Neben einzelnen Extrasystolen, die eine kompensatorische Pause nach sich ziehen, beobachtet man das z.T. salvenartige Auftreten von Kammerkomplexen regelrechter Dauer, die in die Spätphase der T-Wellen einfallen. Da die Extrasystolen nicht verlängert und von regelrechter Morphologie sind, ist eine ektope Erregungsbildung im Ventrikel unwahrscheinlich. Eine Kategorisierung der ventrikulären Arrhythmien gemäß Lown (IVb, V) bietet sich zwar an, ist aber aufgrund der elektrophysiologischen Diskrepanzen zwischen Maus- und Menschherz eher als fragwürdig zu betrachten.

**Tab. 3.3: Zeitbasierte Analyse pharmakologischer Injektionsexperimente (siehe folgende Seite).** Detaillierte Darstellung der statistischen Analyse der Injektionsexperimente zum autonomen Block (Atropin (1 mg/mg) und Propranolol (20 mg/kg)), zur Testung des Barorezeptorreflexes (Methoxamin (6 mg/kg)), zur Sympathikolyse (Propranolol (20 mg/kg) und zur Sympathikomimese (Isoproterenol (2 mg/kg))). Dargestellt sind die Resultate der RR-Analyse sowie des Variationskoeffizienten (CV) während einer 30 minütigen Kontrollphase sowie verschiedenen Zeitintervallen nach Injektion (15 - 30 min, 30 - 45 min und 45 - 60 min p.i.). Die Signifikanzniveaus folgen den Standarddefinitionen: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; NS: nicht signifikant.

### Time domain analysis of heart rate variability after autonomic block using atropin and propranolol

	Control conditions	Atropin (1mg/kg, i.p.)	Propranolol (20mg/kg, i.p.)		
<b>RR<sub>mean</sub> (ms)</b>			15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.0971 ± 0.0029	0.0911 ± 0.0021 (NS)	0.1481 ± 0.0052 ***	0.1442 ± 0.0059 **	0.1329 ± 0.0047 **
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.1033 ± 0.0035 (NS)	0.0866 ± 0.0029 * (NS)	0.1412 ± 0.0136 * (NS)	0.1417 ± 0.0131 * (NS)	0.1375 ± 0.0128 * (NS)
<b>CV</b>			15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1566 ± 0.0141	0.2104 ± 0.0575 (NS)	0.0815 ± 0.0079 **	0.0893 ± 0.0226 (NS)	0.0877 ± 0.0177 *
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.2928 ± 0.0669 (NS)	0.2502 ± 0.0391 (NS) (NS)	0.1096 ± 0.0401 (NS) (NS)	0.1210 ± 0.0532 (NS) (NS)	0.1465 ± 0.0477 (NS) (NS)

### Time domain analysis of heart rate variability after methoxamine administration

	Control conditions	Methoxamine (6mg/kg, i.p.)		
<b>RR<sub>mean</sub> (ms)</b>		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1348 ± 0.0174	0.2171 ± 0.0172 *	0.2202 ± 0.0285 *	0.1677 ± 0.0110 (NS)
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.1003 ± 0.0028 (NS)	0.1754 ± 0.0172 ** (NS)	0.1812 ± 0.0226 * (NS)	0.1562 ± 0.0215 * (NS)
<b>CV</b>		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1641 ± 0.0412	0.3257 ± 0.0331 *	0.3599 ± 0.0481 *	0.3937 ± 0.0654 *
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.2624 ± 0.0353 (NS)	0.3391 ± 0.0273 (NS) (NS)	0.3260 ± 0.0239 (NS) (NS)	0.3085 ± 0.0551 (NS) (NS)

### Time domain analysis of heart rate variability after isoproterenol administration

	Control conditions	Isoproterenol (2mg/kg, i.p.)		
		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>RR<sub>mean</sub> (ms)</b>				
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1232 ± 0.0014	0.0879 ± 0.0034 **	0.0902 ± 0.0050 **	0.0900 ± 0.0031 **
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.1085 ± 0.0025	0.0936 ± 0.0052 *	0.0894 ± 0.0032 **	0.0907 ± 0.0044 *
	**	(NS)	(NS)	(NS)
	Control conditions	Isoproterenol (2mg/kg, i.p.)		
<b>CV</b>		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1660 ± 0.0451	0.1260 ± 0.0522 (NS)	0.1466 ± 0.0663 (NS)	0.1075 ± 0.0364 (NS)
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.2969 ± 0.0689	0.2460 ± 0.0694 (NS)	0.2117 ± 0.0550 (NS)	0.2177 ± 0.0560 (NS)
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

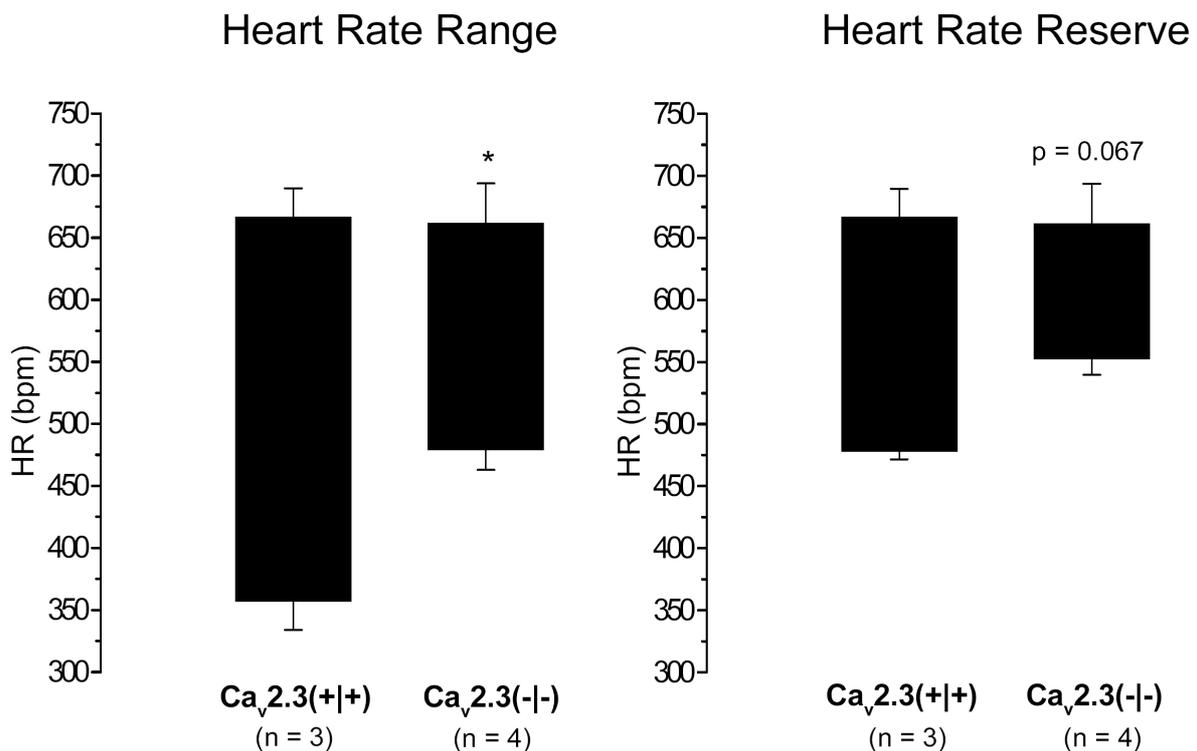
### Time domain analysis of heart rate variability after propranolol administration

	Control conditions	Propranolol (20mg/kg, i.p.)		
		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>RR<sub>mean</sub> (ms)</b>				
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1151 ± 0.0040	0.2109 ± 0.0661 (NS)	0.1822 ± 0.0352 (NS)	0.1680 ± 0.0108 *
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.1071 ± 0.0067	0.1251 ± 0.0069 (NS)	0.1237 ± 0.0042 (NS)	0.1253 ± 0.0042 (NS)
	(NS)	(NS)	(NS)	*
	Control conditions	Propranolol (20mg/kg, i.p.)		
<b>CV</b>		15-30min p.i.	30-45min p.i.	45-60min p.i.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(+/+)</b>	0.1942 ± 0.0642	0.1487 ± 0.0505 (NS)	0.1443 ± 0.0370 (NS)	0.1601 ± 0.0207 (NS)
<b>Ca<sub>v</sub>2.3(-/-)</b>	0.2701 ± 0.0572	0.1654 ± 0.0605 (NS)	0.1510 ± 0.0474 (NS)	0.1678 ± 0.0369 (NS)
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

### 3.5.12. Frequenzbreite und Herzreserve - Bestimmung kardiovaskulärer

#### Flexibilität in $Ca_v2.3$ defizienten Mäusen und Kontrolltieren

Die oben angeführten Resultate pharmakologischer Injektionsexperimente erlauben die Bestimmung einer Reihe von Parametern, die einen Eindruck von der kardiovaskulären Leistungsfähigkeit und Flexibilität liefern. Zwei dieser Parameter sind beispielhaft in Abb. 3.29 dargestellt, die Frequenzbreite (*heart rate range*) sowie die Herzreserve (*heart rate reserve*). Entgegen ihrer klassischen klinischen Definition handelt es sich hierbei um die pharmakologisch-induzierbare, maximale Frequenzbreite bzw. Herzreserve. Es wird deutlich, dass  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäuse eine signifikante Reduktion der Frequenzbreite aufweisen ( $p = 0,0102$ ), eine Tendenz, die sich auch bei der Herzreserve zeigt ( $p = 0,0669$ ). Ursächlich ist hierfür primär das fehlende Antwortverhalten auf den  $\beta$ -Adrenorezeptorantagonisten Propranolol verantwortlich zu machen, dessen pathophysiologischer Mechanismus noch ungeklärt ist.

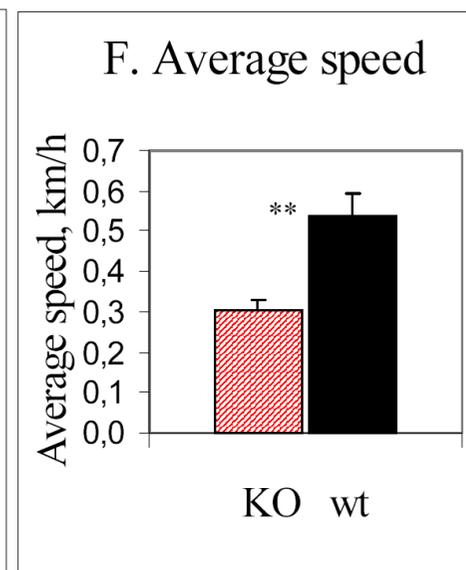
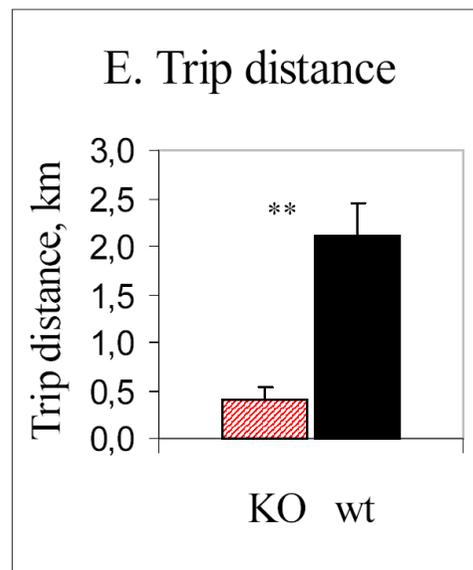
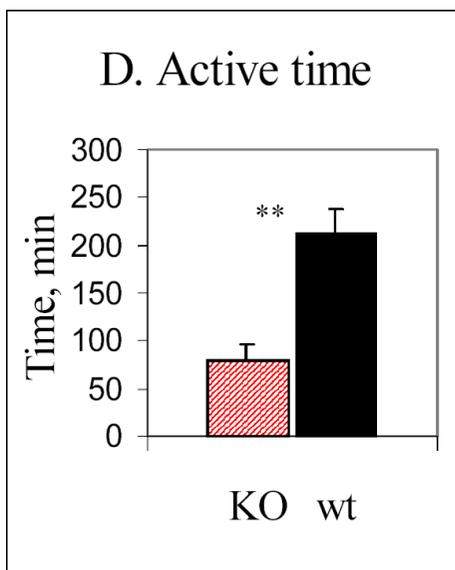
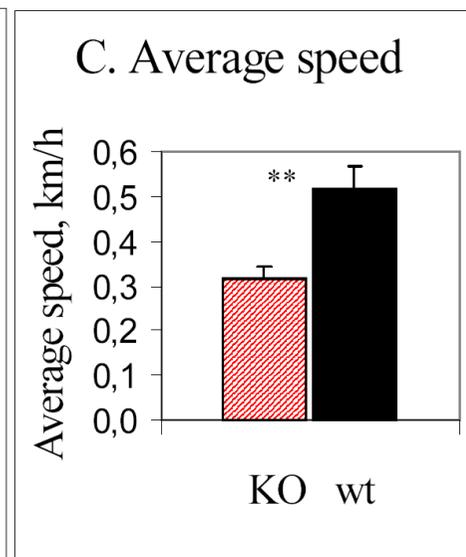
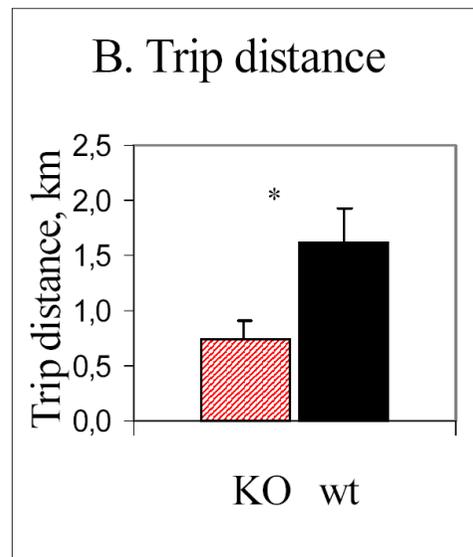
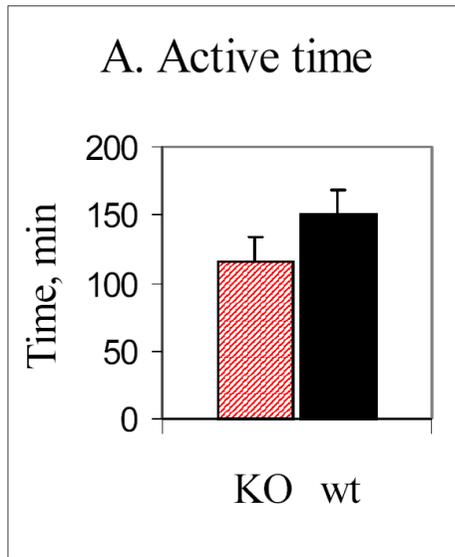


**Abb. 3.29** Darstellung der Frequenzbreite (*heart rate range*) und Herzreserve (*heart rate reserve*). Die Frequenzbreite zeigt eine signifikante Reduktion in  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen.

### 3.5.13. Laufradexperimente

Die physische Leistungsfähigkeit von  $Ca_v2.3(+/+)$  und  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen im Alter von 13 - 52 Monaten wurde mittels Laufradexperimenten für männliche und weibliche Tiere getrennt über einen Zeitraum von 24 h analysiert. Hierbei wurde die Gesamtaktivitätsdauer, die Laufstrecke sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit ermittelt. Es zeigte sich, dass weibliche  $Ca_v2.3$  defiziente Mäuse (Abb. 3.30 D - F) eine signifikante Erniedrigung aller drei Analyseparameter gegenüber Kontrolltieren aufwiesen; bei männlichen  $Ca_v2.3$  geninaktivierten Tieren fand sich ein signifikant schlechteres Abschneiden bei der zurückgelegten Laufstrecke und Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 3.30. A - C).

**Abb. 3.30: Charakterisierung von  $Ca_v2.3(+/+)$  (schwarz) und  $Ca_v2.3(-/-)$  (rot) Mäusen im Laufradexperiment (siehe folgende Seite).** Dargestellt sind die Resultate männlicher Versuchstiere in A - C sowie weiblicher Versuchstiere in D - F. Insgesamt wurden 17 männliche (Alter:  $38 \pm 3$  Monate) und 15 weibliche Kontrolltiere (Alter:  $36 \pm 4$  Monate) sowie jeweils 23 männliche und weibliche  $Ca_v2.3$  geninaktivierte Mäuse im Alter von  $30 \pm 3$  bzw.  $25 \pm 1$  Monate analysiert. In beiden Geschlechtern demonstrieren  $Ca_v2.3$  defiziente Mäuse ein signifikant schlechteres Abschneiden im Vergleich zu Kontrolltieren (Ausnahme: Aktivitätsdauer männlicher Versuchstiere, Weiergräber et al., 2005a).



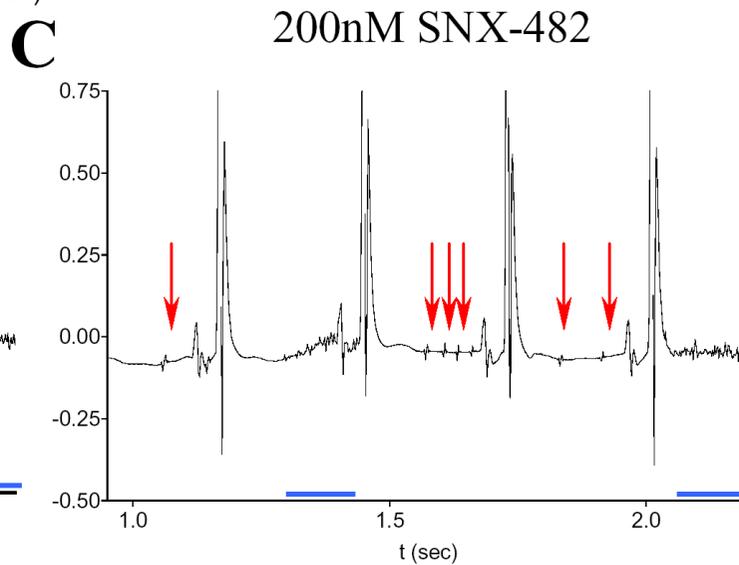
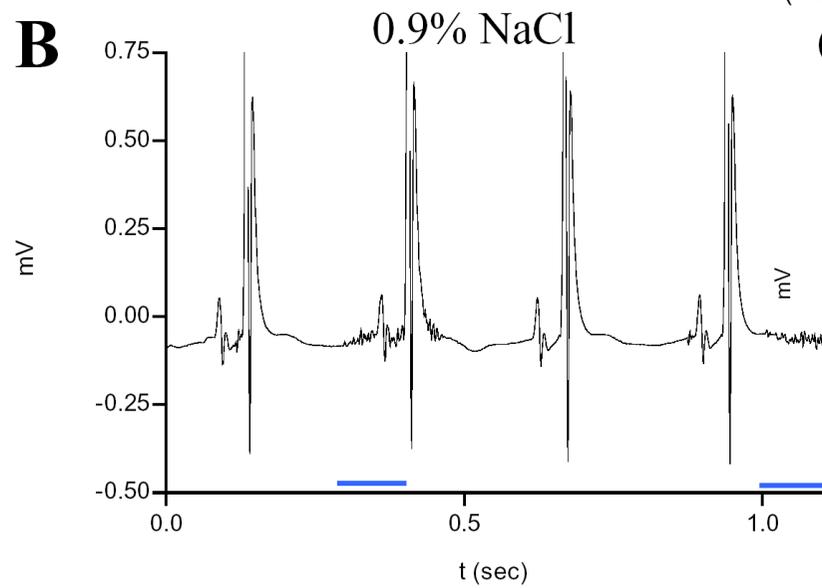
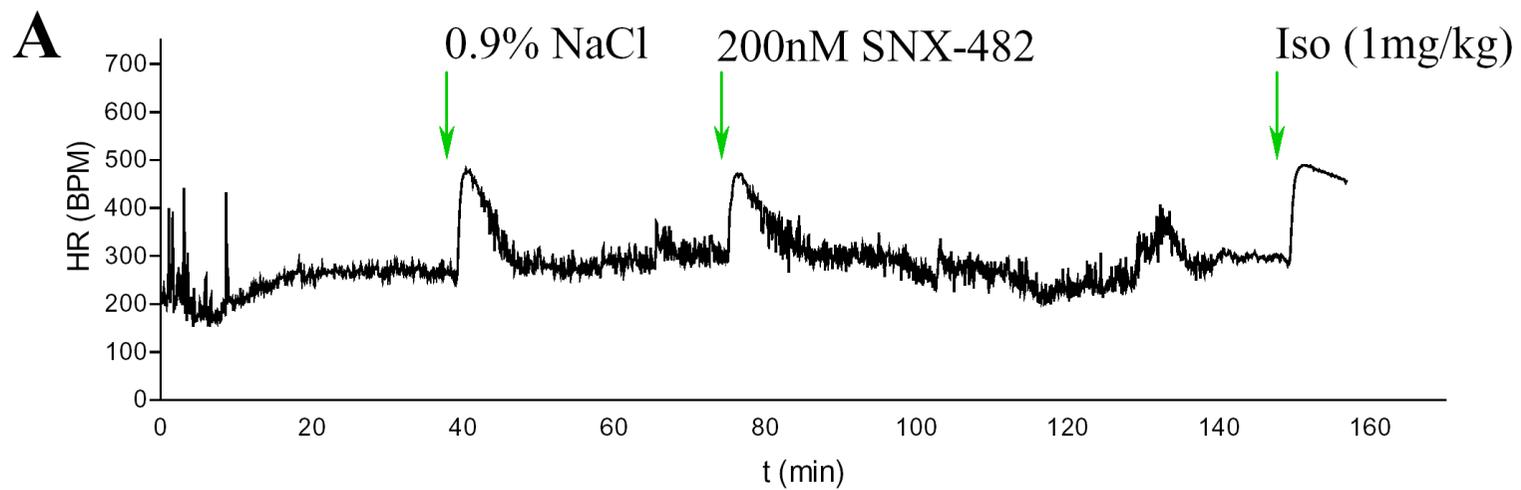
### 3.5.14. Jugularvenenkatheterisierung der Maus und SNX-482-Applikation

