

Aus dem Experimental and Clinical Research Center,  
einer gemeinsamen Einrichtung des  
Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin und der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**KCNE2-Deletion führt zu Herzinsuffizienz  
im Mausmodell**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Leonhard Schleußner  
aus Berlin

Datum der Promotion: 05. Juni 2016

*Meinen Eltern und meinem Großvater gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>8</b>
<b>Abstract</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Herzinsuffizienz . . . . .	12
1.1.1 Definition . . . . .	12
1.1.2 Epidemiologie . . . . .	12
1.1.3 Klinisches Bild und Klassifikation . . . . .	13
1.1.4 Therapie . . . . .	14
1.1.5 Pathophysiologie . . . . .	14
1.2 Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie . . . . .	15
1.2.1 Physiologische Hypertrophie . . . . .	16
1.2.2 Pathologische Hypertrophie . . . . .	16
1.2.3 Molekulare Vermittler der pathologischen Hypertrophie . . . . .	17
1.2.4 Elektrophysiologisches Remodeling und kardiale Hypertrophie . . . . .	18
1.3 Kardiale Ionenkanäle . . . . .	18
1.3.1 Das Aktionspotential des Herzens . . . . .	18
1.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung . . . . .	20
1.3.3 Kaliumkanäle . . . . .	20
1.3.4 Die Untereinheit E2 spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (KCNE2) . . . . .	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1 Tiere . . . . .	24
2.1.1 Präparation und Organentnahme . . . . .	24
2.2 Isoliertes Herz im Langendorff-Versuch . . . . .	25
2.2.1 Aufbau der Langendorff-Anlage . . . . .	25
2.2.2 Krebs-Henseleit-Puffer . . . . .	26
2.2.3 Experimenteller Ablauf . . . . .	26
2.3 Isolation von Kardiomyozyten . . . . .	28
2.4 IonOptix®-System . . . . .	30
2.4.1 Aufbau der IonOptix-Anlage . . . . .	30

## Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM . . . . .	31
2.4.3	Vorbereitung der Zellen . . . . .	31
2.4.4	Experimenteller Ablauf . . . . .	32
2.4.5	Datengewinnung . . . . .	33
2.5	Whole-cell Voltage Clamp . . . . .	34
2.5.1	Aufbau des Messstandes . . . . .	34
2.5.2	Experimenteller Ablauf . . . . .	35
2.6	Echokardiographie . . . . .	39
2.7	Molekularbiologie . . . . .	39
2.7.1	Calcineurinaktivität . . . . .	39
2.7.2	Proteinexpression von CamKII $\delta$ . . . . .	40
2.8	Laborparameter im Serum . . . . .	40
2.8.1	Schilddrüsenhormone . . . . .	40
2.8.2	Endokrine Pankreasfunktion . . . . .	40
2.9	Statistische Auswertung . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	KCNE2-Deletion führt zu einer erhöhten Mortalität . . . . .	42
3.2	Deletion von KCNE2 führt zu einer verminderten systolischen Funktion im isolierten Herz . . . . .	42
3.2.1	Systolische Funktion unter Stimulation mit Isoprenalin . . . . .	45
3.3	Kontraktion und Calciumgradienten im IonOptix-System . . . . .	46
3.3.1	Kontraktion isolierter Kardiomyozyten . . . . .	46
3.3.2	Kontraktion unter Stimulation mit Isoprenalin . . . . .	47
3.3.3	Calciumgradienten in isolierten Kardiomyozyten . . . . .	49
3.3.4	Calciumgradienten unter Stimulation mit Isoprenalin . . . . .	50
3.4	Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen . . . . .	51
3.4.1	Calciumströme (LTCC) in Kardiomyozyten junger Tiere . . . . .	51
3.4.2	Calciumströme (LTCC) in Kardiomyozyten alter Tiere . . . . .	53
3.5	Echokardiographie . . . . .	54
3.5.1	Echokardiographie in 9 Monate alten Tieren . . . . .	54
3.5.2	Echokardiographie in 12 Monate alten Tieren . . . . .	55
3.6	Molekularbiologie . . . . .	57
3.6.1	Calcineurinaktivität in jungen <i>kcne2<sup>-/-</sup></i> -Tieren . . . . .	57
3.6.2	CaMKII $\delta$ -Expression in jungen <i>kcne2<sup>-/-</sup></i> -Tieren . . . . .	58
3.7	Laborparameter im Serum . . . . .	58
3.7.1	Hyperinsulinämie in jungen <i>kcne2<sup>-/-</sup></i> -Tieren . . . . .	58
3.7.2	Euthyrose in 12 Monate alten <i>kcne2<sup>-/-</sup></i> -Tieren . . . . .	59