Eine entscheidende Frage ist, inwieweit der oben beschriebene intrinsische kardiale Phänotyp  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse das Resultat einer frühen, bereits pränatal existenten Störung ist oder seine Ursache u.a. auch im adulten  $Ca_v2.3(-/-)$  Herzen hat. Die Applikation von SNX-482 über einen Jugularvenenkatheter bietet die Möglichkeit, in Kontrolltieren zu testen, ob die direkte intravasale Administration dieses selektiven  $Ca_v2.3$ -Blockers in der Lage ist, eine kardiovaskuläre Antwort zu provozieren, die der bei  $Ca_v2.3$  defizienten Tieren vergleichbar ist. Bei SNX-482 handelt es sich um ein Peptidtoxin aus dem Venom der Tarantel *Hysteroecrates gigas*, das eine  $Ca_v2.3$ -selektive inhibitorische Wirkung aufweist. Es handelt sich um ein 41-Aminosäure-Peptid, das u.a. über drei Disulfidbrücken verfügt. Über die Pharmakokinetik dieses Toxins liegen bislang keine Erkenntnisse vor, so dass man über die Stabilität nach Einbringen in den Intravasalraum nur spekulieren kann. Neben Absorptionsvorgängen ist denkbar, dass das Toxin proteolytisch, bzw. durch Reduktion der Disulfidbrücken modifiziert und abgebaut wird. Da die Pharmakokinetik unbekannt ist, erfolgte die Administration von SNX-482 in die Jugularvene unter der Annahme, dass das Verteilungsvolumen des Peptidtoxins dem intravasalen Volumen entspricht, und wurde folglich in entsprechender Dosis im Bolus injiziert. Da es bei der chirurgischen Manipulation im Halsbereich auch zu mechanischen Effekten und damit Stimulation am Nervus vagus kommt, findet sich zu Beginn der Aufnahmen ein unregelmäßiger Herzschlag (u.a. mit erhöhtem Variationskoeffizienten, siehe Abb. 3.31). Nach variabler Zeit stabilisiert sich die Frequenz und die eigentlichen Injektionsversuche wurden durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Bolusinjektion von 20  $\mu$ l 0,9 %iger NaCl-Lösung. Wie Abb. 3.31 zeigt, kommt es zu einem instantanen Anstieg der Herzfrequenz, der auf die akute Volumenbelastung des Herzens zurückzuführen ist. Eine derartige Kontrollinjektion hat mehrere Vorteile. Zum einen erlaubt sie die Prüfung des experimentellen Systems auf Funktionalität, d.h. Durchlässigkeit und korrekte Platzierung des Katheters, zum anderen zeigen sich die kardiovaskulären Konsequenzen auf die Injektion der Kontrolllösung selbst, z.B. Volumeneffekt mit transientem Frequenzanstieg sowie Erhöhung des Variationskoeffizienten. Diese Kontrollparameter sind wichtig zur Abgrenzung von unspezifischen Effekten nach SNX-482-Applikation.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde SNX-482 in Dosen appliziert, die einer theoretischen intravasalen Konzentration von 100 nM und 200 nM entsprechen. Wie Abb. 3.31 exemplarisch zeigt, kommt es nach Administration von 200 nM SNX-482 zu einer gegenüber der Kontrollinjektion mit 0,9 %iger NaCl-Lösung Erhöhung des Variationskoeffizienten und zu geringgradigen Störungen in der EKG-Grundlinie. Da die Zahl der durchgeführten Experimente noch keine statistischen Aussagen erlaubt, kann an dieser Stelle nicht abschließend festgestellt werden, ob es sich hierbei auch tatsächlich um signifikante Änderungen handelt. Qualitativ muss allerdings konstatiert werden, dass sich, auch durch hohe Dosen des Taranteltoxins SNX-482, EKG-Auffälligkeiten wie in vivo in adulten  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren vorgefunden, nicht induzieren lassen. Unregelmässigkeiten in der EKG-Grundlinie könnten allerdings atriale Aktivierungsstörungen, wie man sie bei adulten  $Ca_v2.3$  defizienten Tieren findet, imitieren. Bei der Beurteilung der Jugularvenenkatheterisierungsexperimente müssen die fehlenden Erkenntnisse zur Pharmakokinetik des SNX-482 mit berücksichtigt werden, da möglicherweise ein schneller Abbau des SNX-482 die kardiovaskuläre Reaktion beeinflusst.

**Abb. 3.31: Jugularvenenkatheterisierung und systemische Administration von SNX-482 in einer Kontrollmaus.** A) Darstellung der Herzfrequenz über einen Beobachtungszeitraum von 160 min nach erfolgreicher transientser Jugularvenenkatheterisierung. Nach Stabilisierung der Herzfrequenz erfolgt zunächst die Testapplikation von 20  $\mu$ l physiologischer NaCl-Lösung. Es kommt zu einem charakteristischen Frequenzanstieg, der auf die akute Volumenbelastung zurückzuführen ist. Im Abstand von 20 min schliesst sich die Verabreichung von SNX-482 in einer finalen intravasalen Konzentration von 200 nM an, bevor das Experiment nach weiteren 60 min mit einer Isoproterenol-Kontrollinjektion beendet wird. B) EKG nach Administration von 20  $\mu$ l 0,9 %iger NaCl-Lösung. Obwohl sich keine qualitativen Auffälligkeiten finden, kommt es zu einer leichten Erhöhung des Variationskoeffizienten. C) EKG nach intravasaler Applikation von SNX-482 (200 nM).



## 3.6. Elektroenzephalographische (EEG) Aufzeichnungen bei C57Bl/6 Mäusen

### 3.6.1. Vorbetrachtung

Die telemetrische Erfassung des Elektroenzephalogramms hat sich in den vergangenen Jahren als wertvolles Werkzeug zur Phänotypisierung einer Vielzahl von Tiermodellen unterschiedlicher Erkrankungen des Menschen, v.a. der Epilepsien und Schlafstörungen entwickelt. Eine Vielzahl von verschiedenen Verfahren wurde in der Vergangenheit zur Aufnahme von Elektroenzephalogrammen bei verschiedenen Spezies entwickelt. Bei den meisten dieser Verfahren wird das EEG entweder unter Narkose oder aber unter immobilisierenden Bedingungen, d.h. massiver Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Tieres abgeleitet. In beiden Fällen sind die Ableitbedingungen höchst anfällig für Artefakte, weshalb man frühzeitig nach Alternativen gesucht hat. Der derzeitige *state-of-the-art* Ansatz ist die telemetrische EEG-Aufzeichnung unter Verwendung eines implantierbaren Radiofrequenztransmitters. Im Laufe des vergangenen Jahrzehnts wurden die kommerziell erhältlichen Systeme erschwinglich und wichtiger, in ihren Dimensionen kleiner, was letztlich dazu geführt hat, dass man, wie in dieser Arbeit vorgestellt, Telemetrieimplantate sogar in Mäuse einbringen kann und so EEGs unter physiologischen Bedingungen ableiten kann. Im Folgenden werden die Ergebnisse einer Reihe von Experimenten zur Optimierung der Transmitterimplantation, Charakterisierung des Maus-EEGs sowie der Identifizierung von EEG-Artefakten vorgestellt.

### 3.6.2. Postoperative Erholung

Um die postoperative Erholung zu dokumentieren, wurde täglich das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt (abzüglich des Transmittergewichtes von 3,9 g). Die Experimente zeigten, dass eine maximale Reduktion des Körpergewichtes 4 - 5 Tage post implantationem auftrat (eine Beobachtung, die sich mit Literaturangaben deckt; Kramer and Kinter, 2003). Zwei Wochen nach Operation war das Ausgangskörpergewicht wieder zu 90 - 95 % erreicht.

### **3.6.3. Signal/Rausch-Verhältnis**

Im Vergleich zum EKG und EMG ist das EEG-Signal vergleichsweise schwach und muss daher massiv verstärkt werden. Ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis ist daher wichtig. Chirurgische Ansätze, in denen isolierte Miniatur-Stahlelektroden oder isolierte Schraubenelektroden implantiert werden, die mit Hilfe eines Verbindungsstückes an die ableitenden Elektroden angeheftet oder mittels Lötvorgang befestigt werden, bergen die Gefahr, ein nicht beherrschbares Rauschen zu induzieren. Daher wurden in den hier vorgestellten Experimenten die Kabelenden direkt als Elektroden, ohne zusätzliche Kontaktstellen, implantiert, sowohl oberflächlich als auch tief. Nach Optimierung des Implantationsverfahrens wurde das Hintergrundrauschen mit 100 nV - 1  $\mu$ V bestimmt.

### **3.6.4. EEG-Aufzeichnungen nach subkutaner Pouch-Implantation**

Die subkutane *Pouch*-Implantation des Radiofrequenztransmitters ist unter chirurgischen Gesichtspunkten einfacher und schneller durchzuführen. Zur Fixation besteht jedoch nur die Möglichkeit, den Transmitter über eine Hautnaht subkutan zu platzieren. Versuche haben gezeigt, dass der Transmitter einen nicht unerheblichen subkutanen Druck ausübt, so dass es in vielen Fällen zu Drucknekrosen der Haut, fast immer aber zum Ausreißen der Naht kommt. In einigen Fällen hatte dies eine Mobilisation des Transmitters zur Folge, was u.U. Zugwirkung an den implantierten Elektroden hervorrufen kann. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass in subkutaner Position gemessene Temperaturwerte nicht wie bei intraperitonealer Implantation der Körperkerntemperatur entsprechen.

### **3.6.5. Elektrokortikogramm (ECoG)**

Wie bereits ausgeführt, erfolgt nach EEG-Elektrodenpositionierung die Fixation der EEG-Elektroden mittels Glas-Ionomer-Zement. Nicht jeder Zahnzement ist für diesen Zweck geeignet, da viele nach Aushärtung zwar extrem fest werden, aber nur geringe Haftung auf der Knochenoberfläche aufweisen. Glas-Ionomer-Zement liefert eine gute Haftung bei hoher Stabilität, so dass man auch auf das Verwenden von Anker-Schraubchen zur Fixation verzichten kann. Hinweise auf Meningitiden, eine Enzephalitis oder Meningoenzephalitis wurde nach keiner Implantation festgestellt, weiterhin auch keine entzündliche Reaktion in Umgebung des Transmitters. Gelegentlich stellte sich innerhalb von 4 - 6 Wochen nach Implantation eine

druckbedingte Hautnekrose im Bereich der Zementhaube ein. Es sollte daher ein Minimum an Zahnzement zur Elektrodenfixation verwendet werden.

Gelegentlich fanden sich im Elektrokortikogramm von C57Bl/6-Mäusen *spikes*, wobei sich schwer eruieren lässt, ob es sich bei diesem Phänomen um eine intrinsische Eigenschaft der C57Bl/6-Tiere handelt oder um einen implantationsbedingten Effekt, da selbst äußerst behutsames Vorgehen Schäden auf der Hirnoberfläche nicht sicher ausschliessen kann. So zeigten Untersuchungen an Hirnschnitten eine geringgradige kortikale Impression im Bereich der Elektrodenimplantationsstellen. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung valider Kontrollen bei der Durchführung von EEG-Analysen in transgenen Tieren.

### **3.6.6. ECoG nach Applikation von R/S-Baclofen und Bicucullin**

Um die Qualität des Implantationsprozederes zu testen, wurden pharmakologische Injektionsexperimente/Provokationsexperimente mit Baclofen und Bicucullin durchgeführt. Beide Substanzen, R/S-Baclofen, das als GABA(B) Rezeptor-Agonist fungiert als auch Bicucullin (GABA(A) Rezeptor Antagonist) vermögen *spike* und *spike-wave*-Aktivität im ECoG von C57Bl/6 Mäusen hervorzurufen, die auf einem Hypersynchronisationsprozess im thalamokortikalen-kortikothalamischen Neuronenkreis basieren. Die in der bipolaren Ableitung gewonnenen EEG-Spuren weisen ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis auf.

### **3.6.7. ECoG nach Applikation von 4-Aminopyridin**

Eine Vielzahl von Pharmaka ist in der Lage, generalisiert tonisch-klonische Anfälle zu induzieren. Hierzu gehören Kaliumkanalblocker, wie 4-Aminopyridin (4-AP), GABA-Rezeptor-Antagonisten wie das Pentylentetrazol (PTZ) sowie Glutamat-rezeptoragonisten, wie NMDA, AMPA oder Kainat. Die hier vorgestellten Versuche wurden mit 4-AP durchgeführt. Sowohl nach 4-AP als auch nach PTZ Injektion durchlaufen Versuchstiere charakteristische Stadien, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll. In Phase 1 nach Injektion kommt es zu einer charakteristischen Hypoaktivität, in der sich das Tier in typischer Weise mit dem Bauch flach auf den Käfigboden legt. Dieser Zustand geht in Phase 2 über, die durch einen fokalen Myoklonus, v.a. im fazialen Bereich gekennzeichnet ist. Zuckungen der Vibrissen, orofazialen Automatismen ähnelnde Bewegungsabläufe und myoklonische Aktivität des gesamten Kopfes kennzeichnen dieses Stadium. In Phase 3 treten

generalisierte Myokloni auf, die allerdings in ihrer Stärke unterschiedlich ausfallen können. Während in manchen Fällen der generalisierte Myoklonus nur eine Gangunsicherheit zur Folge hat, kann es bei stärkeren Formen des Myoklonus zu einem Verlust der aufrechten Körperposition oder im Extremfall zu unkoordinierten motorischen Entäußerungen (Laufen, Springen) kommen. In dieser Phase gibt es i.d.R. keine letalen Ausgänge. Kommt es dosisabhängig zum Eintritt in Phase 4, so tritt ein generalisierter tonisch-klonischer Anfall auf, der nach einer zeitlich variablen klonischen Episode mit einer tonischen Extension der hinteren Extremitäten endet. In diesem Zustand versterben die Tiere i.d.R. an einer respiratorischen Insuffizienz. Eine artefizielle Respiration kann dies u.U. verhindern. Nach Applikation von 4-AP in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht durchlaufen die Versuchstiere typischerweise diese Stadien (LD<sub>97</sub>: 13,3 mg/kg). Abb. 3.32 (A) zeigt die elektrokortikographisch aufgezeichnete *spike*-Aktivität in der finalen generalisiert tonisch-klonischen Phase. Beim Menschen werden die EEG Signale während eines *Grand Mal*- Anfalls meistens durch EMG-Artefakte komplett überlagert. Trotz der massiven tonisch-klonischen Muskelaktivität ist in dem hier aufgeführten Experiment die intrinsische *spike*-Aktivität des Hirns deutlich sichtbar und weitgehend frei von Artefakten. Im Anschluss an den generalisiert tonisch-klonischen Anfall kommt es zu einer Abnahme der EEG-Amplitude, die als postiktale Depression oder auch als *spreading depression* gedeutet werden könnte.

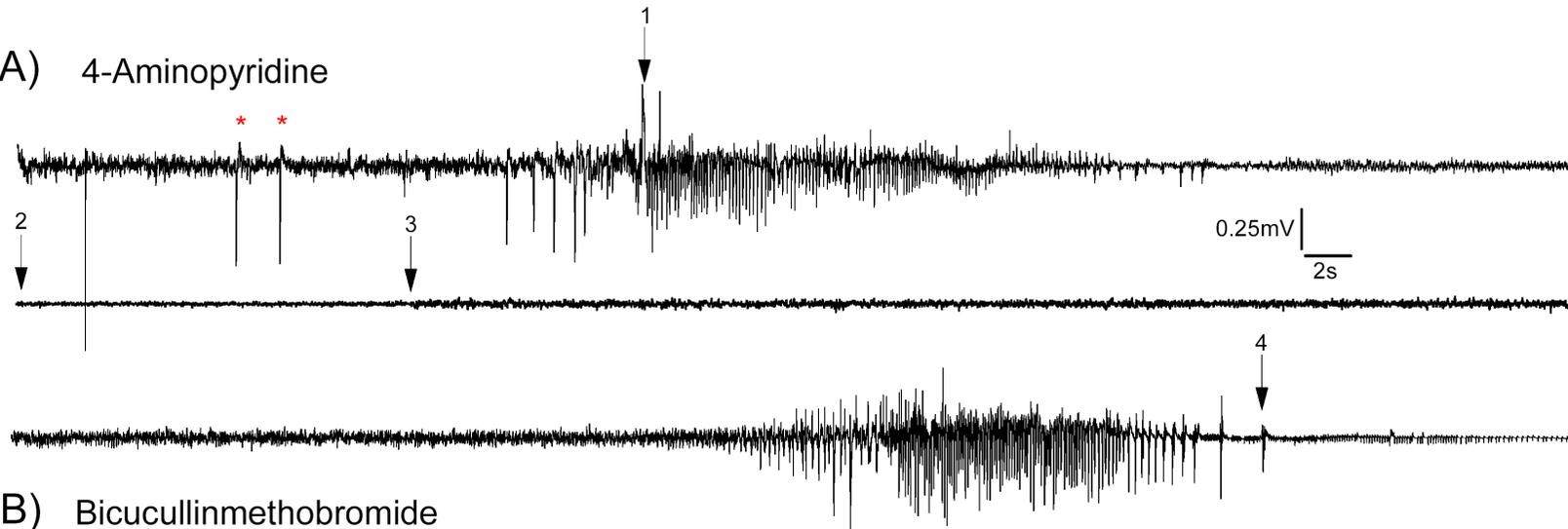
### **3.6.8. Tiefe intrazerebrale Ableitung**

Die tiefen, intrazerebralen EEG-Ableitungen wurden in der CA3-Region des Hippokampus durchgeführt. Theta-Aktivität findet sich hier v.a. in der Einschlafphase (B-Phase) sowie dem *rapid-eye movement*-(REM) Schlaf. Theta-Aktivität zur Überprüfung der Qualität intrazerebraler Ableitungen lässt sich durch einen Käfigwechsel provozieren und wurde anschliessend mittels einer *Power Spectrum* Analyse (basierend auf einer *Fast Fourier Transformation* (FFT)) verifiziert (siehe Abb. 3.33). Tiefe Ableitungen in der beschriebenen Form sind für 5 - 6 Wochen post implantationem stabil. Danach traten zunehmend Ossifikationsprozesse um und in den Bohrkanälen auf, die die Elektroden langsam herausheben und so neben einer inkorrekten Elektrodenposition auch die Artefaktanfälligkeit erhöhen.

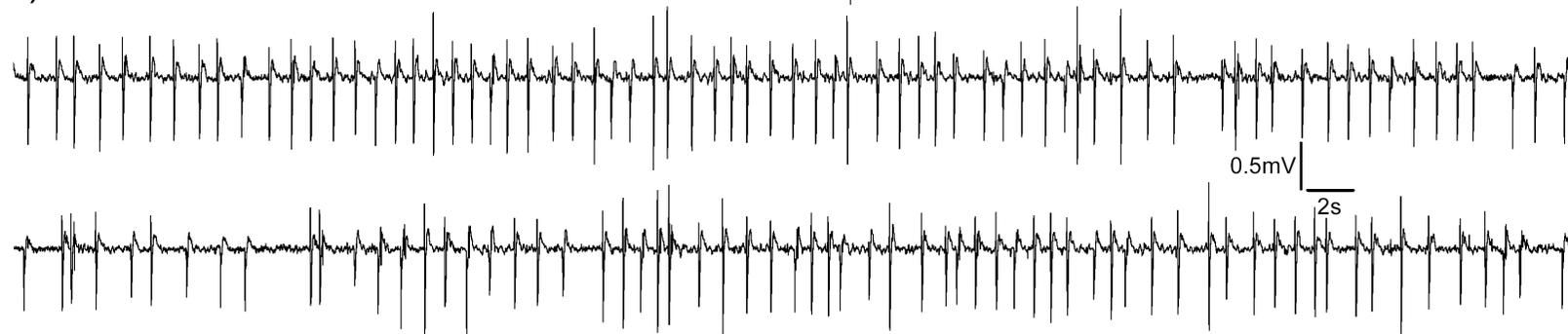
### **3.6.9. Elektromyographische und elektroenzephalographische Kontamination des Elektroenzephalogramms**

Die hier beschriebene und entwickelte Implantationstechnik liefert EEG-Aufzeichnungen von hoher Qualität und geringer Artefaktbelastung. Artefaktfreiheit bzw. Reduktion ist umso wichtiger, als das EEG-Signal schwach ist und damit besonders suszeptibel für elektromyographische und elektrokardiographische Interferenzen ist. Häufigste Ursache für derartige Kontaminationen sind Beschädigungen der Silikonummantelung der Elektroden sowie sich aus den Bohrungen herauslösende Elektroden. EKG-Kontaminationen lassen sich recht leicht detektieren, da sie in einem sehr regelmäßigen Muster von 7 - 9 Hz (ca. 420 - 540 /min, siehe Abb. 3.34 B) auftreten.

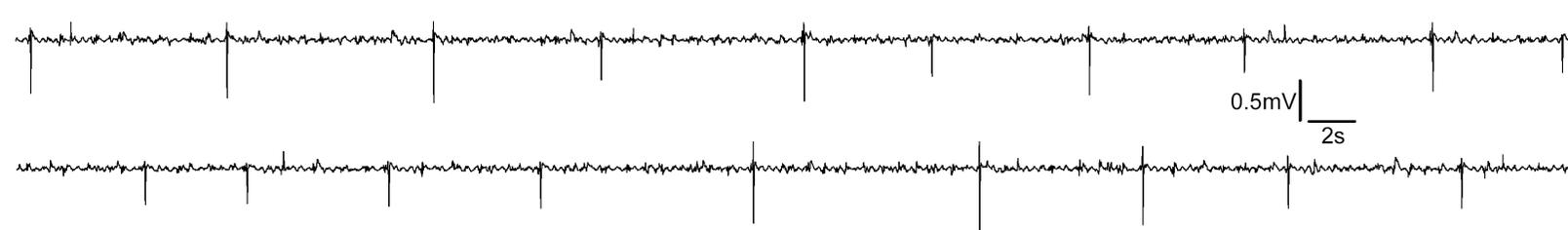
A) 4-Aminopyridine



B) Bicucullinmethobromide

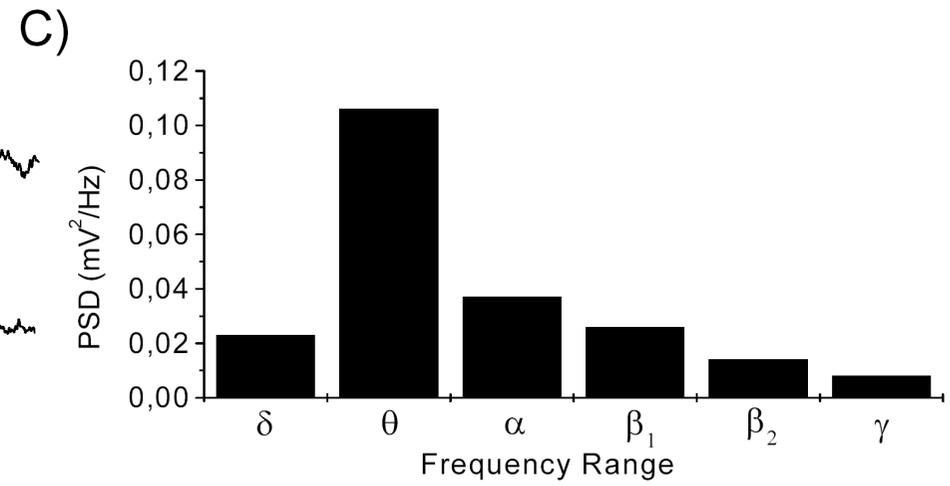
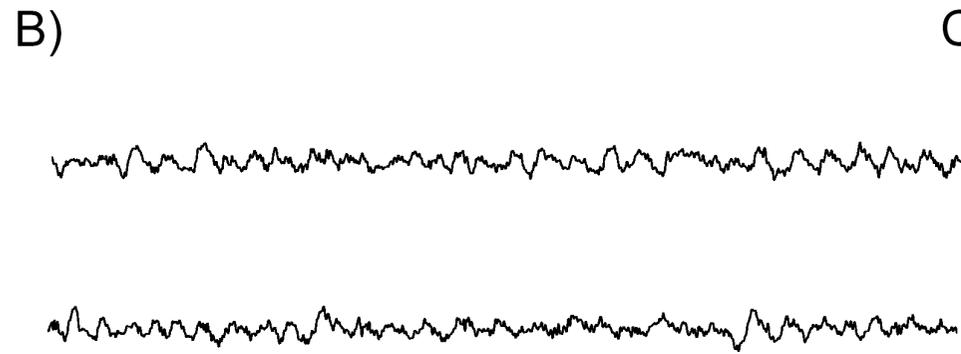
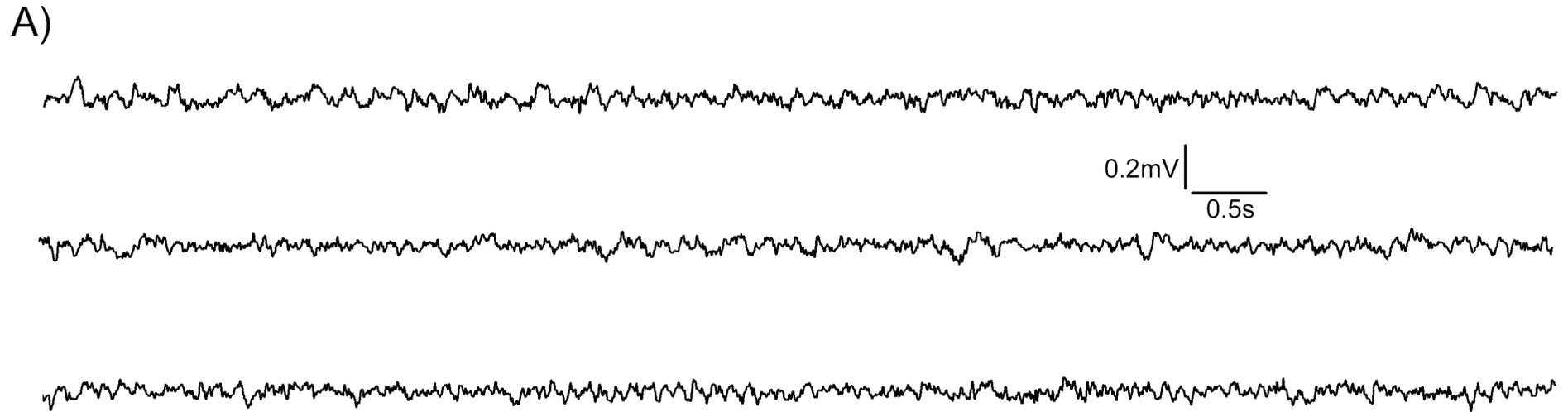


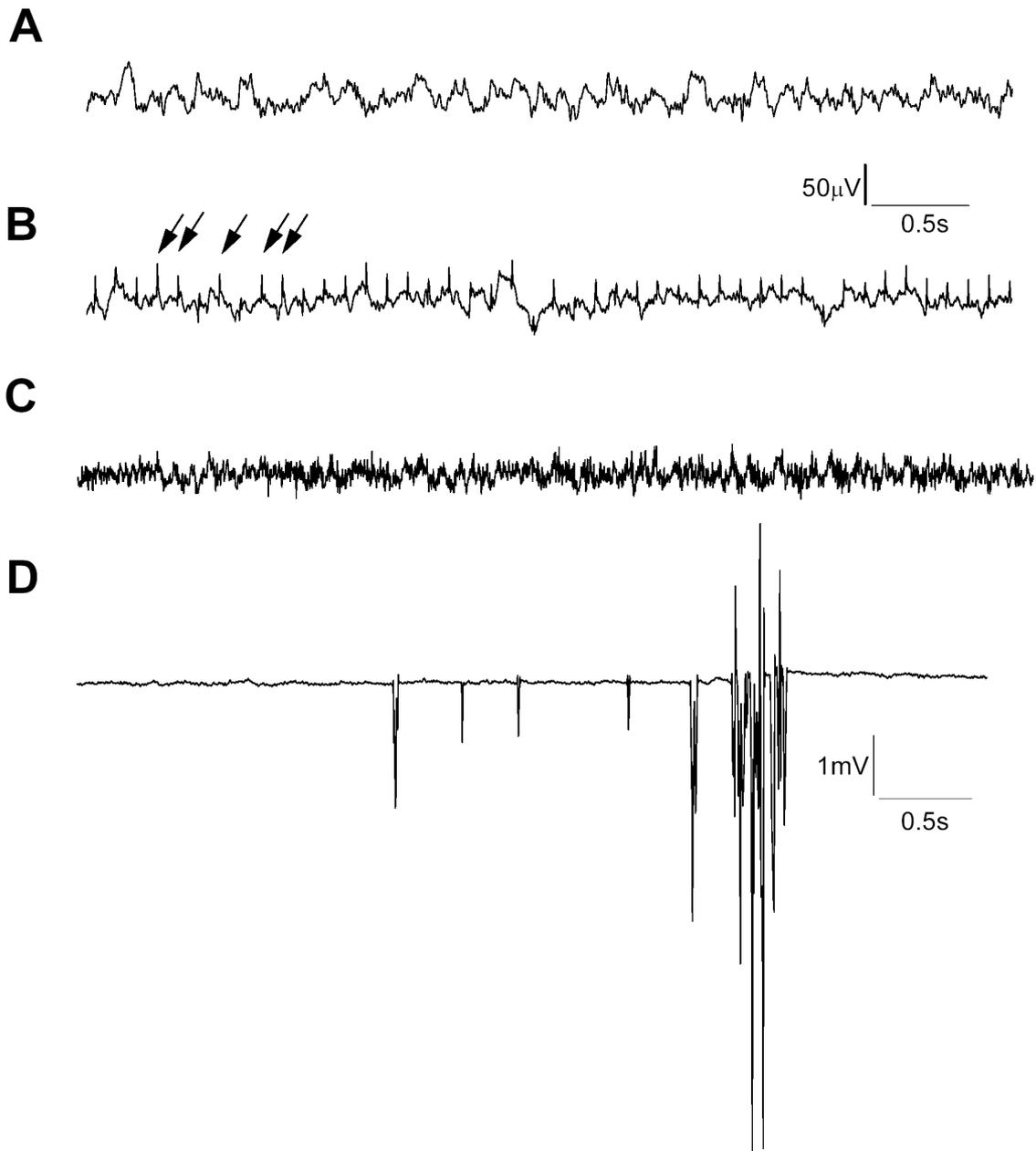
C) R/S-Baclofen



**Abb. 3.32: Pharmakologische Anfallssuszeptibilitätstestung bei Mäusen (siehe vorherige Seite).** Um die Anfallssuszeptibilität von transgenen Mausmodellen zu eruieren, wird i.d.R. eine Reihe von verschiedenen Pharmaka zur Induktion von generalisierten tonisch-klonischen Anfällen appliziert, denen unterschiedliche Wirkungsmechanismen zugrunde liegen. Im Rahmen der Etablierung der telemetrischen Erfassung von oberflächlichen EEG Aufzeichnungen bei Mäusen, wurde das 4-Aminopyridin (4-AP, (A)) und Pentylentetrazol (nicht dargestellt) verwendet. Phänotypisch durchlaufen die Versuchstiere post iniectionem eine charakteristische Abfolge von Stadien (Phase 1 - 4). Dargestellt ist der Beginn des generalisierten Anfalls (1), an den sich nach Ablauf eine Amplitudendepression anschließt (2 - 3). Der zweite generalisierte Anfall endet schließlich mit dem tonischen Wegstrecken der Hinterläufe (4). Mit Hilfe des GABA(A)-Rezeptorantagonisten Bicucullin sowie des GABA(B) Rezeptoragonisten Baclofen lassen sich Hyperoszillationsphänomene im thalamokortikalen-kortikothalamischen Neuronenkreis induzieren, die zu *spike-* bzw. *spike-wave*-Aktivität führen und dem elektroenzephalographischen Erscheinungsbild bei kleinen generalisierten Anfällen (*Petit Mal*) ähneln (Weiergräber et al., 2005b) .

**Abb. 3.33: Tiefe intrazerebrale Ableitung im Hippokampus (CA3) Region (siehe folgende Seite).** A) Deutlich ist die in dieser Region typische Theta-Aktivität (4 - 8 Hz) erkennbar. B) Theta-Aktivität im Hippokampus lässt sich bei Mäusen durch Auslösen von Such- und Erkundungsverhalten, z.B. bei Käfigwechsel, induzieren. C) Eine Frequenzanalyse (*Power Spectrum* Analyse basierend auf einer *Fast Fourier Transformation* (FFT)) zeigt deutlich die Dominanz dieses Frequenzbereiches im EEG ( $\delta$ : 1 - 4 Hz;  $\theta$ : 4 - 8 Hz;  $\alpha$ : 8 - 12 Hz ;  $\beta_1$ : 12 - 16 Hz;  $\beta_2$ : 16 - 32 Hz;  $\gamma$ : 32 - 50 Hz (Weiergräber et al., 2005b).





**Abb. 3.34: Artefakte bei der telemetrischen Aufzeichnung von Elektroenzephalogrammen.** A) Tiefe, intrazerebrale Ableitung aus der Hippokampusregion (CA3). B) Kontamination der intrazerebralen EEG-Ableitung mit einem EKG-Signal, das dem EEG superpositioniert ist. Deutlich ist die Regelmäßigkeit des EKG-Signals erkennbar (7 - 9 Hz bzw. 420 - 540 /min). Ursache hierfür sind, ähnlich wie bei EMG-Kontamination (C) Schäden in der Silikonisolationsschicht der Elektroden oder ein Herauslösen der Elektroden aus den Bohrkanälen. Extrem hochamplitudige und unphysiologische Signale (D) sind hingegen ein eindeutiges Beispiel für exogene Störeinflüsse (Stromleitungen, elektrische Geräte in Nachbarschaft der Empfängerplatten etc.). Eine elektrische Abschirmung (Faraday-Käfig) der Telemetrie-einrichtung kann hier Abhilfe schaffen (Weiergräber et al., 2005b).

## 4. Diskussion

### 4.1. Transgene Mäuse als Krankheitsmodelle in der Medizin

Die Zahl transgener Mausmodelle für Erkrankungen des Menschen nimmt kontinuierlich zu. Ein valides Tiermodell sollte dabei mindestens drei Anforderungen genügen. Zunächst sollte es einen Isomorphismus aufweisen, d.h. das klinische Bild, der Phänotyp des Versuchstieres, sollte dem Krankheitsbild beim Menschen ähneln. Weiterhin sollte das Modell Prädiktivität aufweisen, d.h. die pharmakologische Beeinflussbarkeit sollte vorhersagbar sein. Zuletzt erwartet man eine Homologie, d.h. eine vergleichbare Ätiologie wie beim humanen Krankheitskorrelat. Dieser strenge Anforderungskatalog wird in seiner Reinform von vielen Mausmodellen nicht erfüllt, da es zwar viele pathophysiologische Übereinstimmungen, aber trotzdem auch markante Unterschiede in Morphologie und Physiologie zwischen Maus und Mensch gibt. Eine Reihe von Diskrepanzen zwischen beiden Spezies hinsichtlich des kardiovaskulären Systems wurden bereits in Ausführlichkeit erörtert. Wie gezeigt, gibt es sowohl auf elektrophysiologisch-kardialer (*Patch-Clamp*-, *Current Clamp*-, EKG-) Ebene als auch morphologisch erhebliche Differenzen, die auch funktionelle physiologische Konsequenzen (Herzfrequenz, Rhythmusstörungen etc.) nach sich ziehen. Gerade im kardiovaskulären Bereich wurde daher die Aussagefähigkeit transgener Mausmodelle immer wieder z.T. heftig diskutiert (London, 2001; Nerbonne, 2004). Nicht nur dort, wo derartige Systeme als Modelle für kardiovaskuläre Erkrankungen des Menschen dienen, sondern auch bei neurologischen und endokrinologischen Erkrankungen, haben transgene Mausmodelle einen unschätzbaren Einblick in die funktionelle Relevanz von Proteinen ganz unterschiedlicher Funktion gegeben (Fletcher et al., 1996; Fletcher and Frankel, 1999; Burgess and Noebels, 1999; Jouvenceau et al., 2001; Pereverzev et al., 2002; Pereverzev et al., 2005; Jing et al., 2005). Sie stellen damit das entscheidende Bindeglied zwischen in vitro- und in vivo-Analyse dar. Ihr Wert liegt i.d.R. nicht in einer unmittelbaren Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnis auf den Menschen, da sich häufig z.B. Proteinexpressionsmuster und deren Dichten unterscheiden, sondern im Vermitteln des Wissens, welche funktionelle Rolle ein Protein in einem komplexen, in vitro in dieser Weise nicht simulierbaren, komplexen System wie der Maus spielt. Auf diese Weise erhält man unschätzbare Einblicke in potentielle Wirkmechanismen auch beim Menschen.

## 4.2. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle im Herzen

In den letzten Jahren wurde das Wissen hinsichtlich myogener Automatizität und Propagation der kardialen Erregung enorm erweitert. Durch die Aufklärung der strukturellen Grundlagen der aus der zellulären Elektrophysiologie bekannten Mechanismen der Erregungsbildung und Erregungsfortleitung im Herzen sind die Grundlagen der langsamen diastolischen Depolarisation und damit der kardialen Rhythmizität scheinbar ausnahmslos aufgeklärt. Neben den Hyperpolarisations- und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (HCN 1 - 4) wurden auch die T-Typ-Kalzium-kanäle  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  und  $Ca_v3.3$  in den letzten Jahren kloniert und haben das Verständnis um die ionalen Mechanismen der kardialen Erregung beflügelt. Dennoch sind eine Reihe von Komponenten unbekannt.

Zehn verschiedene  $\alpha_1$ -Untereinheiten spannungsgesteuerter Kalziumkanäle sind bislang kloniert und alle zugehörigen  $Ca_v$ -geninaktivierten Mausmodelle wurden bereits erstellt. Sie alle haben wesentliche Erkenntnisse nicht nur zur Physiologie und Biophysik der Ionenkanäle selbst, sondern auch in Hinblick auf kardiovaskuläre, neurologische und endokrine Erkrankungen bei Maus und Mensch geliefert. Nur vier Vertreter spannungsgesteuerter Kalziumkanäle galten als im Herzen exprimiert ( $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$ ), deren Ablation bei einigen ( $Ca_v1.3$  und  $Ca_v3.1$ ) zu markanten kardialen Phänotypen führte (Platzer et al., 2000; Mangoni et al., 2005), bei anderen hingegen entweder schon in der frühen Pränatalphase letal war ( $Ca_v1.2$ , Seisenberger et al., (2000)) oder keinen direkten kardialen Effekt zeigte ( $Ca_v3.2$ , Chen et al., (2003)).

Die vorliegende Arbeit legt eine kardiovaskuläre Charakterisierung  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse vor, unter Zuhilfenahme molekularbiologischer und elektrophysiologischer Verfahren. Sie zeigt, dass mit  $Ca_v2.3$  eine bis dahin für die kardiale Erregungsbildung- und Erregungsfortleitung als umstritten eingestufte Kalziumkanaluntereinheit einen wichtigen Beitrag zur funktionellen und möglicherweise strukturellen Integrität des Herzens beisteuert.

## 4.3. $Ca_v2.3$ im kardiovaskulären System der Ratte

Bereits 1997 konnten Piedras-Renteria et al. in atrialen Myozyten der Ratte mittels Antisense-Oligonukleotiden gegen  $Ca_v2.3$ , eine IGF-induzierte Erhöhung des T-Typ-Stromes in atrialen Rattenmyozyten inhibieren. Später gelang es in unserer Arbeitsgruppe  $Ca_v2.3$  im Rattenherzen auf Transkriptebeine zu amplifizieren

(Weiergräber et al., 2000), wobei sich die später als endokrine Spleißvariante bezeichnete Form  $Ca_v2.3e$  detektieren lies (Vajna et al., 1998). Auch im *Western-Blot* und auf immunhistochemischer Ebene erfolgte der Nachweis von  $Ca_v2.3$  im Rattenherzen (Weiergräber et al., 2000). Hierbei zeigte sich u.a., dass  $Ca_v2.3$ -positive Zellen histomorphologische Eigenschaften von Zellen des Erregungsbildungs- und Leitungssystems (Purkinjefasern) aufweisen und zudem mit Chromogranin A/B sowie ANP und auch  $Ca_v3.1$  ( $\alpha 1G$ ) kolokalisiert sind (Weiergräber et al., 2000). Obwohl nicht alle Arbeitsgruppen  $Ca_v2.3$  auf Transkriptebene im Herzen nachweisen konnten, wurde  $Ca_v2.3$  zwei Jahre später in der Gruppe um Phil Best aus dem Rattenvorhof kloniert (Mitchell et al., 2002) und  $Ca_v2.3e$  als dominante Splicevariante bestätigt. Die von Mitchell et al. durchgeführten *in situ* Hybridisierungsexperimente bestätigten desweiteren unsere immunhistochemischen Resultate, da  $Ca_v2.3$ -Transkripte im Rattenvorhof tatsächlich in Kardiomyozyten gefunden wurden und nicht in Fibrozyten oder glatten Muskelzellen der Tunica media von Gefäßstrukturen. Die funktionelle Relevanz blieb jedoch weiter im Unklaren. Die Kolokalisation mit ANP und Chromogranin A/B legte eine wichtige Rolle bei der myoendokrinen Funktion des Herzens nahe, jedoch konstatierten Leuranguer et al. (2000), dass SNX-482, ein selektiver Blocker der  $Ca_v2.3$  Untereinheit, im Rattenherzen keinen Einfluss auf die ANP-Sekretion habe, während T-Typ Kalziumkanäle die ANP-Sekretion förderten und L-Typ Kanäle diese hemmten. Dennoch gelang auch ihnen der deutliche Nachweis von  $Ca_v2.3$ -Transkripten im Rattenherzen, der sich entwicklungsabhängig veränderte (Leuranguer et al., 2000).