## Inhaltsverzeichnis

<b>4 Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse . . . . .	60
4.2 Diskussion der Methoden . . . . .	61
4.2.1 Das <i>kcne2</i> <sup>-/-</sup> -Mausmodell . . . . .	61
4.2.2 Funktionelle Methoden . . . . .	62
4.3 Diskussion der Ergebnisse . . . . .	63
4.3.1 KCNE2-Deletion führt zu einer Calcium-induzierten Hypertrophie und einer Herzinsuffizienz mit teils letalem Ausgang im Alter . . .	63
4.3.2 Intrakardiale Faktoren, die an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt sein könnten . . . . .	65
4.3.3 Extrakardiale Faktoren . . . . .	69
4.4 Ausblick . . . . .	70
4.4.1 Generierung eines herzspezifischen Knockouts . . . . .	70
4.4.2 Untersuchung weiterer intrazellulärer Signaltransduktionswege . .	72
<b>Bibliographie</b>	<b>72</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>84</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung</b>	<b>87</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Formen der Hypertrophie . . . . .	15
1.2	Aktionspotential einer Ventrikelmyokardzelle . . . . .	19
1.3	Modell eines Kaliumkanals . . . . .	21
2.1	Herz in der Langendorff-Anlage . . . . .	26
2.2	Software ISOHEART . . . . .	27
2.3	Exemplarische Zelle im IonOptix-System . . . . .	32
2.4	Pulsprotokolle . . . . .	38
3.1	Kaplan-Meier Kurve für das Langzeitüberleben . . . . .	42
3.2	Phänotyp eines spontanen Herztodes in alten <i>kcne2<sup>-/-</sup></i> -Tieren . . . . .	43
3.3	Linksventrikulärer Druck und Koronarperfusion in isolierten Herzen . . . . .	44
3.4	Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in isolierten Herzen . . . . .	44
3.5	Isolierte Herzen im Langendorff-Versuch unter $\beta$ -Stimulation . . . . .	45
3.6	Länge und prozentuale Verkürzung isolierter Kardiomyozyten . . . . .	46
3.7	Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten . . . . .	47
3.8	Prozentuale Verkürzung isolierter Kardiomyozyten unter $\beta$ -Stimulation . . . . .	48
3.9	Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten unter $\beta$ -Stimulation . . . . .	48
3.10	Intrazelluläres Calcium in isolierten Kardiomyozyten . . . . .	49
3.11	Time to peak/baseline der Calcium-Transienten . . . . .	50
3.12	Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten basal und unter $\beta$ -Stimulation . . . . .	51
3.13	Strom-Spannungskurve in jungen Tieren . . . . .	52
3.14	Inaktivierungszeiten in Zellen aus jungen Tieren . . . . .	52
3.15	Strom-Spannungskurve in alten Tieren . . . . .	53
3.16	Inaktivierungszeiten in Zellen aus alten Tieren . . . . .	54
3.17	TTE 9 Monate alter Tiere . . . . .	55
3.18	TTE 12 Monate alter Tiere . . . . .	56
3.19	LVEF und FS in 12 Monate alten Tieren . . . . .	56
3.20	Calcineurinaktivität . . . . .	57
3.21	Expression der CaMKII $\delta$ . . . . .	58
3.22	C-Peptid-Konzentration . . . . .	59
3.23	Schilddrüsenhormone . . . . .	59
4.1	Intrazelluläre Signalwege . . . . .	72

# Tabellenverzeichnis

2.1	Parameter in <i>ISOHEART</i> . . . . .	28
2.2	Lösungen für die Isolation von Kardiomyozyten . . . . .	30
2.3	Parameter in der <i>IonWizard</i> -Software . . . . .	33
2.4	Parameter im Programm <i>Clampex</i> . . . . .	37

# Kurzfassung

Die Herzinsuffizienz betrifft vor allem ältere Menschen und geht mit einer schlechten Prognose einher: Die Patienten müssen häufig stationär behandelt werden, nur die Hälfte von ihnen überlebt länger als fünf Jahre nach der Diagnosestellung. Neben der koronaren Herzkrankung und der arteriellen Hypertonie sind auch genetische Mutationen mögliche Ursachen einer Herzinsuffizienz.