#### 4.4. $Ca_v2.3$ im kardiovaskulären System der Maus

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig Daten zur Transkription und Expression von  $Ca_v2.3$  im Herzen in Ausführlichkeit dargelegt. Während bei adulten Mäusen alle drei II-III-*loop* Spleißvarianten im Herzen vorliegen ( $Ca_v2.3d$ ,  $Ca_v2.3e$  und  $Ca_v2.3f$ ) und damit bezogen auf den C-Terminus die längere, Exon 45 enthaltende Variante zu finden ist, gibt es quantitative und qualitative Auffälligkeiten. So fand sich bei adulten Mauserzen z.B. durchweg eine größere Transkriptmenge in den Vorhofpräparationen im Vergleich zu Ventrikelpräparationen. Dies unterstützt die bereits eingangs erwähnte Vermutung, dass sich die  $Ca_v2.3$ -Expression im Erregungsbildungs- und Leitungssystem des Herzens fokussiert und in höherer Dichte in den Atrien zu finden ist. Untersuchungen an pränatalen Herzen zeigten

weiterhin, dass es deutliche qualitative und quantitative Unterschiede bzgl. der II-III-*loop* Spleißvarianten während der pränatalen kardialen Entwicklung gibt. So konnten wir zeigen, dass zum Zeitpunkt 12,5 und 14,5 Tage post coitum nur die Ca<sub>v</sub>2.3e Spleißvariante exprimiert wird, während sich zu einem späteren Zeitpunkt der pränatalen Herzentwicklung auch die andere II-III-*loop* Spleißvarianten hinzugesellen, wie z.B. Ca<sub>v</sub>2.3d und Ca<sub>v</sub>2.3f. Das deutliche Auftreten und das entwicklungsabhängige Erscheinen unterschiedlicher Splicevarianten während der pränatalen Entwicklung zeigt deutlich, dass Ca<sub>v</sub>2.3 bei der embryonalen Herzentwicklung wahrscheinlich eine zentrale Rolle spielt, die von unterschiedlichen Spleißvarianten getragen wird. Diese Annahme wird u.a. durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Phil Best gestützt, die mittels quantitativer RT-PCR zeigen konnten, dass sich im Rattenherzen hohe Ca<sub>v</sub>2.3 Transkriptionslevel während der pränatalen Herzentwicklung und im frühen neonatalen Abschnitt finden lassen. Maximale Transkriptzahlen für Ca<sub>v</sub>2.3 lagen vier Wochen post partum vor mit sich daran anschließender kontinuierlicher Transkriptabnahme. Erstaunlicherweise erreicht das Ca<sub>v</sub>2.3 Transkriptniveau pränatal hierbei annähernd Werte wie für den T-Typ Ca<sub>v</sub>3.1 ( $\alpha$ 1G) beschrieben (Larsen et al., 2002). Obwohl naheliegt, dass im Mausherzen ähnliche Verhältnisse vorliegen, liegt die exakte Bestätigung dessen bis jetzt noch nicht vor. In der Literatur finden sich u.a. Berichte darüber, dass innerhalb der Gruppe der niederspannungsaktivierten Kalziumkanäle der T-Typ Ca<sub>v</sub>3.2 ( $\alpha$ 1H) eine entscheidende Rolle bei der Kardiogenese und Ausdifferenzierung von kardiomyozytären Vorläuferzellen spielt (Niwa et al., 2004; Xia et al., 2004), aber auch Ca<sub>v</sub>3.1 (Cribbs et al., 2001). Eine mögliche Rolle der Ca<sub>v</sub>2.3 Kalziumkanaluntereinheit wurde hierbei noch nicht berücksichtigt.

Basierend auf einer Vielzahl offener Fragen, begann nach Generierung der Ca<sub>v</sub>2.3 defizienten Mauslinie (Pereverzev et al., 2002) deren kardiovaskuläre Charakterisierung. Da das Mausherz, wie bereits oben erwähnt, keine homogene Zellpopulation aufweist, sollten *single-cell* RT-PCR Versuche an isolierten Kardiomyozyten der Maus klären, ob die Transkripte tatsächlich auch kardiomyozytären Ursprungs sind. Wir können derzeit feststellen, dass 6 von 29 der untersuchten Maus-Kardiomyozyten Ca<sub>v</sub>2.3 Transkripte aufweisen. Dieser Befund deckt sich u.a. mit vorherigen immunhistochemischen Resultaten, die nur in einer distinkten Zellpopulation eine Ca<sub>v</sub>2.3 positive Reaktion aufweisen. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere kardiale, aber nicht-

kardiomyozytäre Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen, intrakardiale Ganglien)  $Ca_v2.3$  Transkripte aufweisen. Gerade für intrakardiale Ganglien ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, da diese im Rattenvorhof  $Ca_v2.3$  vermittelte resistente Ströme aufweisen (Jeong and Wurster, 1997a/b). Deren funktionelle Relevanz wird weiter unten ausführlich diskutiert.

Die Detektion von  $Ca_v2.3$  auf Transkriptebene lässt nicht zwangsläufig den Schluss zu, dass  $Ca_v2.3$ -Transkripte auch im Herzen größerer Säuger vorzufinden sind. Wie für die verzögerten Gleichrichterkomponenten IK bei Maus und Mensch gezeigt, können z.B. unterschiedliche Ionenkanalsubtypen eine spezifische physiologische Funktion (hier Repolarisation) übernehmen. Für  $Ca_v2.3$  gelang der Nachweis nicht nur in verschiedenen Regionen des Schweineherzens, sondern auch im rechten Vorhof (Auricula dextra) des Menschen.  $Ca_v2.3$ -Transkripte lassen sich also bei kleinen und großen Säugern gleichermaßen im Herzen detektieren.

#### 4.5. $Ca_v2.3$ -Nachweis in pränatalen Mauserzen und funktionelle Implikationen

Hat die Ablation von  $Ca_v2.3$  auch funktionelle Konsequenzen im kardiovaskulären System der Maus? *Multi-Electrode-Array* Experimente haben gezeigt, dass isolierte pränatale Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse nicht nur einen 4-fach höheren Variationskoeffizienten im Vergleich zu isolierten, pränatalen Kontrollherzen aufweisen, sondern auch eine stark fluktuierende Erregungsausbreitung über das Herz selbst (Lu et al., 2004). Dieses Resultat ist aus mehreren Gründen von besonderer Bedeutung. Zum einen macht es deutlich, dass Rhythmusstörungen bereits in pränatalen  $Ca_v2.3(-/-)$ -Herzen auftreten. Da sich diese sogar ex vivo, d.h. im isolierten Herzen finden lassen, kann man exogene (hormonelle und autonome) Faktoren als Ursache weitgehend ausschliessen, vergleichbar einem „*working heart*“ Ansatz beim adulten Herzen. Die Tatsache, dass sich die Erregungsfront in isolierten pränatalen Herzen  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse von Schlag zu Schlag variabel ausbreitet, unterstreicht zudem die Ergebnisse in adulten  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen, in denen offenbar auch andere, nicht orthotope Schrittmacher aktiv sind (Weiergräber et al., 2005a). Auch Superfusionsexperimente mit SNX-482 haben gezeigt, dass Arrhythmien in isolierten pränatalen Kontrollherzen induziert werden können. Konzentrationen über 200 nM wurden nicht verwendet, da dann auch zunehmend unspezifische Interaktionen mit anderen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen

nicht ausgeschlossen werden können (Newcomb et al., 1998). Um einen eventuellen Block z.B. der  $Ca_v1.2$  Untereinheit auszuschließen, wurden Experimente mit 200 nM SNX-482 auch an isolierten  $Ca_v2.3(-/-)$  Herzen durchgeführt. Da sich hierbei keine Unterschiede zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass die in  $Ca_v2.3(+/+)$  Herzen induzierten Rhythmusstörungen tatsächlich auf einer SNX-482 Wechselwirkung mit  $Ca_v2.3$  beruhen (Lu et al., 2004). Weiterhin zeigte die MEA-Analyse, dass es sich dabei primär um vorzeitige atriale Kontraktionen handelt - ein interessanter Befund, da auch adulte  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäuse komplexe atriale Aktivierungsstörungen aufweisen (Weiergräber et al., 2005a). Die hohe Variabilität in der Erregungsbildung und Fortleitung unterstreicht darüber hinaus, dass vielfach untergeordnete Schrittmacherzentren aktiv zu sein scheinen.

Wie bereits erwähnt, wird die Majorität des Kalziumeinstroms in Kardiomyozyten von  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) vermittelt, dessen Proteinkomplex als hochaffiner Dihydropyridin-Rezeptor angereichert und schließlich kloniert wurde (Schneider and Hofmann, 1988; Mikami et al., 1998).  $Ca_v1.2$  geninaktivierte Tiere sind aber nicht lebensfähig und sterben bereits im Embryonalstadium (14,5 Tage p.c.). Dennoch beginnen isolierte Herzen  $Ca_v1.2$  defizienter Embryonen zu schlagen und weisen vergleichbare Frequenzen wie embryonale Wildtyp Herzen gleichen Alters auf (Seisenberger et al., 2000). Obwohl das Transkriptniveau des  $Ca_v1.3$  Kalziumkanals im embryonalen Herzen  $Ca_v1.2(-/-)$  Mäuse vierfach erhöht ist, scheint  $Ca_v1.3$  nicht für die L-Typ ähnliche Stromkomponente in  $Ca_v1.2(-/-)$  Kardiomyozyten verantwortlich zu sein, da eine solche Stromkomponente auch in  $Ca_v1.3(-/-)$  Mäusen anzutreffen war (Klugbauer et al., 2002; Seisenberger et al., 2000). In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Dihydropyridin Isradipin  $Ca_v2.3$  zu inhibieren vermag und zwar mit  $IC_{50}$ -Werten, die im Rahmen dieser L-Typ ähnlichen Stromkomponente liegen (Seisenberger et al., 2000). Die hier dargestellten *Patch-Clamp* Ergebnisse legen nahe, dass  $Ca_v2.3$ , wenn nicht alleine, so doch mit anderen Ionenkanalentitäten eine wichtige Komponente dieses L-Typ ähnlichen Stroms im pränatalen Maus Herzen darstellen kann. Eine Korrelation zwischen  $Ca_v2.3$  und dem sog. TTX-empfindlichen nichtselektiven Kalziumstrom, der sich z.B. in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte findet (Aggarwal et al., 1997; Chen-Izu et al., 2001), konnte nicht hergestellt werden (Weiergräber and Schneider, unveröffentlichte Ergebnisse).

#### 4.6. Kardiale Phänotypisierung und autonome kardiovaskuläre Modulation in adulten $Ca_v2.3$ defizienten Mäusen

Mittels telemetrischer EKG-Aufzeichnungen konnte gezeigt werden, dass nicht nur pränatale  $Ca_v2.3$  geninaktivierte Tiere, sondern auch adulte defiziente Mäuse EKG-Auffälligkeiten aufweisen, die sowohl auf Störungen der atrialen Ebene (ektope Aktivierung) wie auch der ventrikulären Erregungsfortleitung (QRS-Dysmorphologien) beruhen. Mit Hilfe des autonomen Blocks konnte ferner gezeigt werden, dass dieser Phänotyp partiell eine intrinsisch, kardiale Ursache zu haben scheint, da atriale Aktivierungsstörungen und QRS-Dysmorphologien nach pharmakologischer autonomer Denervation persistieren. In welcher Weise  $Ca_v2.3$  dabei ursächlich auf zellulärer Ebene mitwirkt, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nur spekulativ andeuten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Jugularvenenkatheterisierungsexperimente zur systemischen herznahen Administration von SNX-482 zeigten zwar einen, gegenüber der Kontrollinjektion erhöhten Variationskoeffizienten der Herzschlagfrequenz, die deutlichen, in vivo bei adulten  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen erkennbaren EKG-Alterationen liessen sich aber nicht provozieren. Methodologische Einschränkungen, z.B. fehlende Informationen über die Pharmakokinetik des SNX-482 und mögliche Inaktivierung des Peptidtoxins bei systemischer Applikation, müssen jedoch hierbei mit in Betracht gezogen werden. Dennoch, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine resistente Stromkomponente in adulten Kardiomyozyten der Maus bislang nicht beschrieben wurde, liegt der Schluss nahe, dass  $Ca_v2.3$  eine kritische, funktionell besonders relevante Expression in der frühen embryonalen Herzentwicklung erfährt. Diese Vermutung wird durch mehrere Beobachtungen gestützt: zum einen zeigen bereits isolierte pränatale  $Ca_v2.3(-/-)$  Herzen Rhythmusstörungen und Alterationen der Erregungsausbreitung (s.o.). Zum anderen haben quantitative RT-PCR-Studien an pränatalen und adulten Rattenatrien das interessante Resultat geliefert, dass  $Ca_v2.3$  und  $Ca_v3.1$  vergleichbare Transkriptniveaus v.a. in der Pränatalphase aufweisen. So nehmen im Rattenatrium die  $Ca_v2.3$  Transkripte pränatal kontinuierlich zu und erreichen vier Wochen post partum ein Maximum, um dann im adulten Tier langsam wieder abzufallen (Larsen et al., 2002). Das  $Ca_v2.3$  Transkriptniveau im Rattenatrium ist somit pränatal erstaunlich hoch und legt eine funktionelle Relevanz nahe. In diesem Zusammenhang erscheinen auch zwei weitere Beobachtungen in einem neuen Licht: zum einen zeigten eigene ältere immunhistochemische Analysen eine

Kolokalisation von  $Ca_v2.3$  und  $Ca_v3.1$  (Weiergräber, medizinische Promotionsarbeit), zum anderen konnte sowohl in den Atrien wie auch in den Ventrikeln adulter  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse eine kompensatorische Hochregulation von  $Ca_v3.1$  nachgewiesen werden (Weiergräber et al., 2005a). Beiden Ionenkanälen liegt somit möglicherweise eine noch nicht näher bekannte funktionelle Koppelung zugrunde.

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass  $Ca_v2.3$  defiziente Mäuse auch in der quantitativen, zeitbasierten Analyse der Herzfrequenzvariabilität Unterschiede zu Kontrolltieren aufweisen. Hierbei überrascht weniger der erhöhte Variationskoeffizient, der das direkte Resultat der beschriebenen Rhythmusstörungen ist, als die signifikante Erhöhung der Herzfrequenz in  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren. Mit einer mittleren Frequenz von 529 bpm ( $Ca_v2.3(-/-)$ ) gegenüber 478 bpm ( $Ca_v2.3(+/+)$ ) liegen die ermittelten Frequenzen unterhalb der normalen Ruhefrequenz von Mäusen von ca. 600 - 700 bpm. Die Erfassung der Herzfrequenz ist, wie weiter oben beschrieben, stark von methodologischen Aspekten geprägt. So sind unter immobilisierenden Maßnahmen die ermittelten Herzfrequenzen stressbedingt erhöht. Obwohl telemetrische Verfahren die reale physiologische kardiovaskuläre Reaktion besser zu detektieren vermögen, üben auch sie modulatorische Einflüsse aus. So führt die intraperitoneale Implantation des Radiofrequenztransmitters zu einer Erhöhung des intraabdominellen Druckes und damit zu einer Aktivierung der Phase I des Valsalva-Effekts. Dies hat eine Erniedrigung des venösen Rückstromes zum Herzen und eine Vagusaktivierung zur Folge, die eine Verminderung der Herzfrequenz bewirkt (Gehrmann et al., 2000). Erst in der Phase II des Valsalva-Effektes ist dann wieder mit einem Anstieg der Herzfrequenz (reflektorische Tachykardie infolge Hypotension) zu rechnen, der sich allerdings bei Mäusen nicht immer findet. Die Literatur berichtet daher wiederholt über erniedrigte Herzfrequenzen in Studien, welche kardiovaskuläre Untersuchungen an Mäusen mittels intraabdominaler Implantation eines Radiofrequenztransmitters durchgeführt haben (Shusterman et al., 2002). Dieser Effekt lässt sich zwar durch eine subkutane Implantation im Rückenbereich weitgehend vermeiden, druckbedingt kommt es aber häufig zu Hautnekrosen, so dass Langzeituntersuchungen über mehrere Wochen nur bedingt durchführbar sind. Herzfrequenzuntersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass sowohl beim Menschen (Huikuri et al., 1996; Umetani et al., 1998) als auch bei der Ratte (Chandler and DiCarlo, 1998; El-Mas and Abdel-Rahman, 1997) Individuen weiblichen Geschlechtes eine höhere Frequenz

aufweisen als männliche Individuen, ein Phänomen, dass mit dem Alter an Bedeutung verliert (Umetani et al., 1998; Harper et al., 1982). Auch in den Mausstämmen C57Bl/6 sowie 129/Svj zeigten sich signifikant höhere Herzfrequenzen bei Weibchen ( $741 \pm 2$  bpm bzw.  $689 \pm 12$  bpm) als bei Männchen ( $692 \pm 5$  bpm bzw.  $571 \pm 13$  bpm), während sich bei FVB/N-Mäusen eine gegenteilige Tendenz fand ( $706 \pm 7$  bpm v.  $736 \pm 5$  bpm). Nach intraperitonealer Implantation eines Radiofrequenztransmitters fanden sich für FVB/N-Mäuse keine signifikanten Geschlechtsunterschiede mehr (Mitchell et al., 1998). Damit wird deutlich, dass es nicht nur Mausstamm-spezifische Unterschiede, sondern auch geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Herzfrequenz gibt, die auf Unterschiede im Hormonstatus und daraus resultierende Unterschiede in der autonomen kardiovaskulären Regulation zurückzuführen sind (Blizard and Welty, 1971; Piccini et al., 1982; Huikuri et al., 1996; Desai et al., 1997). Bis auf eine Ausnahme (Kontrolltier) wurden daher auch ausschliesslich männliche Versuchstiere verwendet.

Analog zur qualitativen EKG-Analyse stellt sich auch bei der zeitbasierten Analyse der Herzfrequenzvariabilität die Frage, inwieweit ein veränderter autonomer Input Einfluss auf die erhöhte Herzfrequenz in  $Ca_v2.3$  defizienten Mäusen ausübt oder nicht. Da nach autonomem Block keine signifikanten Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen  $Ca_v2.3(+|+)$  und  $Ca_v2.3(-|-)$  Tieren mehr sichtbar waren, muss gefolgert werden, dass ein veränderter autonomer Input in  $Ca_v2.3(-|-)$  Mäusen vorliegt. Bei kleinen Nagern dominiert der Sympathikotonus massiv, da es nach kombinierter Verabreichung von Atropin und Propranolol zu einer signifikanten Abnahme der Herzfrequenz kommt. Zum anderen hat die exklusive parasymphatische Blockade mittels Atropin keinen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz erbracht (Wickman et al., 1998). Der vagale Tonus unter physiologischen Bedingungen muss daher bei Mäusen als vernachlässigbar gering eingestuft werden. Dies legt nahe, dass ein erhöhter Sympathikotonus in  $Ca_v2.3(-|-)$  Mäusen vorherrscht.

Hinsichtlich der Effekte der  $\beta$ -Sympathomimese gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb von C57Bl/6 Mäusen, die wie beim Menschen u.a. auf Unterschieden in der Barorezeptorreflexaktivität beruhen (Abdel-Rahman et al., 1994). So kann z.B. Östrogen die Barorezeptorsensitivität erhöhen (Mohamed et al., 1999) und das Antwortverhalten der Herzfrequenz nach Administration von

Isoproterenol in Ratten abschwächen (Fregly and Thrasher, 1977). Ein erhöhter Sympathikotonus lässt sich pharmakologisch durch eine repetitive Injektion von Isoproterenol imitieren, in deren Verlauf es auch zu einer Abnahme der Herzfrequenz und einer signifikanten Zunahme der QRS-Dauer bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Mäusen kam. Obwohl dies als Zeichen einer  $\beta$ -Adrenorezeptordesensibilisierung aufzufassen ist, zeigten beide Geschlechter dennoch eine erhöhte Sensitivität nach wiederholter Administration gegenüber akut verabreichtem Isoproterenol, die u.a. mit einer Herzhypertrophie einherging (Kudei et al., 1997; Slawson et al., 1998). So führte die von Chu et al. (2001) durchgeführte Studie nach intraperitonealer Injektion von Isoproterenol (2,5  $\mu\text{g/g}$ ) jeweils um 9<sup>00</sup> und 21<sup>00</sup> über einen Zeitraum von drei Tagen zu einem Anstieg des Herzgewichtes um 16 % bei beiden Geschlechtern. Interessanterweise kam es auch zu einem akuten signifikanten Anstieg der Herzfrequenz in beiden Geschlechtern um  $27 \pm 6$  % bei männlichen und  $22 \pm 3$  % bei weiblichen Tieren. Es liegt zunächst nahe, dass eine  $\beta$ -Adrenorezeptordesensibilisierung (Kudei et al., 1997) oder auch eine sekundär verursachte reduzierte Aktomyosin-ATPase-Aktivität (Gordon et al., 1972) für die Reduktion der basalen Herzfrequenz in diesem Modell verantwortlich ist. Die akute, signifikante Reaktion auf erneute Isoproterenol-Injektion scheint dem jedoch zu widersprechen, so dass vermutet wird, dass hier andere Mechanismen, wie z.B. eine Ischämie-induzierte Aktivierung der  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase oder auch eine Modulation G-Protein gekoppelter Signaltransduktionswege, die ein Aufrechterhalten der Adenylatcyclaseaktivität bedingen, hierbei von Bedeutung sind (Hammond et al., 1993; Ungerer et al., 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit dargelegten Resultate zur Propranolol- und Isoproterenolempfindlichkeit zeigen daher Parallelen zu den oben angeführten Studien. Obwohl nicht auszuschliessen, so liegt dennoch nahe, dass andere Mechanismen als eine klassische  $\beta$ -Adrenorezeptordesensibilisierung für das fehlende Antwortverhalten auf Propranolol bei persistierender Isoproterenolempfindlichkeit verantwortlich sind. Wenn eine verstärkte Adrenorezeptorkinaseaktivität und/oder Modifikationen in G-Protein vermittelten Signaltransduktionswegen bei der „Propranololresistenz“ von Bedeutung sein sollten, so bleibt dennoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, welche Mechanismen im Detail die akute Isoproterenol-Reaktivität in  $\text{Ca}_v2.3(-/-)$  Mäusen aufrechterhalten bzw. verstärken.

Die hier vorgestellten Isoproterenoldaten unterstreichen weiterhin Literaturdaten, die eine typische „ST-Strecken“-Senkung als Ausdruck einer akuten subendokardialen Ischämie favorisieren (Chu et al., 2001), eine Beobachtung die bereits bei der Ratte (Bestetti and Oliveira, 1990) und beim Menschen (Winsor et al., 1975) seit längerem bekannt sind. Eine solche „ST-Strecken“-Senkung fand sich auch bei den eigenen Versuchen in allen männlichen Tieren, während sich bei einem untersuchten weiblichen Tier eine gegensätzliche Entwicklung der ST-Strecke und T-Welle zeigte. Es wird angenommen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression der Gluthathion-S-Transferase (GST), die sich in höherer Expressionsdichte bei weiblichen Mäusen findet, hierbei von Bedeutung sind, da damit deren antioxidatives Potential höher ist als bei männlichen Tieren (Mitchell et al., 1997). Es ist daher denkbar, dass Isoproterenol-induzierter oxidativer Stress von weiblichen Mäusen aufgrund höherer GST-Spiegel kardial besser kompensiert wird als von männlichen Tieren (Rathore et al., 1998).

Bezüglich der Isoproterenolveruche muss angemerkt werden, dass sympathische intrakardiale Nervenendigungen nicht nur Adrenalin (Maki et al., 1996) und Noradrenalin (Zhang et al., 1992) freisetzen, sondern auch Neuropeptide, wie z.B. Neuropeptid Y (NPY, Protas et al., 2003). Die sympathisch-kardiale Interaktion ist somit komplexer Natur.

Eine sowohl zentrale, wie auch periphere, organnahe Modulation des autonomen Nervensystems wird durch die Ergebnisse der zeitbasierten Herzfrequenzanalyse gestützt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig über die Modulation des Sympathikus und Parasympathikus durch  $Ca_v2.3$  bekannt. R-Typ-Stromkomponenten sind in parasympathischen Ganglien zwar beschrieben, treten aber deutlich hinter anderen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen zurück, die einen deutlichen Beitrag zur Neurotransmitterfreisetzung leisten, wie z.B. N-Typ Kalziumkanäle (Mori et al., 2002). Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle wie  $Ca_v1.2$  werden durch Acetylcholin gehemmt (Bannister et al., 2002), ebenso aber auch R-Typ Kalziumkanäle in rekombinanten Systemen (Meza et al., 1999) sowie in paratrachealen Ganglien über M2 muscarinerge Rezeptoren (Murai et al., 1998). Es ist daher wahrscheinlich, dass  $Ca_v2.3$  sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch eine wichtige Rolle bei der autonomen Transmission spielt.

Ob  $Ca_v2.3$  auch eine Rolle bei der myoendokrinen Funktion des Mausherzens spielt ist bislang nicht abschließend geklärt. Es bestehen Hinweise, dass  $Ca_v2.3$  positive

Zellen auch ANP und Chromogranin A/B positiv sind und daher bei der ANP-Sekretion mitwirken könnten (Steiner et al., 1990; Weiergräber et al., 2000). Der primäre Stimulus für die ANP-Freisetzung ist eine Zugwirkung an der einzelnen Kardiomyozyte. ANP-mRNA lässt sich bei der Maus zuerst am 8 - 9 Tage p.c. nachweisen mit Expressionsspitzen 12,5, 14,5 und 16,5 Tage p.c. wobei jedes dieser Stadien mit Schlüsselstellen der embryonalen Herzentwicklung korreliert. Am Tage 9 p.c. beginnt der reguläre Herzschlag im Primitivherzen, am 12. Tage die Septumformation mit Bildung der vier Herzhöhlen (frühes Septalstadium 14,5 - 16,5 p.c., spätes Septalstadium 17,5 p.c.) wobei es am Tage 15 schliesslich zur Ausrichtung der Herzachse kommt. Kurz nach Beendigung der ventrikulären Septumformation endet auch die Rekrutierung und Ausdifferenzierung des AV-Knotens, des His-Bündels und der Tawara-Schenkel. Das Auftreten von  $Ca_v2.3e$  Transkripten (12,5 - 14,5 Tage p.c.) korreliert hierbei zeitlich mit dem ersten Auftreten des ventrikulären Erregungsleitungssystems und unterstreicht eine mögliche Rolle von  $Ca_v2.3$  bei der kardialen Organogenese, v.a. bei der Induktion, Ausbildung und strukturellen Organisation des Erregungsleitungssystems.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde neben telemetrischen EKG-Ableitungen auch ein Verfahren zur telemetrischen Implantation von Radiofrequenztransmittern und anschliessender EEG-Elektrodenimplantation bei Mäusen erfolgreich eingeführt und verbessert, auf das im Folgenden kurz eingegangen werden soll. Anspruchsvolle Ansätze zur Ableitung von EEGs bei Ratten und Meerschweinchen existieren schon seit einiger Zeit, wobei die geringe Größe der Versuchstiere lange Zeit der limitierende Faktor war (Cotugno et al., 1996; Bastlund et al., 2004). Mit der zunehmenden Miniaturisierung der Radiofrequenztransmitter ist es mittlerweile möglich, telemetrische Aufzeichnungen auch an Mäusen durchzuführen und damit das weite Feld transgener Tiere elektrophysiologisch zu erforschen (Kramer and Kinter, 2003).

Zwei verschiedene Verfahren der Implantation bei Mäusen sind durchführbar, die intraperitoneale sowie die subkutane *Pouch*-Implantation. Obwohl keine der Verfahren zu einer Reduktion der Signalstärke führt (evtl. bedingt durch den Abstand des Transmitters zur Empfängerplatte), haben beide Methoden ihre Vor- und Nachteile. In subkutaner Position besteht die Gefahr der Hautnekrose (siehe auch EKG-Ableitungen), bedingt durch den subkutan einwirkenden Druck des implantierten Transmitters. Da die Fixation an der Rückenhaut erfolgt, hat eine

Hautnekrose oder ein Ausreißen der Naht eine Mobilisation des Transmitters zur Folge und kann damit Zugwirkung an den implantierten Elektroden ausüben. Subkutane Implantation vermeidet dagegen die Gefahr einer Kompression des Gastrointestinaltraktes, die einen paralytischen oder mechanischen Ileus zur Folge haben kann. Bei Mäusen muss daher für die intraperitoneale Implantation ein Mindestlebensgewicht von 20 g angesetzt werden, was einem Alter von > 10 Wochen entspricht. Der subkutane Ansatz kann dagegen theoretisch auch in jüngeren Tieren durchgeführt werden.

Die verwendeten Transmitter werden standardmäßig mit einer Elektrodenlänge von 20 cm geliefert. Da man bei jeder Implantation ca. 5 mm Elektrodenmaterial verlustig wird, ist das Elektrodenmaterial kostbar und muss intraabdominal oder subkutan regelrecht untergebracht werden. Dies erfolgt durch Unterbringung in Schleifen, die zu keinerlei Beeinträchtigungen der Tiere geführt haben. Bei subkutaner Platzierung der Elektrodenschleifen kann es langfristig zu Anzeichen von Drucknekrosen kommen. Dennoch finden sich 7 - 14 Tage nach Implantation keine Verhaltensauffälligkeiten der implantierten Mäuse.

Eine Vielzahl von Techniken zur EEG-Ableitung sind bislang beschrieben worden, die sich Silberelektroden, Stahlelektroden oder auch Schraubenelektroden bedienen (Nakano et al., 1994; Tang and Sanford, 2002). Im Gegensatz zu jüngeren Publikationen zur EEG-Elektrodenimplantation bei Ratten und Mäusen, kommt das hier vorgestellte Verfahren ohne diese Hilfsmittel aus. Die Kabelenden dienen als Elektroden und werden direkt auf die Dura mater oder intrazerebral implantiert und mit Glas-Ionomerzement fixiert. Qualitativ hochwertige EEG-Aufzeichnungen erhält man für einen Zeitraum von mindestens 5 - 6 Wochen. Zu späteren Zeitpunkten kann es zu reaktiven Proliferationsprozessen im Bereich der kranialen Bohrungen kommen, die ein Verschieben oder gar Lösen der Elektroden zur Folge haben können und dann auch zu einer Kontamination des EEG Signals mit EMG und EKG führen. Kürzlich wurde ein neuer Radiofrequenztransmitter entwickelt (F20-EET, DSI), der die simultane Aufzeichnung von EEG und EMG und damit eine komplexe Analyse von Hirnpotentialen bei Mäusen ermöglicht.

#### 4.7. Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass  $Ca_v2.3$  im Konzert kardial relevanter spannungsgesteuerter Kalziumkanäle von funktioneller Bedeutung ist. Es gelang nicht nur die Amplifikation unterschiedlicher  $Ca_v2.3$  Spleißvarianten in verschiedenen Spezies, sondern auch der Nachweis, dass diese einer entwicklungsabhängigen Modifikation unterliegen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $Ca_v2.3$  sowohl in pränatalen als auch in adulten Mausherzen funktionell relevant ist und dass diese Funktion nicht nur intrinsisch-kardialer Natur ist, sondern auch das autonome Nervensystem mit einbezieht.  $Ca_v2.3$  präsentiert sich damit als ein wichtiger Modulator des kardiovaskulären Systems. Da die SNX-482 Administration in adulten Tieren nur geringe kardiale Effekte zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass es ein kritisches Zeitfenster in der frühen prä- bis perinatalen Herzentwicklung gibt, in der  $Ca_v2.3$  eine Schlüsselstellung einnimmt. Elektrophysiologische (*Patch-Clamp*) Untersuchungen werden in der Zukunft zeigen, welche Rolle  $Ca_v2.3$  auf zellulärer Ebene innerhalb des Erregungsbildungs- und Leitungssystems spielt.

## 5. Zusammenfassung

Basierend auf transgenen Mausmodelle, die einen Einblick in Ätiologie und Pathogenese von Kanalkrankheiten ermöglichen, hat sich das Wissen hinsichtlich kardiomyogener Automatizität und Propagation der kardialen Erregung in den letzten Jahren enorm erweitert.

Nur vier Vertreter spannungsgesteuerter Kalziumkanäle galten ursprünglich als im Herzen exprimiert ( $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v3.1$  und  $Ca_v3.2$ ), deren Ablation bei  $Ca_v1.3$  und  $Ca_v3.1$  zu markanten kardialen Phänotypen führte, bei anderen hingegen entweder schon in der frühen Pränatalphase letal war ( $Ca_v1.2$ ) oder keinen direkten kardialen Effekt zeigte ( $Ca_v3.2$ ). Die vorliegende Arbeit legt eine kardiovaskuläre Charakterisierung  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse vor, unter Zuhilfenahme molekularbiologischer und elektrophysiologischer Verfahren. Sie zeigt, dass mit  $Ca_v2.3$  eine bis dahin für die kardiale Erregungsbildung- und Erregungsfortleitung als umstritten eingestufte Kalziumkanaluntereinheit einen wichtigen Beitrag zur funktionellen Integrität des Herzens und des kardiovaskulären Systems beisteuert.

Auf molekularbiologischer Ebene konnte gezeigt werden, dass nicht nur unterschiedliche  $Ca_v2.3$  Spleißvarianten im Mauserzen vorliegen, die v.a. in der Pränatalphase eine entwicklungsabhängige Änderung im Verteilungsmuster aufweisen, sondern auch höhere Transkriptzahlen im Atrium im Vergleich zum Ventrikel vorzufinden sind. Diese Ergebnisse wurden durch funktionelle (MEA) Studien unterstützt, die in isolierten pränatalen  $Ca_v2.3(-/-)$  Herzen nicht nur einen erhöhten Variationskoeffizienten, sondern auch Störungen der kardialen Erregungsausbreitung zeigten. Telemetrische EKG-Aufzeichnungen von  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen konnten weiterhin belegen, dass auch in adulten Tieren Arrhythmien vorliegen, die sowohl Störungen der atrialen Erregung, der AV-Überleitung und der ventrikulären Erregungsausbreitung beinhalten. Die zeitbasierte Analyse der Herzfrequenzvariabilität machte deutlich, dass  $Ca_v2.3(-/-)$  Tiere nicht nur eine signifikante Erhöhung des Variationskoeffizienten, sondern auch der Herzfrequenz aufweisen. Mittels eines pharmakologischen autonomen Blocks stellte sich heraus, dass die erhöhte Herzfrequenz das Resultat eines erhöhten Sympathikotonus ist und auch die AV-Blockbilder waren nach autonomer pharmakologischer Denervation nicht mehr vorzufinden. Damit wurde, bestärkt durch weitere pharmakologische Injektionsexperimente, deutlich, dass  $Ca_v2.3$  innerhalb des kardiovaskulären

Systems sowohl intrinsisch-kardiale, als auch extrinsisch-autonome Aufgaben übernimmt. Die Untersuchung des sympathischen Astes des autonomen Nervensystems zeigte überraschenderweise eine „Propranololresistenz“ in  $Ca_v2.3(-/-)$  Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren, dessen zugrundeliegender Mechanismus und funktionelle Implikation noch ungeklärt ist. Die pharmakologisch induzierbare maximale Herzfrequenzbreite und die Herzreserve weisen eine deutliche Reduktion in  $Ca_v2.3(-/-)$  Tieren auf und müssen in ursächlichem Zusammenhang mit dem signifikant schlechteren Abschneiden  $Ca_v2.3$  defizienter Mäuse im Lauftradexperiment im Vergleich zu Kontrolltieren gesehen werden.

Die vorliegende Arbeit stellt dar, dass  $Ca_v2.3$  in Physiologie und Pathophysiologie des Herzen nicht nur im Erregungsbildungs- und Leitungssystem von Bedeutung ist, sondern auch eine wichtige Funktion bei der autonomen Transmission spielt. Da sich  $Ca_v2.3$  Transkripte nicht nur im Maus- und Rattenherzen, sondern auch im Herzen großer Säuger (Hausschwein, Mensch) finden ließen, gewinnt  $Ca_v2.3$  damit auch humanpathophysiologisch Relevanz. Zukünftige *Patch-Clamp* Studien müssen zeigen, welche Rolle  $Ca_v2.3$  hierbei auf Einzelzellebene spielt.

## 6. Literatur

- Abdel-Rahman, A. A. (1999) Gender difference in baroreflex-mediated bradycardia in young rats: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 77, 358-366.
- Abdel-Rahman, A. R., Merrill, R. H., and Wooles, W. R. (1994) Gender-related differences in the baroreceptor reflex control of heart rate in normotensive humans. *J. Appl. Physiol.*, 77, 606-613.
- Aggarwal, R., Shorofsky, S. R., Goldman, L., and Balke, C. W. (1997) Tetrodotoxin-blockable calcium currents in rat ventricular myocytes; a third type of cardiac cell sodium current. *J. Physiol.*, 505, 353-369.
- Aidley, D.J. (1998) *The Physiology of Excitable Cells*. 4<sup>th</sup> edition, Cambridge University Press.
- Anderson, M. P., Mochizuki, T., Xie, J., Fischler, W., Manger, J. P., Talley, E. M., Scammell, T. E., and Tonegawa, S. (2005) Thalamic Ca<sub>v</sub>3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 1743-1748.
- Babenko, A. P., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1998) A view of SUR/K(IR)6.X, K-ATP channels. *Annu Rev Physiol.*, 60, 667-687.
- Baker, L. C., London, B., Choi, B. R., Koren, G., and Salama, G. (2000) Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circ Res.*, 86, 396-407.
- Bannister, R. A., Melliti, K., and Adams, B. A. (2002) Reconstituted slow muscarinic inhibition of neuronal (Ca<sub>v</sub>1.2c) L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys. J.*, 83, 3256-3267.
- Baruscotti, M. and DiFrancesco, D. (2004) Pacemaker channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1015, 111-121.

- Bastlund, J. F., Jennum, P., Mohapel, P., Vogel, V., and Watson, W. P. (2004) Measurement of cortical and hippocampal epileptiform activity in freely moving rats by means of implantable radiotelemetry. *J. Neurosci. Methods*, 138, 65-72.
- Bean, B. P., Cohen, C. J., and Tsien, R. W. (1983) Lidocaine Block of Cardiac Sodium-Channels. *J. Gen. Physiol.*, 81, 613-642.
- Bean, B. P. (1984) Nitrendipine Block of Cardiac Calcium Channels - High-Affinity Binding to the Inactivated State. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6388-6392.
- Bean, B. P. (1985) 2 Kinds of Calcium Channels in Canine Atrial Cells - Differences in Kinetics, Selectivity and Pharmacology. *J. Gen. Physiol.*, 86, 1-30.
- Benardeau, A., Weissenburger, J., Hondeghem, L., and Ertel, E. A. (2000) Effects of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker mibefradil on repolarization of guinea pig, rabbit, dog, monkey, and human cardiac tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292, 561-575.
- Bers, D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415, 198-205.
- Bers, D. R. and Perez-Reyes, E. (1999) Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.*, 42, 339-360.
- Bertram, E. H., Williamson, J. M., Cornett, J. F., Spradlin, S., and Chen, Z. F. (1997) Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 2, 85-97.
- Bestetti, R. B. and Oliveira, J. S. M. (1990) The Surface Electrocardiogram - A Simple and Reliable Method for Detecting Overt and Latent Heart-Disease in Rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23, 1213-1222.
- Beuckelmann, D. J., Nabauer, M., and Erdmann, E. (1991) Characteristics of Calcium-Current in Isolated Human Ventricular Myocytes from Patients with Terminal Heart-Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 23, 929-937.

- Biel, M., Schneider, A., and Wahl, C. (2002) Cardiac HCN channels: Structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.*, 12, 206-213.
- Billette, J. (1987) Atrioventricular Nodal Activation During Periodic Premature Stimulation of the Atrium. *Am. J. Physiol.*, 252, H163-H177.
- Bleeker, W. K., Mackaay, A. J. C., Massonpevet, M., Bouman, L. N., and Becker, A. E. (1980) Functional and Morphological Organization of the Rabbit Sinus Node. *Circ. Res.*, 46, 11-22.
- Blizard, D. A. and Welty, R. (1971) Cardiac Activity in Mouse - Strain Differences. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 77, 337.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2000) Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett.*, 481, 73-76.
- Bolli, R. and Marban, E. (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.*, 79, 609-634.
- Bonvallet, R. (1987) A Low Threshold Calcium Current Recorded at Physiological Ca Concentrations in Single Frog Atrial Cells. *Pflugers Arch.*, 408, 540-542.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., Mackenzie, L., de Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F., and Lipp, P. (2001) Calcium signalling - an overview. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 12, 3-10.
- Bourinet, E., Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J., and Zamponi, G. W. (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca<sub>v</sub>2.3) calcium channels. *Biophys J.*, 81, 79-88.
- Bourinet, E., Mangoni, M. E., and Nargeot, J. (2004) Dissecting the functional role of different isoforms of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *J. Clin. Invest.*, 113, 1382-1384.

- Boyett, M. R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000) The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.*, 47, 658-687.
- Brotto, M. A. D. and Creazzo, T. L. (1996)  $Ca^{2+}$  transients in embryonic chick heart: Contributions from  $Ca^{2+}$  channels and the sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 39, H518-H525.
- Burgess, D. L. and Noebels, J. L. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci., Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors*, 868, 199-212.
- Burnette, W. N. (1981) Western Blotting - Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein-A. *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.
- Callewaert, G., Carmeliet, E., and Vereecke, J. (1984) Single Cardiac Purkinje-Cells - General Electrophysiology and Voltage-Clamp Analysis of the Pace-Maker Current. *J. Physiol.*, 349, 643-&.
- Campbell, D. L., Rasmusson, R. L., and Strauss, H. C. (1992) Ionic Current Mechanisms Generating Vertebrate Primary Cardiac-Pacemaker Activity at the Single Cell Level - An Integrative View. *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 279-302.
- Catterall, W. A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., and Perez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: Calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, 55, 579-581.
- Chandler, M. P. and DiCarlo, S. E. (1998) Acute exercise and gender alter cardiac autonomic tonus differently in hypertensive and normotensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 43, R510-R516.

- Chen-Izu, Y., Moreno, A. P., and Spangler, R. A. (2001) Opposing gates model for voltage gating of gap junction channels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281, C1604-C1613.
- Chen, C. C., Lamping, K. G., Nuno, D. W., Barresi, R., Prouty, S. J., Lavoie, J. L., Cribbs, L. L., England, S. K., Sigmund, C. D., Weiss, R. M., Williamson, R. A., Hill, J. A., and Campbell, K. P. (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha(1H) T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*, 302, 1416-1418.
- Chen, S., Ren, Y. Q., Bing, R. J., and Hillman, D. E. (2000) Alpha 1E subunit of the R-type calcium channel is associated with myelinogenesis. *J. Neurocytol.*, 29, 719-728.
- Cho, H. S., Takano, M., and Noma, A. (2003) The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J. Physiol.*, 550, 169-180.
- Chu, V., Otero, J. M., Lopez, O., Morgan, J. P., Amende, I., and Hampton, T. G. (2001). Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. *BMC Physiol.*, 1, 6.
- Cooper, T.G. (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden*. 1. Auflage, de Gruyter.
- Cotugno, M., Mandile, P., D'Angiolillo, D., Montagnese, P., and Giuditta, A. (1996) Implantation of an EEG telemetric transmitter in the rat. *Ital. J. Neurol. Sci.*, 17, 131-134.
- Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998) Cloning and characterization of alpha 1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ. Res.*, 83, 103-109.
- Crick, S. J., Sheppard, M. N., Ho, S. Y., Gebstein, L., and Anderson, R. H. (1998) Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J. Anat.*, 193, 105-119.

- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., and Marescaux, C. (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog. Neurobiol.*, 55, 27-57.
- Davis, L. D. and Temte, J. V. (1969) Electrophysiological Actions of Lidocaine on Canine Ventricular Muscle and Purkinje Fibers. *Circ. Res.*, 24, 639.
- Dejongh, K. S., Warner, C., Colvin, A. A., and Catterall, W. A. (1991) Characterization of the 2 Size Forms of the Alpha-1 Subunit of Skeletal-Muscle L-Type Calcium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 10778-10782.
- Demolombe, S., Lande, G., Charpentier, F., van Roon, M. A., van den Hoff, M. J. B., Toumaniantz, G., Baro, I., Guihard, G., Le Berre, N., Corbier, A., de Bakker, J., Opthof, T., Wilde, A., Moorman, A. F. M., and Escande, D. (2001) Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovasc. Res.*, 50, 314-327.
- Denes, P., Wu, D., Dhingra, R. C., CHUQUIMI.R, and Rosen, K. M. (1973) Demonstration of Dual A-V Nodal Pathways in Patients with Paroxysmal Supraventricular Tachycardia. *Circulation*, 48, 549-555.
- Desai, K. H., Sato, R., Schauble, E., Barsh, G. S., Kobilka, B. K., and Bernstein, D. (1997) Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: New tools to study models of cardiac disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 41, H1053-H1061.
- Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., der Brelie, C., Schneider, T., and Beck, H. (2003) Functional specialization of presynaptic  $Ca_v2.3$   $Ca^{2+}$  channels. *Neuron*, 39, 483-496.
- Difrancesco, D. (1986) Characterization of Single Pacemaker Channels in Cardiac Sinoatrial Node Cells. *Nature*, 324, 470-473.
- Difrancesco, D. (1993) Pacemaker Mechanisms in Cardiac Tissue. *Annu. Rev. Physiol.*, 55, 455-472.

- Difrancesco, D. and Camm, J. A. (2004) Heart rate lowering by specific and selective I-f current inhibition with ivabradine - A new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs*, 64, 1757-1765.
- Draghun, A. and Numberger M. (1996) *Patch-Clamp-Technik*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- Droogmans, G. and Nilius, B. (1989) Kinetic-Properties of the Cardiac T-Type Calcium-Channel in the Guinea-Pig. *J. Physiol.*, 419, 627-650.
- Dudel, J., Menzel, R., Schmidt, R.F. (1996) *Neurowissenschaft- Vom Molekül zur Kognition*. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- El Mas, M. M. and Abdel-Rahman, A. A. (1998) Estrogen enhances baroreflex control of heart rate in conscious ovariectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76, 381-386.
- Emanuel, K., Mackiewicz, U., Pytkowski, B., and Lewartowski, B. (1998) Effects of mibefradil, a blocker of T-type Ca<sup>2+</sup> channels, in single myocytes and intact muscle of guinea-pig heart. *J. Physiol. Pharmacol.*, 49, 577-590.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., and Catterall, W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533-535.
- Ertel, S. I. and Ertel, E. A. (1997) Low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18, 37-42.
- Fareh, S., Villemaire, C., and Nattel, S. (1998) Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation*, 98, 2202-2209.

- Fareh, S., Benardeau, A., Thibault, B., and Nattel, S. (1999) The T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker mibefradil prevents the development of a substrate for atrial fibrillation by tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Circulation*, 100, 2191-2197.
- Feng, J. L., Yue, L. X., Wang, Z. G., and Nattel, S. (1998) Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ. Res.*, 83, 541-551.
- Ferraro, T. N., Golden, G. T., Smith, G. G., St Jean, P., Schork, N. J., Mulholland, N., Ballas, C., Schill, J., Buono, R. J., and Berrettini, W. H. (1999) Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J. Neurosci.*, 19, 6733-6739.
- Ferron, L., Capuano, V., Deroubaix, E., Coulombe, A., and Renaud, J. F. (2002) Functional and molecular characterization of a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel during fetal and postnatal rat heart development. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 34, 533-546.
- Flagg, T. P. and Nichols, C. G. (2001) Sarcolemmal K-ATP channels in the heart: Molecular mechanisms brought to light, but physiologic consequences still in the dark. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 12, 1195-1198.
- Fletcher, C. F., Lutz, C. M., OSullivan, T. N., Shaughnessy, J. D., Hawkes, R., Frankel, W. N., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell*, 87, 607-617.
- Fletcher, C. F. and Frankel, W. N. (1999) Ataxic mouse mutants and molecular mechanisms of absence epilepsy. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1907-1912.
- Flockerzi, V., Oeken, H. J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A., and Trautwein, W. (1986a) Purified Dihydropyridine-Binding Site from Skeletal-Muscle T-Tubules Is A Functional Calcium-Channel. *Nature*, 323, 66-68.

- Flockerzi, V., Oeken, H. J., and Hofmann, F. (1986b) Purification of A Functional Receptor for Calcium-Channel Blockers from Rabbit Skeletal-Muscle Microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 161, 217-224.
- Florio, V., Striessnig, J., and Catterall, W. A. (1992) Purification and Reconstitution of Skeletal-Muscle Calcium Channels. *Methods Enzymol.*, 207, 529-546.
- Foerster, K., Groner, F., Matthes, J., Koch, W. J., Birnbaumer, L., and Herzig, S. (2003) Cardioprotection specific for the G protein G(i2) in chronic adrenergic signaling through beta(2)-adrenoceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 14475-14480.
- Fregly, M. J. and Thrasher, T. N. (1977) Response of Heart-Rate to Acute Administration of Isoproterenol in Rats Treated Chronically with Norethynodrel, Ethinyl Estradiol, and Both Combined. *Endocrinology*, 100, 148-154.
- Gardner, D. J., Davis, J. A., Weina, P. J., and Theune, B. (1995) Comparison of Tribromoethanol, Ketamine Acetylpromazine, Telazol(Tm) Xylazine, Pentobarbital, and Methoxyflurane Anesthesia in Hsd-Icr Mice. *Lab. Anim. Sci.*, 45, 199-204.
- Gassen, H.G. and Schrimpf, G. (1999) *Gentechnische Methoden- eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Geddes, L. A., Partridge, M., and Hoff, H. E. (1960) An EKG Lead for Exercising Subjects. *J. Appl. Physiol.*, 15, 311-312.
- Gehrmann, J., Hammer, P. E., Maguire, C. T., Wakimoto, H., Tiedman, J. K., and Berul, C. I. (2000) Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* , 279, H733-H740.
- Gordon, A. L., Inchiosa, M. A., and Lehr, D. (1972) Isoproterenol-Induced Cardiomegaly - Assessment of Myocardial Protein Content, Actomyosin Atpase and Heart-Rate. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 4, 543-557.

- Grabsch, H., Pereverzev, A., Weiergraber, M., Schramm, M., Henry, M., Vajna, R., Beattie, R. E., Volsen, S. G., Klockner, U., Hescheler, J., and Schneider, T. (1999) Immunohistochemical detection of alpha 1E voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in cerebellum, INS-1 cells, and neuroendocrine cells of the digestive system. *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 981-993.
- Guida, S., Trettel, F., Pagnutti, S., Mantuano, E., Tottene, A., Veneziano, L., Fellin, T., Spadaro, M., Stauderman, K. A., Williams, M. E., Volsen, S., Ophoff, R. A., Frants, R. R., Jodice, C., Frontali, M., and Pietrobon, D. (2001) Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. *Am. J. Hum. Genet.*, 68, 759-764.
- Guler, N. F. and Ubeyli, E. D. (2002) Theory and applications of biotelemetry. *J. Med. Syst.*, 26, 159-178.
- Guo, J. Q., Mitsuiye, T., and Noma, A. (1997) The sustained inward current in sinoatrial node cells of guinea-pig heart. *Pflugers Arch.*, 433, 390-396.
- Hagendorff, A., Kirchhoff, S., Kruger, O., Eckhardt, D., Plum, A., Schumacher, B., and Wolpert, C. (2001) Electrophysiological characterization of connexin 40 deficient hearts - In vivo studies in connexin-deficient mice generated by gene targeting. *Z. Kardiol.*, 90, 898.
- Hagiwara, N., Irisawa, H., and Kameyama, M. (1988) Contribution of 2 Types of Calcium Currents to the Pacemaker Potentials of Rabbit Sino-Atrial Node Cells. *J. Physiol.*, 395, 233-253.
- Hahn, H. S., Marreez, Y., Odley, A., Sterbling, A., Yussman, M. G., Hilty, K. C., Bodi, I., Liggett, S. B., Schwartz, A., and Dorn, G. W. (2003) Protein kinase C alpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ. Res.*, 93, 1111-1119.

- Haissaguerre, M., Jais, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le Mouroux, A., Le Metayer, P., and Clementy, J. (1998) Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N. Engl. J. Med.* , 339, 659-666.
- Hammond, H. K., Roth, D. A., Mckirnan, M. D., and Ping, P. P. (1993) Regional Myocardial Down-Regulation of the Inhibitory Guanosine Triphosphate-Binding Protein (Gi-Alpha(2)) and Beta-Adrenergic Receptors in A Porcine Model of Chronic Episodic Myocardial-Ischemia. *J. Clin. Invest.*, 92, 2644-2652.
- Han, W., Chartier, D., Li, D. S., and Nattel, S. (2001) Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation*, 104, 2095-2100.
- Harada, A., Sasaki, K., Fukushima, T., Ikeshita, M., Asano, T., Yamauchi, S., Tanaka, S., and Shoji, T. (1996) Atrial activation during chronic atrial fibrillation in patients with isolated mitral valve disease. *Ann. Thorac. Surg.*, 61, 104-111.
- Harper, R. M., Leake, B., Hodgman, J. E., and Hoppenbrouwers, T. (1982) Developmental Patterns of Heart-Rate and Heart-Rate-Variability During Sleep and Waking in Normal Infants and Infants at Risk for the Sudden Infant Death Syndrome. *Sleep*, 5, 28-38.
- Hedrich, H. (2004) *The Laboratory Mouse - The Handbook of Experimental Animals*. 1<sup>st</sup> edition, Elsevier.
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Elliott, E. M., and Catterall, W. A. (1994) Differential Phosphorylation, Localization, and Function of Distinct Alpha(1), Subunits of Neuronal Calcium Channels - 2 Size Forms for Class-B, Class-C, and Class-D Alpha(1) Subunits with Different CooH-Termini. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 747, 282-293.
- Heubach, J. F., Kohler, A., Wettwer, E., and Ravens, U. (2000) T-type and tetrodotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup> currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil. *Circ. Res.*, 86, 628-635.

- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2<sup>nd</sup> edition, Sinauer Associates Inc..
- Hirano, Y., Fozzard, H. A., and January, C. T. (1989) Characteristics of L-Type and T-Type Ca<sup>2+</sup> Currents in Canine Cardiac Purkinje-Cells. *Am. J. Physiol.*, 256, H1478-H1492.
- Hoffman, B. F., Decarvalho, A. P., Mello, W. C., and Cranefield, P. F. (1959) Electrical Activity of Single Fibers of the Atrioventricular Node. *Circ. Res.*, 7, 11-18.
- Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 139, 33-87.
- Hogan, P. M. and Davis, L. D. (1968) Evidence for Specialized Fibers in Canine Right Atrium. *Circ. Res.*, 23, 387-.
- Hoischen, S., Brixius, K., and Schwinger, R. H. G. (1998) T- and L-type Ca<sup>2+</sup>-channel antagonists reduce contractility in guinea pig cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 32, 323-330.
- Huang, B. Y., Qin, D. Y., Deng, L. L., Boutjdir, M., and El Sherif, N. (2000) Reexpression of T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc. Res.*, 46, 442-449.
- Huber, R., Deboer, T., and Tobler, I. (2000) Topography of EEG dynamics after sleep deprivation in mice. *J. Neurophysiol.*, 84, 1888-1893.
- Huikuri, H. V., Pikkujamsa, S. M., Airaksinen, K. E. J., Ikaheimo, M. J., Rantala, A. O., Kauma, H., Lilja, M., and Kesaniemi, Y. A. (1996) Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation*, 94, 122-125.

- Hullin, R., Asmus, F., Ludwig, A., Hersel, J., and Boekstegers, P. (1999) Subunit expression of the cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of the cardiac allograft. *Circulation*, 100, 155-163.
- Huser, J., Blatter, L. A., and Lipsius, S. L. (2000) Intracellular  $Ca^{2+}$  release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol.*, 524, 415-422.
- Irisawa, H., Brown, H. F., and Giles, W. (1993) Cardiac Pacemaking in the Sinatrial Node. *Physiol. Rev.*, 73, 197-227.
- Isenberg, G. and Klockner, U. (1982) Calcium Tolerant Ventricular Myocytes Prepared by Pre-Incubation in A Kb Medium. *Pflugers Arch.*, 395, 6-18.
- Jeong, S. W. and Wurster, R. D. (1997a) Calcium channel currents in acutely dissociated intracardiac neurons from adult rats. *J. Neurophysiol.*, 77, 1769-1778.
- Jeong, S. W. and Wurster, R. D. (1997b) Muscarinic receptor activation modulates  $Ca^{2+}$  channels in rat intracardiac neurons via a PTX- and voltage-sensitive pathway. *J. Neurophysiol.*, 78, 1476-1490.
- Jeutter, D. C. (1982) Biomedical Telemetry Techniques. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 7, 121-174.
- Jing, X. J., Li, D. O., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P., and Renstrom, E. (2005)  $Ca_v2.3$  calcium channels control second-phase insulin release. *J. Clin. Invest.*, 115, 146-154.
- Jouveneau, A., Eunson, L. H., Spauschus, A., Ramesh, V., Zuberi, S. M., Kullmann, D. M., and Hanna, M. G. (2001) Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet*, 358, 801-807.

- Kamp, M., Krieger, A., Henry, M., Hescheler, J., Weiergräber, M., and Schneider, T. (2005) Presynaptic „Ca<sub>v</sub>2.3-containing“ E-type Ca<sup>2+</sup> channels share dual roles during neurotransmitter release. *Eur. J. Neurosci.*, in press.
- Kaupp, U. B. and Seifert, R. (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 235-257.
- Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, 104, 569-580.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M. J., Kim, S. S., McEnery, M. W., and Shin, H. S. (2001) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*, 31, 35-45.
- Kirchhof, C. J. H. J., Bonke, F. I. M., and Allesie, M. A. (1988) Evidence for the Presence of Electrotonic Depression of Pacemakers in the Rabbit Atrioventricular Node - the Effects of Uncoupling from the Surrounding Myocardium. *Basic Res. Cardiol.*, 83, 190-201.
- Klockner, U., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., Perez-Reyes, E., and Schneider, T. (1999) Comparison of the Ca<sup>2+</sup> currents induced by expression of three cloned alpha 1 subunits, alpha 1G, alpha 1H and alpha 1I, of low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 4171-4178.
- Klugbauer, N., Welling, A., Specht, V., Seisenberger, C., and Hofmann, F. (2002) L-type Ca<sup>2+</sup> channels of the embryonic mouse heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 447, 279-284.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., and Striessnig, J. (2001) alpha 1D (Ca<sub>v</sub>1.3) subunits can form L-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *J. Biol. Chem.*, 276, 22100-22106.
- Kramer, K. and Kinter, L. B. (2003) Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol. Genomics.*, 13, 197-205.

- Kudej, R. K., Iwase, M., Uechi, M., Vatner, D. E., Oka, N., Ishikawa, Y., Shannon, R. P., Bishop, S. P., and Vatner, S. F. (1997) Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29, 2735-2746.
- Kus, T. and Sasyniuk, B. I. (1975) Electrophysiological Actions of Disopyramide Phosphate on Canine Ventricular Muscle and Purkinje-Fibers. *Circ. Res.*, 37, 844-854.
- Larsen, J. K., Mitchell, J. W., and Best, P. M. (2002) Quantitative analysis of the expression and distribution of calcium channel alpha 1 subunit mRNA in the atria and ventricles of the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 34, 519-532.
- Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., and Perez-Reyes, E. (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.*, 19, 1912-1921.
- Lee, S. C., Choi, S., Lee, T., Kim, H. L., Chin, H., and Shin, H. S. (2002) Molecular basis of R-type calcium channels in central amygdala neurons of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 3276-3281.
- Leuranguer, V., Monteil, A., Bourinet, E., Dayanithi, G., and Nargeot, J. (2000) T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 279, H2540-H2548.
- Li, D. S., Melnyk, P., Feng, J. L., Wang, Z. G., Petrecca, K., Shrier, A., and Nattel, S. (2000) Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation*, 101, 2631-2638.
- Li, D. S., Zhang, L. M., Kneller, J., and Nattel, S. (2001) Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ. Res.*, 88, 1168-1175.

- Li, G. R., Feng, J. L., Yue, L. X., Carrier, M., and Nattel, S. (1996) Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 78, 689-696.
- Lievano, A., Santi, C. M., Serrano, C. J., Trevino, C. L., Bellve, A. R., HernandezCruz, A., and Darszon, A. (1996) T-type Ca<sup>2+</sup> channels and alpha(1E) expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.*, 388, 150-154.
- Lipscombe, D. (2002) L-type calcium channels - Highs and new lows. *Circ. Res.*, 90, 933-935.
- Lipsius, S. L., Huser, J., and Blatter, L. A. (2001) Intracellular Ca<sup>2+</sup> release sparks atrial pacemaker activity. *News Physiol. Sci.*, 16, 101-106.
- Litovsky, S. H. and Antzelevitch, C. (1989) Rate Dependence of Action-Potential Duration and Refractoriness in Canine Ventricular Endocardium Differs from That of Epicardium - Role of the Transient Outward Current. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 14, 1053-1056.
- Liu, L. L. and Nattel, S. (1997) Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 42, H805-H816.
- London, B. (2001) Cardiac arrhythmias: From (transgenic) mice to men. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 12, 1089-1091.
- Lopatin, A. N. and Nichols, C. G. (2001) Inward rectifiers in the heart: An update on I-K1. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33, 625-638.
- Lory, P., Monteil, A., and Nargeot, J. (1997) Molecular genetics of cardiovascular calcium channels. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.*, 90, 17-24.
- Lory, P., Monteil, A., Chemin, J., Leuranguer, V., Bourinet, E., and Nargeot, J. (2000) Molecular diversity of voltage-gated calcium channels. *Therapie*, 55, 249-254.

- Louis, R. P., Lee, J., and Stephenson, R. (2004) Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J. Neurosci. Methods*, 133, 71-80.
- Lu, Z. J., Pereverzev, A., Liu, H. L., Weiergraber, M., Henry, M., Krieger, A., Smyth, N., Hescheler, J., and Schneider, T. (2004) Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Ca<sub>v</sub>2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell. Physiol. Biochem.*, 14, 11-22.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X. G., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., and Hofmann, F. (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.*, 22, 216-224.
- Maki, T., Oneil, J. J., Porter, J., Mullon, C. J. P., Solomon, B. A., and Monaco, A. P. (1996) Long-term function of porcine islets in xenogeneic hosts. *Transplant. Proc.*, 28, 807.
- Mandapati, R., Skanes, A., Chen, J., Berenfeld, O., and Jalife, J. (2000) Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*, 101, 194-199.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., and Nargeot, J. (2003) Functional role of L-type Ca<sub>v</sub>1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 5543-5548.
- Mangoni, M.E., Traboulsie, A., Leoni, A.-L., Cosette, B., Marianne, L., Shin, H.-S., Escande, D., Charpentier, F., Nargeot, J. and Lory, P. (2005) The lack of Ca<sub>v</sub>3.1 T-type calcium channels in mouse heart results in bradycardia and slower atrio-ventricular conduction. *Biophys. J.* (Annual Meeting Abstract, Feb. 2005).
- Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H. Y., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., and Demolombe, S. (2005) Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.*, 562, 223-234.

- Marks, M. L., Whisler, S. L., Clericuzio, C., and Keating, M. (1995) A New Form of Long Qt Syndrome-Associated with Syndactyly. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25, 59-64.
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., and Hanck, D. A. (2000) Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295, 302-308.
- Massie, B. M. (1997) Mibefradil: A selective T-type calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.*, 80, I23-I32.
- Matthes, J., Yildirim, L., Wietzorrek, G., Reimer, D., Striessnig, J., and Herzig, S. (2004) Disturbed atrio-ventricular conduction and normal contractile function in isolated hearts from Ca(v)1.3-knockout mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 369, 554-562.
- Medkour, D., Becker, A. E., Khalife, K., and Billette, J. (1998) Anatomic and functional characteristics of a slow posterior AV nodal pathway - Role in dual-pathway physiology and reentry. *Circulation*, 98, 164-174.
- Mendez, C. and Moe, G. K. (1966a) Demonstration of A Dual A-V Nodal Conduction System in Isolated Rabbit Heart. *Circ. Res.*, 19, 378-&.
- Mendez, C. and Moe, G. K. (1966b) Some Characteristics of Transmembrane Potentials of Av Nodal Cells During Propagation of Premature Beats. *Circ. Res.*, 19, 993-&.
- Merideth, J., Mendez, C., Mueller, W. J., and Moe, G. K. (1968) Electrical Excitability of Atrioventricular Nodal Cells. *Circ. Res.*, 23, 69-&.
- Meza, U., Bannister, R., Melliti, K., and Adams, B. (1999) Biphasic, opposing modulation of cloned neuronal alpha 1E Ca channels by distinct signaling pathways coupled to M2 muscarinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.*, 19, 6806-6817.

- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K., Berens, K., and Ballantyne, C. M. (1995) Myocardial ischemia and reperfusion: A murine model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 38, H2147-H2154.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989) Primary Structure and Functional Expression of the Cardiac Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel. *Nature*, 340, 230-233.
- Mitchell, A. E., Morin, D., Lakritz, J., and Jones, A. D. (1997) Quantitative profiling of tissue- and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse. *Biochem. J.*, 325, 207-216.
- Mitchell, G. F., Jeron, A., and Koren, G. (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 43, H747-H751.
- Mitchell, J. W., Larsen, J. K., and Best, P. M. (2002) Identification of the calcium channel alpha 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) isoform expressed in atrial myocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1577, 17-26.
- Mitra, R. and Morad, M. (1986) 2 Types of Calcium Channels in Guinea-Pig Ventricular Myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 5340-5344.
- Mohamed, M. K., El Mas, M. M., and Abdel-Rahman, A. A. (1999) Estrogen enhancement of baroreflex sensitivity is centrally mediated. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 276, R1030-R1037.
- Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., and Nargeot, J. (2000) Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 275, 6090-6100.

- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X. G., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1646-1652.
- Mori, Y., Nishida, M., Shimizu, S., Ishii, M., Yoshinaga, T., Ino, M., Sawada, K., and Niidome, T. (2002) Ca<sup>2+</sup> channel alpha(1B) subunit (Ca<sub>v</sub>2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system. *Trends Cardiovasc. Med.*, 12, 270-275.
- Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L., and Guiraudon, C. M. (1995) Chronic Rapid Atrial-Pacing - Structural, Functional, and Electrophysiological Characteristics of A New Model of Sustained Atrial-Fibrillation. *Circulation*, 91, 1588-1595.
- Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M. E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A., and Difrancesco, D. (2001) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I<sub>f</sub>. *J. Biol. Chem.*, 276, 29233-29241.
- Mumford, H. and Wetherell, J. R. (2001) A simple method for measuring EEG in freely moving guinea pigs. *J. Neurosci. Methods*, 107, 125-130.
- Munk, A. A., Adjemian, R. A., Zhao, J., Ogbaghebriel, A., and Shrier, A. (1996) Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J. Physiol.*, 493, 801-818.
- Murai, Y., Ishibashi, H., Akaike, N., and Ito, Y. (1998). Acetylcholine modulation of high-voltage-activated calcium channels in the neurones acutely dissociated from rat paratracheal ganglia. *Br. J. Pharmacol.*, 123, 1441-1449.
- Nakano, H., Saito, K., and Suzuki, K. (1994) Chronic Implantation Technique for Monopolar EEG Monitoring of Epileptic Seizures in Mice. *Brain Res. Bull.*, 35, 261-268.

- Nerbonne, J. M., Nichols, C. G., Schwarz, T. L., and Escande, D. (2001) Genetic manipulation of cardiac K<sup>\*</sup> channel function in mice - What have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.*, 89, 944-956.
- Nerbonne, J. M. (2004) Studying cardiac arrhythmias in the mouse - A reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc. Med.*, 14, 83-93.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X. H., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J. A., Dooley, D. J., Nadasdi, L., Tsien, R. W., Lemos, J., and Miljanich, G. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroecrates gigas*. *Biochemistry*, 37, 15353-15362.
- Nilius, B. and Roder, A. (1985) Direct Evidence of A Ca-Sensitive Inactivation of Slow Inward Channels in Frog Atrial Myocardium. *Biomed. Biochim. Acta.*, 44, 1151-1161.
- Ninomiya, I. (1966) Direct Evidence of Nonuniform Distribution of Vagal Effects on Dog Atria. *Circ. Res.*, 19, 576-&.
- Niwa, N., Yasui, K., Opthof, T., Takemura, H., Shimizu, A., Horiba, M., Lee, J. K., Honjo, H., Kamiya, K., and Kodama, I. (2004) Ca<sub>v</sub>3.2 subunit underlies the functional T-type Ca<sup>2+</sup> channel in murine hearts during the embryonic period. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 286, H2257-H2263.
- Officer, T. M., Pellegrino, R., Brusasco, V., and Rodarte, J. R. (1998) Measurement of pulmonary resistance and dynamic compliance with airway obstruction. *J. Appl. Physiol.* , 85, 1982-1988.
- Osaka, T. and Joyner, R. W. (1991) Developmental-Changes in Calcium Currents of Rabbit Ventricular Cells. *Circ. Res.*, 68, 788-796.
- Ouadid, H., Seguin, J., Richard, S., Chaptal, P. A., and Nargeot, J. (1991) Properties and Modulation of Ca Channels in Adult Human Atrial Cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 23, 41-54.

- Pereverzev, A., Klockner, U., Henry, M., Grabsch, H., Vajna, R., Olyschlager, S., Viatchenko-Karpinski, S., Schroder, R., Hescheler, J., and Schneider, T. (1998) Structural diversity of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha(1\text{E})$ -subunit. *European J. Neurosci.*, 10, 916-925.
- Pereverzev, A., Mikhna, M., Vajna, R., Gissel, C., Henry, M., Weiergraber, M., Hescheler, J., Smyth, N., and Schneider, T. (2002) Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha 1\text{E}$ ) subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Mol. Endocrinol.*, 16, 884-895.
- Pereverzev, A., Salehi, A., Mikhna, M., Renstrom, E., Hescheler, J., Weiergraber, M., Smyth, N., and Schneider, T. (2005) The ablation of the  $\text{Ca}_v2.3/\text{E}$ -type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel causes a mild phenotype despite an altered glucose induced glucagon response in isolated islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol*, 511, 65-72.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Lee, J. H. (1998a) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*, 391, 896-900.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L., Daud, A., and Lee, J. H. (1998b) Molecular characterization of T-type calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 358, R583.
- Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* , 83, 117-161.
- Piccini, N., Knopf, J. L., and Gross, K. W. (1982) A Dna Polymorphism, Consistent with Gene Duplication, Correlates with High Renin Levels in the Mouse Sub-Maxillary Gland. *Cell*, 30, 205-213.

- Piedras-Renteria, E. S., Chen, C. C., and Best, P. M. (1997) Antisense oligonucleotides against rat brain alpha(1E) DNA and its atrial homologue decrease T-type calcium current in atrial myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 14936-14941.
- Pietrobon, D. (2002) Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol. Neurobiol.*, 25, 31-50.
- Pinto, J. M. B., Sosunov, E. A., Gainullin, R. Z., Rosen, M. R., and Boyden, P. A. (1999) Effects of mibefradil, a T-type calcium current antagonist, on electrophysiology of Purkinje fibers that survived in the infarcted canine heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 10, 1224-1235.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, 102, 89-97.
- Protas, L., Barbuti, A., Qu, J. H., Rybin, V. O., Palmiter, R. D., Steinberg, S. F., and Robinson, R. B. (2003) Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac I-Ca<sub>v</sub>L. *Circ. Res.*, 93, 972-979.
- Qu, Y. X. and Boutjdir, M. (2001) Gene expression of SERCA2a and L- and T-type Ca channels during human heart development. *Pediatr. Res.*, 50, 569-574.
- Rathore, N., John, S., Kale, M., and Bhatnagar, D. (1998) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol. Res.*, 38, 297-303.
- Reuter, H., Henderson, S. A., Han, T. Y., Matsuda, T., Baba, A., Ross, R. S., Goldhaber, J. I., and Philipson, K. D. (2002) Knockout mice for pharmacological screening testing the specificity of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors. *Circ. Res.*, 91, 90-92.

- Richard, S., Tiaho, F., Charnet, P., Nargeot, J., and Nerbonne, J. M. (1990) 2 Pathways for  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Gating Differentially Modulated by Physiological Stimuli. *Am. J. Physiol.*, 258, H1872-H1881.
- Roithinger, F. X., Steiner, P. R., Goseki, Y., Sparks, P. B., and Lesh, M. D. (1999) Electrophysiologic effects of selective right versus left atrial linear lesions in a canine model of chronic atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 10, 1564-1574.
- Romeis (1989), *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg.
- Rosenbaum, T. and Gordon, S. E. (2004) Quickening the pace: Looking into the heart of HCN channels. *Neuron*, 42, 193-196.
- Rubenstein, .JJ, Schulman, C. L., Yurchak, P. M., and DESANCTI.RW (1972) Clinical Spectrum of Sick Sinus Syndrome. *Circulation*, 46, 5.
- Sakata, Y., Kamei, C. N., Nakagami, H., Bronson, R., Liao, J. K., and Chin, M. T. (2002) Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 16197-16202.
- Sakmann, B. and Neher, E. (1995) *Single Channel Recording*. 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Press, New York and London.
- Sanford, L. D., Yang, L. H., and Tang, X. D. (2003) Influence of contextual fear on sleep in mice: A strain comparison. *Sleep*, 26, 527-540.
- Schneider, T. and Hofmann, F. (1988) The Bovine Cardiac Receptor for Calcium-Channel Blockers Is A 195-Kda Protein. *Eur. J. Biochem.*, 174, 369-375.
- Schneider, T., Wei, X. Y., Olcese, R., Costantin, J. L., Neely, A., Palade, P., Perezreyes, E., Qin, N., Zhou, J. M., Crawford, G. D., Smith, R. G., Appel, S. H., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1994) Molecular Analysis and Functional Expression of the Human Type-e Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Alpha(1) Subunit. *Receptors Channels*, 2, 255-270.

- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., and Nattel, S. (2002) Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ. Res.* , 90, 939-950.
- Scoote, M. and Williams, A. J. (2004). Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322, 1286-1309.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzner, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha(1C) (Ca<sub>v</sub>1.2) calcium channel gene in the mouse. *J. Biol. Chem.*, 275, 39193-39199.
- Shusterman, V., Usiene, I., Harrigal, C., Lee, J. S., Kubota, T., Feldman, A. M., and London, B. (2002) Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282, H2076-H2083.
- Sicouri, S. and Antzelevitch, C. (1993) Drug-Induced Afterdepolarizations and Triggered Activity Occur in A Discrete Subpopulation of Ventricular Muscle-Cells (M-Cells) in the Canine Heart - Quinidine and Digitalis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 4, 48-58.
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (1998) Mice lacking connexin 40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol.*, 8, 295-298.
- Sipido, K. R. (1998) Efficiency of L-type Ca<sup>2+</sup> current compared to reverse mode Na/Ca exchange or T-type Ca<sup>2+</sup> current as trigger for Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 853, 357-360.
- Slawson, S. E., Roman, B. B., Williams, D. S., and Koretsky, A. P. (1998) Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magn. Reson. Med.*, 39, 980-987.

- Sochivko, D., Pereverzev, A., Smyth, N., Gissel, C., Schneider, T., and Beck, H. (2002) The  $Ca_v2.3$   $Ca^{2+}$  channel subunit contributes to R-type  $Ca^{2+}$  currents in murine hippocampal and neocortical neurones. *J. Physiol.*, 542, 699-710.
- Spach, M. S., Dolber, P. C., and Anderson, P. A. W. (1989) Multiple Regional Differences in Cellular Properties That Regulate Repolarization and Contraction in the Right Atrium of Adult and Newborn Dogs. *Circ. Res.*, 65, 1594-1611.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2004)  $Ca_v1.2$  calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119, 19-31.
- Steiner, H. J., Weiler, R., Ludescher, C., Schmid, K. W., and Winkler, H. (1990) Chromogranin-A and Chromogranin-B Are Co-Localized with Atrial Natriuretic Peptides in Secretory Granules of Rat-Heart. *J. Histochem. Cytochem.*, 38, 845-850.
- Stephens, G. J., Page, K. M., Burley, J. R., Berrow, N. S., and Dolphin, A. C. (1997) Functional expression at rat brain cloned alpha 1E calcium channels in COS-7 cells. *Pflugers Arch.*, 433, 523-532.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 15235-15240.
- Stieber, J., Hofmann, F., and Ludwig, A. (2004) Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 14, 23-28.
- Striessnig, J. (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Cell. Physiol. Biochem.*, 9, 242-269.

- Stryer, L. (1990), *Biochemie*. 3. Auflage, Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft.
- Sugihara, G., Allan, W., Sobel, D., and Allan, K. D. (1996) Nonlinear control of heart rate variability in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 2608-2613.
- Tang, X. D. and Sanford, L. D. (2002) Telemetric recording of sleep and home cage activity in mice. *Sleep*, 25, 691-699.
- Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchihara, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa, H., and Tanabe, T. (2000) Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *J. Biol. Chem.*, 275, 10893-10898.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354.
- Towbin, H. and Gordon, J. (1984) Immunoblotting and Dot Immunobinding - Current Status and Outlook. *J. Immunol. Methods*, 72, 313-340.
- Triggle, D. J. (1997) Cardiovascular T-type calcium channels: physiological and pharmacological significance. *J. Hypertens.*, 15, S9-S15.
- Tse, W. W. (1973) Evidence of Presence of Automatic Fibers in Canine Atrioventricular Node. *Am. J. Physiol*, 225, 716-723.
- Tseng, G. N. and Boyden, P. A. (1989) Multiple Types of Ca<sup>2+</sup> Currents in Single Canine Purkinje-Cells. *Circ. Res.*, 65, 1735-1750.
- Umetani, K., Singer, D. H., McCraty, R., and Atkinson, M. (1998) Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: Relations to age and gender over nine decades. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31, 593-601.

- Ungerer, M., Kessebohm, K., Kronsbein, K., Lohse, M. J., and Richardt, G. (1996) Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ. Res.*, 79, 455-460.
- Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klockner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J., and Schneider, T. (1998) New isoform of the neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1E subunit in islets of Langerhans and kidney - Distribution of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunits in cell lines and tissues. *Eur. J. Biochem.*, 257, 274-285.
- Verheijck, E. E., van Ginneken, A. C. G., Wilders, R., and Bouman, L. N. (1999) Contribution of L-type Ca<sup>2+</sup> current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 276, H1064-H1077.
- Verkerk, A. O., Veldkamp, M. W., Abbate, F., Antoons, G., Bouman, L. N., Ravestloot, J. H., and van Ginneken, A. C. G. (1999) Two types of action potential configuration in single cardiac Purkinje cells of sheep. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 277, H1299-H1310.
- Vogel, V., Sanchez, C., and Jennum, P. (2002) EEG measurements by means of radiotelemetry after intracerebroventricular (ICV) cannulation in rodents. *J. Neurosci. Methods*, 118, 89-96.
- Volsen, S. G., Day, N. C., McCormack, A. L., Smith, W., Craig, P. J., Beattie, R., Ince, P. G., Shaw, P. J., Ellis, S. B., Gillespie, A., Harpold, M. M., and Lodge, D. (1995) The expression of neuronal voltage-dependent calcium channels in human cerebellum. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 34, 271-282.
- Wainger, B. J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R. (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411, 805-810.
- Wang, Z. G., Villemaire, C., Page, P., and Nattel, S. (1990) Mechanism of Flecainides Beneficial Actions in Experimental Atrial-Fibrillation. *Circulation*, 82, 98.

- Wapfl, E., Koschak, A., Poteser, M., Sinnegger, M. J., Walter, D., Eberhart, A., Groschner, K., Glossmann, H., Kraus, R. L., Grabner, M., and Striessnig, J. (2002) Functional consequences of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel  $Ca_v2.1$  missense mutations associated with episodic ataxia type 2 and progressive ataxia. *J. Biol. Chem.*, 277, 6960-6966.
- Watanabe, Y. and Dreifus, L. S. (1968) Sites of Impulse Formation Within Atrioventricular Junction of Rabbit. *Circ. Res.*, 22, 717-&.
- Weiergräber, M., Pereverzev, A., Vajna, R., Henry, M., Schramm, M., Nastainczyk, W., Grabsch, H., and Schneider, T. (2000) Immunodetection of alpha 1E voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 48, 807-819.
- Weiergräber, M., Henry, M., Sudkamp, M., de Vivie, E. R., Hescheler, J., and Schneider, T. (2005a) Ablation of  $Ca_v2.3/E$ -type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system. *Basic Res. Cardiol.*, 100, 1-13.
- Weiergräber, M., Henry, M., Hescheler, J., Smyth, N., and Schneider, T. (2005b) Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 14, 154-164.
- Wickman, K., Nemec, J., Gendler, S. J., and Clapham, D. E. (1998) Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron*, 20, 103-114.
- Williams, M. E., Washburn, M. S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P. F., Prodanovich, P., Harpold, M. M., and Stauderman, K. A. (1999) Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J. Neurochem.*, 72, 791-799.
- Winsor, T., Mills, B., Winbury, M. M., Howe, B. B., and Berger, H. J. (1975) Intramyocardial Diversion of Coronary Blood-Flow - Effects of Isoproterenol-Induced Subendocardial Ischemia. *Microvasc. Res.*, 9, 261-278.

- Wu, J. Y., Wu, J. S., Olgin, J., Miller, J. M., and Zipes, D. P. (2001) Mechanisms underlying the reentrant circuit of atrioventricular nodal reentrant tachycardia in isolated canine atrioventricular nodal preparation using optical mapping. *Circ. Res.*, 88, 1189-1195.
- Xia, M., Salata, J. J., Figueroa, D. J., Lawlor, A. M., Liang, H. A., Liu, Y., and Connolly, T. M. (2004) Functional expression of L- and T-type  $Ca^{2+}$  channels in murine HL-1 cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 36, 111-119.
- Xu, H. D., Guo, W. N., and Nerbonne, J. M. (1999) Four kinetically distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.*, 113, 661-677.
- Xu, X. P. and Best, P. M. (1990) Increase in T-Type Calcium Current in Atrial Myocytes from Adult-Rats with Growth Hormone-Secreting Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 4655-4659.
- Yamashita, T., Nakajima, T., Hazama, H., Hamada, E., Murakawa, Y., Sawada, K., and Omata, M. (1995) Regional Differences in Transient Outward Current-Density and Inhomogeneities of Repolarization in Rabbit Right Atrium. *Circulation*, 92, 3061-3069.
- Yang, S. N. and Berggren, P. O. (2005) Beta-cell  $Ca_v$  channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288, E16-E28.
- Yue, L., Feng, J. L., Gaspo, R., Li, G. R., and Nattel, S. (1996) Ionic remodeling underlying tachycardia induced atrial fibrillation in dogs. *Circulation*, 94, 3467.
- Yunker, A. M. R. and McEnery, M. W. (2003) Low-voltage-activated ("T-type") calcium channels in review. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 35, 533-575.
- Yunker, A. M. R. (2003) Modulation and pharmacology of low voltage-activated ("T-type") calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 35, 577-598.

- Zaritsky, J. J., Redell, J. B., Tempel, B. L., and Schwarz, T. L. (2001) The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I-K1) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J. Physiol.*, 533, 697-710.
- Zhang, J. F., Robinson, R. B., and Siegelbaum, S. A. (1992) Sympathetic Neurons Mediate Developmental-Change in Cardiac Sodium-Channel Gating Through Long-Term Neurotransmitter Action. *Neuron*, 9, 97-103.
- Zhang, Z., Xu, Y. F., Song, H. T., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H. S., and Chiamvimonvat, N. (2002) Functional roles of Ca<sub>v</sub>1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes - Insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ. Res.*, 90, 981-987.
- Zhou, J., Kodirov, S., Murata, M., Buckett, P. D., Nerbonne, J. M., and Koren, G. (2003) Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, I-K<sub>1</sub>, I-slow2, in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284, H491-H500.
- Zhou, Z. F. and Lipsius, S. L. (1994) T-Type Calcium Current in Latent Pacemaker Cells Isolated from Cat Right Atrium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 26, 1211-1219.
- Zhou, Z. F. and January, C. T. (1998) Both T- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells. *Biophys J.*, 74, 1830-1839.

## 7. Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in den Jahren 2003 bis 2005 am Institut für Neurophysiologie der Universität zu im Rahmen des vom ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) initiierten „MD/PhD“-Programms.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. T. Schneider für die Bereitstellung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für zahlreiche fruchtbare und ermutigende Diskussionen.

Besonderer Dank gilt weiterhin meinen Tutoren im „MD-PhD“-Programm, Prof. Dr. M. Paulsson (Medizinische Fakultät) sowie Prof. Dr. J. Howard (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät) für ihre Anteilnahme an der Entstehung und Durchführung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, v.a. Frau Dipl.-Biol. Margit Henry für die Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen sowie Frau Renate Clemens und Frau Petra Müller für ihre Unterstützung sowie das sehr produktive und freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Jürgen Hescheler möchte für die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln danken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. E. Perez-Reyes am *Department of Pharmacology* der *University of Virginia (UVA)* sowie Prof. Dr. E. Bertram am *Department of Neurology* der *University of Virginia (UVA)*.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern Barbara und Gottfried Weiergräber, meinen Großeltern, meinem Bruder Oliver Weiergräber sowie Athena.

## 8. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Köln; den 12.4.2005

### Teilveröffentlichungen (vollständige Publikationsliste s.u.):

**Marco Weiergräber**, Margit Henry, Michael Südkamp, Ernst-Rainer de Vivie, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2005): **ABLATION OF THE CA<sub>v</sub>2.3 VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL RESULTS IN CARDIAC ARRHYTHMIA AND ALTERED AUTONOMIC CONTROL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM.** *Basic Research in Cardiology*, 100(1):1-13.

**Marco Weiergräber**, Margit Henry, Jürgen Hescheler, Neil Smyth and Toni Schneider (2005): **ELECTROCORTICOGRAPHIC AND DEEP INTRACEREBRAL EEG RECORDING IN MICE USING A TELEMETRY SYSTEM.** *Brain Research Protocols*, 14(3):154-64.

Z-L Lu, Alexey Pereverzev, H-L Liu, **Marco Weiergräber**, Margit Henry, Andreas Krieger, Neil Smyth, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2004): **ARRHYTHMIA IN ISOLATED PRENATAL HERATS AFTER ABLATION OF THE CA<sub>v</sub>2.3 ( $\alpha$ 1E) SUBUNIT OF VOLTAGE GATED CALCIUM CHANNEL;** *Cellular Physiology and Biochemistry*, 14(1-2): 11-22.

## 9. Publikationen

### Dr. med. Marco Weiergräber

1. Matthias Lüke, Margit Henry, Thea Lingohr, Mehran Maghsoodian, Jürgen Hescheler, **Marco Weiergräber**, Werner Sickel, Toni Schneider (2005): **A  $\text{Ni}^{2+}$ -SENSITIVE COMPONENT OF THE ERG-B-WAVE FROM THE ISOLATED BOVINE RETINA IS RELATED TO E-TYPE VOLTAGE-GATED  $\text{Ca}^{2+}$  CHANNELS.** *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 243(9):933-41. .
2. Kamp M.A., Krieger A., Henry M., Hescheler J., **Weiergräber M.**, Schneider T. (2005): **PRESYNAPTIC  $\text{Ca}_v2.3$  CONTAINING E-TYPE  $\text{Ca}^{2+}$  CHANNELS SHARE DUAL ROLES DURING NEUROTRANSMITTER RELEASE AND LONG TERM POTENTIATION.** *European Journal of Neuroscience*, 21(6): 1617-25.
3. **Marco Weiergräber**, Margit Henry, Jürgen Hescheler, Neil Smyth and Toni Schneider (2005): **ELECTROCORTICOGRAPHIC AND DEEP INTRACEREBRAL EEG RECORDING IN MICE USING A TELEMETRY SYSTEM.** *Brain Research Protocols*, 14(3):154-64.
4. Alexey Pereverzev, Albert Salehi, Marina Mikhna, Erik Renstrom, Jürgen Hescheler, **Marco Weiergräber**, Neil Smyth, Toni Schneider (2005): **THE ABLATION OF THE  $\text{Ca}_v2.3$ /E-TYPE VOLTAGE-GATED  $\text{Ca}^{2+}$  CHANNEL CAUSES A MILD PHENOTYPE DESPITE AN ALTERED GLUCOSE INDUCED GLUCAGON RESPONSE IN ISOLATED ISLETS OF LANGERHANS.** *European Journal of Pharmacology*, 511(1):65-72.
5. **Marco Weiergräber**, Margit Henry, Michael Südkamp, Ernst-Rainer de Vivie, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2005): **ABLATION OF THE  $\text{Ca}_v2.3$  VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL RESULTS IN CARDIAC ARRHYTHMIA AND ALTERED AUTONOMIC CONTROL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM.** *Basic Research in Cardiology*, 100(1):1-13.
6. Z-L Lu, Alexey Pereverzev, H-L Liu, **Marco Weiergräber**, Margit Henry, Andreas Krieger, Neil Smyth, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2004): **ARRHYTHMIA IN ISOLATED PRENATAL HERATS AFTER ABLATION OF THE  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha 1\text{E}$ ) SUBUNIT OF VOLTAGE GATED CALCIUM CHANNEL;** *Cellular Physiology and Biochemistry*, 14(1-2): 11-22.

7. Alexey Pereverzev, Marina Mikhna, Rolf Vajna, Cornelia Gissel, Margit Henry, **Marco Weiergräber**, Jürgen Hescheler, Neil Smyth, Toni Schneider (2002): **DISTURBANCE IN GLUCOSE-TOLERANCE, INSULIN-RELEASE AND STRESS-INDUCED HYPERGLYCEMIA UPON DISRUPTION OF THE Ca<sub>v</sub>2.3 (α1E) SUBUNIT OF VOLTAGE-GATED CA<sup>2+</sup> CHANNELS**; *Molecular Endocrinology*, 16(4): 884-895.
8. Juan Carlos Gomora, Asif N. Daud, **Marco Weiergräber**, Edward Perez-Reyes (2001): **BLOCK OF CLONED HUMAN T-TYPE CALCIUM CHANNELS BY SUCCINIMIDE ANTIEPILEPTIC DRUGS**; *Molecular Pharmacology*, 60: 1121-1132.
9. Rolf Vajna, Udo Klöckner, Alexey Pereverzev, **Marco Weiergräber**, Xia-hua Chen, George Miljanich, Toni Schneider (2001): **FUNCTIONAL COUPLING BETWEEN R-TYPE CA<sup>2+</sup> CHANNELS AND INSULIN SECRETION IN THE INSULINOMA CELL LINE INS-1**. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1066-1075.
10. **Marco Weiergräber**, Margit Henry, Alexey Pereverzev, Heike Grabsch, Wolfgang Nastainczyk, Edward Perez-Reyes, Toni Schneider (2000): **IMMUNODETECTION OF α1E AND α1G VOLTAGE GATED CA<sup>2+</sup> CHANNELS IN CHROMOGRANIN-POSITIVE MUSCLE CELLS OF THE RAT HEART AND IN THE DISTAL TUBULES OF HUMAN KIDNEY**. *J.Histochem.Cytochem.*,48(6):807-819.
11. Heike Grabsch, Alexey Pereverzev, **Marco Weiergräber**, Martin Schramm, Margit Henry, Rolf Vajna, Ruth Beattie, S.G. Volsen, Udo Klöckner, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (1999): **IMMUNODETECTION OF E- AND G-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS IN PART OF THE NEUROENDOCRINE SYSTEM**. *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 981-993.

## Kongress-Vorträge

### National

**Marco Weiergräber**, H. Grabsch, A. Pereverzev, M. Schramm, E. Perez-Reyes, J. Hescheler, T. Schneider (1999): **IMMUNHISTOCHEMICAL DETECTION OF VOLTAGE-GATED  $Ca^{2+}$ -CHANNEL SUBUNITS ( $\alpha 1E$ ,  $\alpha 1G$ ). WHICH T-TYPE OF  $Ca^{2+}$  CHANNEL IS EXPRESSED IN HEART?** 40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 9.3.-11.3.99; **Präsentation: M. Weiergräber**. Abstract in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359 Suppl. R7.

**Marco Weiergräber**, M. Henry, J. Hescheler, T. Schneider (2004): **REGULATION DES HERZSCHLAGES BEI MÄUSEN, IN DENEN DER  $Ca_v2.3$  / E-TYP  $Ca^{2+}$ -KANAL INAKTIVIERT WURDE.** 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 9.3.-11.3.2004; **Präsentation:** krankheitsbedingte Vertretung durch T. Schneider. Abstract in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*

**Marco Weiergräber**, M. Henry, J. Hescheler, T. Schneider (2005): **STÖRUNGEN DER AUTONOMEN KONTROLLE IM KARDIOVASKULÄREN SYSTEM VON  $Ca_v2.3$  DEFIZIENTEN MÄUSEN.** 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 15.3.-17.3.2005; **Präsentation: M. Weiergräber**. Abstract in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*

### International

Marco Weiergräber, Margit Henry, Renate Clemens, Petra Müller, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2005): **CARDIAC ARRHYTHMIA AND ALTERED AUTONOMIC CONTROL IN MICE LACKING THE  $Ca_v2.3$  / E-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL.** 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 12.2 – 16.2.2003 (Long Beach, California) **Präsentation: Marco Weiergräber.**

## Posterpräsentationen

Toni Schneider, Alexey Pereverzev, Heike Grabsch, **Marco Weiergräber**, Martin Schramm, Udo Klöckner, Jürgen Hescheler (1999): **EXPRESSION OF  $\alpha$ 1E VOLTAGE-GATED  $CA^{2+}$  CHANNEL ISOFORMS IN BRAIN AND NEUROENDOCRINE CELLS OF THE DIGESTIVE SYSTEM.** 43rd Annual Meeting of the Biophysical Society, 13.2.-17.2.99 (Baltimore). Biophys. J. 76, A339.

Rolf Vajna, **Marco Weiergräber**, X.H. Chen, G. Miljanich, Margit Henry, Jürgen Hescheler, Udo Klöckner Alexey Pereverzev, Toni Schneider (1999): **INSULIN SECRETION AND E-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS.** Meeting of the International Society of Neurochemistry, Berlin, 8.8. - 14.8.99. Abstract in: J. Neurochemistry 73, S130C.

**Marco Weiergräber**, Alexey Pereverzev, Marina Mikhna, Jürgen Hescheler, Edward Perez-Reyes, Toni Schneider (2000): **IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF E- AND T-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL IN THE NEUROENDOCRINE SYSTEM.** 44th Annual Meeting of the Biophysical Society, 12.2.- 16.2.2000 (New Orleans, Louisiana). Biophys. J. 78, A460. **Presentation: M. Weiergräber.**

**Marco Weiergräber**, Heike Grabsch, Alexey Pereverzev, Toni Schneider (2000): **CHARACTERIZATION AND DETECTION OF E- AND T-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS IN THE ENDOCRINE SYSTEM.** 4th Maastricht Medical Students Research Conference (MMSRC), 15.3.2000, **Presentation: M. Weiergräber.**

Toni Schneider, Rolf Vajna, Alexey Pereverzev, **Marco Weiergräber**, Jürgen Hescheler, Udo Klöckner: **EINE VIELZAHL SPANNUNGSABHÄNGIGER CALCIUMKANÄLE STEUERT DIE  $CA^{2+}$ -ABHÄNGIGE INSULINFREISETZUNG IN INS-1 ZELLEN (RATTE). FUNKTION EINES  $\alpha$ 1E/R-TYP  $CA^{2+}$ -KANALS.** "41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz." Abstract in: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. Vol. 359, Number 3, 1999.*

Alexey Pereverzev, Rolf Vajna, **Marco Weiergräber**, Jürgen Hescheler, Toni Schneider: **REDUCTION OF INSULIN SECRETION IN ALPHA1E-DEPLETED INS-1 CELLS.** FENS 2000, 8. - 13.7.2000, Brighton.

J.C. Gomora, **M. Weiergräber**, y E. Perez-Reyes (Departamento de Farmacología, Universidad de Virginia, Charlottesville, VA 22908: **ANTIEPILEPTICOS DERIVADOS DE SUCCINIMIDA INDUCEN BLOQUEO DEPENDIENTE DEL ESTADO EN TRES CANALES DE CALCIO TIPO T CLONADOS DE HUMANO**. 40 Aniversario: Centro de investigación y estudios avanzados del IPN, DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS; CINVESTAV, MEXICO (17 y 18 de Octubre de 2001).

**Marco Weiergräber**, M. Henry, Zhong-Ju Lu, Hui-Lin Liu, Alexey Pereverzev, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2004): **DISRUPTION OF THE CA<sub>v</sub>2.3 ( $\alpha$ 1E) SUBUNIT OF THE VOLTAGE-GATED CA<sup>2+</sup>-CHANNELS IN NEONATAL MICE INDUCES CARDIAC ARRHYTHMIA**. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 14.-18. Febr. 2004, Baltimore; Biophys. J , Suppl. Jan. 2004; **Presentation: M. Weiergräber**.

Andreas Krieger, Marcel Kamp, Margit Henry, Alexey Pereverzev, Marco Weiergräber, Jürgen Hescheler, Toni Schneider (2004): **SIGNALLING THROUGH THE E-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL - IDENTIFICATION OF INTERACTION PARTNERS**. Herbsttagung der GBM, Münster: 19.-22.9.04.

## Vorträge (Medizinische Einrichtungen der Universität zu Köln)

**Weiergräber M. & T. Schneider, Köln-Fortune** (*Medical faculty of the University of Cologne*): **Kolloquienreihe Wintersemester 1999/2000: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON E- UND T-TYP KALZIUM-IONENKANÄLEN IN NEUROENDOKRINEN GEWEBEN**; 18.11.99; **Presentation: M. Weiergräber**.

**Marco Weiergräber** 2004 (Vortrag im Rahmen des Veranstaltungskalenders des Zentrums für Molekulare Medizin in Köln (ZMMK): **FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE NEURONAL E-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM**. 26.4.2004; **Presentation: M. Weiergräber**

**Marco Weiergräber** 2004 (Vortrag im Rahmen der Klausurtagung des Zentrums für Molekulare Medizin in Köln (ZMMK): **ABLATION OF THE CA<sub>v</sub>2.3 VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL RESULTS IN CARDIAC ARRHYTHMIA AND ALTERED AUTONOMIC CONTROL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM** 3.-4. Dezember 2004, Wermelskirchen-Dabringhausen.

**Marco Weiergräber 2004** (Vortrag in der Klinik für Kardiologie, Universität zu Köln):  
**FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF THE NEURONAL E/R-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM.** 5.2.2004.

## Institutsvorträge

22.1.2001

**GENERALIZED ABSENCE EPILEPSY: HOW A FUNCTIONAL DISORDER IN THE THALAMOCORTICAL CIRCUITRY CAUSES A NON-CONVULSIVE SEIZURE (I);**  
**Presentation: M. Weiergräber,** Institut für Neurophysiologie, Medizinische Einrichtungen der Universität zu Cologne.

15.2.2001

**BIOPHYSICAL ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN SUCCIMIDE ANTIEPILEPTIC DRUGS AND CLONED HUMAN T-TYPE CALCIUM CHANNELS;**  
**Presentation: M. Weiergräber,** *Department of Pharmacology, University of Virginia (UVA), School of Medicine, Virginia.*

23.4.2001:

Generalized Absence Epilepsy: How a functional disorder in the thalamocortical circuitry causes a Non-Convulsive Seizure (II)-

**BLOCK OF CLONED HUMAN T-TYPE CALCIUM CHANNELS BY SUCCINIMIDE ANTIEPILEPTIC DRUGS;** **Presentation: M. Weiergräber,** Institut für Neurophysiologie, Medizinische Einrichtungen der Universität zu Cologne.

24.5.2004:

**Marco Weiergräber 2004 : FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF THE NEURONAL E/R-TYPE VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL WITHIN THE MURINE CARDIOVASCULAR SYSTEM.** **Presentation: M. Weiergräber,** Institut für Neurophysiologie, Medizinische Einrichtungen der Universität zu Cologne.

## Kongressteilnahmen

78th Annual Meeting of the German Society of Physiology; Bonn (Germany), 14. - 17.März 1999

45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 17.2 - 21.2.2001 (Boston, Massachusetts)

„ZMMK-Klausurtagung“, 23. - 24. November 2001, Wermelskirchen-Dabringhausen (Germany)

46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 23.2 - 27.2.2002 (San Francisco, California)

47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 1.3 – 5.3.2003 (San Antonio, Texas)

48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 14.2 – 18.2.2003 (Baltimore, Maryland)

49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 12.2 – 16.2.2003 (Long Beach, California)

## Lektorat

Lehrbuch „Aktuelle Proktologie - UNI-MED SCIENCE“, UNI-MED-Verlag, 2002.

Lehrbuch „Prävention des Schlaganfalls - UNI-MED SCIENCE“, UNI-MED-Verlag (2005)

## Mitgliedschaft in nationalen und internationalen wissenschaftlichen Vereinigungen

Mitglied der **Biophysical Society**

Mitglied der **Paleopathology Association**

Mitglied der **Neurowissenschaftlichen Gesellschaft**

## 10. Lebenslauf

### Dr. med. Marco Weiergräber

Geb.: 12.02.1974

Geburtsort: Jülich

Geschwister: Dr. med. Oliver Weiergräber

Eltern: Barbara Weiergräber

Gottfried Weiergräber

#### SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

*1980 - 1984*

**Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Süd (GGS),  
Jülich**

*1984 - 1993*

**Besuch des Gymnasiums Zitadelle der Stadt Jülich**

*April 1993*

**Erlangung der allgemeinen Hochschulreife**

*1991 - 1993*

**Forschungsprojekt „Jugend forscht“ mit dem Thema:  
„Studie zum Abbau eines Herbizids (Atrazin) in  
mikrobiell unterschiedlich aktiven Substraten“;  
durchgeführt im Institut für Radioagronomie (IRA) des  
Forschungszentrums Jülich**

#### UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG

---

*Oktober 1993*

**Studium der Biologie an der RWTH Aachen**

*Oktober 1994*

**Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen**

*April 1996*

**Diplom-Vorprüfung für den Studiengang Biologie**

*September 1996*

**Ärztliche Vorprüfung**

*März 1997*

**Famulatur in der Nuklearmedizinischen Klinik der Heinrich Heine Universität Düsseldorf (auf dem Gelände des Forschungszentrums Jülich)**

*August 1997*

**Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

*Oktober 1997 - September 1999*

**Erstellung der medizinischen Doktorarbeit am Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln mit dem Thema:**

***„Bedeutung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle bei der Etablierung manifester Epilepsien – Elektrophysiologische Untersuchungen beteiligter Kanäle und immunhistochemische Analyse ihrer Verbreitung im neuroendokrinen System“***

*September 1998 - September 1999*

**Promotionsstipendium (studentische Forschungsförderung) im Rahmen des Köln- Fortune Programms**

*März 2000*

**Famulatur in der Medizinischen Klinik IV (Hämatologie/Onkologie) des Universitätsklinikums der RWTH Aachen**

*Juli 2000 - Oktober 2000*

**Dreimonatiger Forschungsaufenthalt am *Department of Pharmacology* der *University of Virginia School of Medicine* in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Edward Perez-Reyes (gefördert durch ein Forschungsstipendium der Maria-Pesch- und der Käthe-Hack-Stiftung) zum Thema:**

***„Untersuchungen zur Struktur und Funktion von niederspannungsaktivierten Calciumkanälen“ (Publikation: „Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs“)***

*März 2001*

**Einmonatige Famulatur in radiologischer Facharztpraxis  
(Aachen)**

*September 2001*

**Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

*Oktober 2001*

**Praktisches Jahr in folgenden Einrichtungen:**

**1. Tertial (22.10.01 - 10.02.02)**

**Innere Medizin, Luisenhospital Aachen  
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen  
Fakultät der RWTH Aachen).**

**2. Tertial (11.02.02 - 02.06.02)**

**Chirurgie, Luisenhospital Aachen (Akademisches  
Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der  
RWTH Aachen).**

**3. Tertial (03.06.02 - 22.09.02)**

***Department of Neurology, University of Virginia,  
School of Medicine, Virginia, USA* (Förderung durch  
ein Stipendium der Köln-Fortune-Stiftung).**

*November 2002*

**Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

*Februar 2004*

Verleihung der medizinischen Doktorwürde der Hohen  
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem  
Prädikat „**summa cum laude**“.

## BERUFSTÄTIGKEIT

---

*Seit Januar 2003*

**Teilnehmer am MD/PhD-Programm des Zentrums für  
Molekulare Medizin in Köln (ZMMK) und wissenschaftlicher  
Mitarbeiter im Institut für Neurophysiologie der Universität  
zu Köln**

Köln, den 12.4.2005