KCNE2 ist ein Gen, das für eine Untereinheit von Kaliumkanälen kodiert. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Kaliumkanälen führt die KCNE2-Deletion u. a. zu einer Hyperplasie des Magens, einer Hypothyreose sowie einem Multisystemerkrankungssyndrom mit Artherosklerose, Anämie und plötzlichem Herztod. Ein Zusammenhang zwischen einer KCNE2-Deletion und der Entstehung einer Herzinsuffizienz wurde bisher noch nicht beschrieben, obwohl gerade im Herzen Ionenkanäle eine entscheidende Rolle spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Beweis der Hypothese, dass es durch globalen KCNE2-Knockout über Änderung des elektrischen Phänotyps auch zu der Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommen kann. Außerdem wurden zugrunde liegende Mechanismen dieser Herzinsuffizienz charakterisiert.

Dazu wurden Knockout-Tiere aus einer eigenen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Mauszucht untersucht und mit Wildtypkontrollen verglichen. Mittels Echokardiographie und Langendorff-Technik wurden Kontraktion, Relaxation und Wanddicken *in vivo* und am isolierten Herz untersucht. Mit dem IonOptix-System wurden Änderungen der Calciumtransienten sowie die Zellverkürzung von isolierten Kardiomyozyten während der Kontraktion gemessen. Die Funktion des L-Type Calcium Channel (LTCC) wurde mit der Patch-Clamp Technik analysiert. Auf molekularer Ebene wurde die Aktivität von Calcineurin sowie der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II delta (CaMKII $\delta$ ) bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses extrakardialer Effekte wurden die Schilddrüsenhormone und C-Peptidlevel im Serum gemessen.

Die KCNE2-Deletion führte zu einer fast 50%igen Mortalität nach einem Jahr. In jungen Tieren waren auf molekularer Ebene eine erhöhte Calcineurin- und CaMKII $\delta$ -Aktivität als Vermittler einer kardialen Hypertrophie nachweisbar. Zusätzlich wurde in diesen jungen Tieren ein erhöhter Calciumstrom durch den LTCC und eine Hyperinsulinämie gemessen. Im

## *Kurzfassung*

Alter von zwölf Monaten zeigte sich eine kardiale Dilatation mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion und reduziertem Fractional Shortening der *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tiere. Mittels Echokardiographie konnte der Übergang von einer exzentrischen kardialen Hypertrophie in eine Dilatation des linken Ventrikels im Alter von 9-12 Monaten nachgewiesen werden.

Die KCNE2-Deletion führte über einen komplexen Vorgang zu einer Calcium-induzierten Hypertrophie und zu einer Herzinsuffizienz mit teils letalem Ausgang im Alter. Als potentielle Auslöser der Hypertrophie wurden eine veränderte Funktion des LTCC sowie eine Hyperinsulinämie gefunden. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit eine direkte Verbindung zwischen der Deletion einer Kaliumkanaluntereinheit und der Entstehung einer Herzinsuffizienz gezeigt werden.

# Abstract

Heart failure is a disease that mainly affects elderly people. Patients are often hospitalized and the prognosis is poor: Every other patient dies in five years after being diagnosed with heart failure. Among the causes of heart failure are coronary artery disease, arterial hypertension and genetic disorders.

KCNE2 is a gene coding for an ancillary subunit of voltage gated potassium channels. Potassium channels are ubiquitously expressed in mammals and have different functions throughout the body. Deletion of KCNE2 in the mouse results in gastric hyperplasia, hypothyroidism, atherosclerosis, anemia and predisposition to sudden cardiac death. So far, no direct link between deletion of KCNE2 and heart failure has been shown, despite the important role of potassium channels for action potential generation. The aim of the current study was to prove that global knockout of KCNE2 leads to heart failure via a change of electrophysiological properties. Furthermore, we tried to elucidate the underlying mechanisms of this phenomenon.

*Kcne2*<sup>-/-</sup>-mice were bred and compared with wildtyp littermates. Contraction, relaxation and wall diameters were analyzed using echocardiography and the isolated heart technique. Furthermore, contraction, calcium transients and calcium currents via the L-type calcium channel (LTCC) were recorded in isolated ventricular cardiomyocytes using IonOptix and patch clamp techniques. Activity of calcineurin and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II delta (CaMKII $\delta$ ) were measured in cardiac tissue from young wildtyp and knockout mice. To understand the influence of extracardiac effects, blood samples were scanned for concentrations of thyroid hormones and C-peptide.

Deletion of KCNE2 resulted in a mortality rate of 50 % at one year. In young *kcne2*<sup>-/-</sup>-mice the hypertrophic proteins calcineurin and CamKII $\delta$  were upregulated. Additionally, these animals exhibited higher currents via the LTCC and hyperinsulinemia. At 12 months, *kcne2*<sup>-/-</sup>-mice showed a left ventricular dilation with reduced systolic function. Using echocardiography, we identified a progress from left ventricular hypertrophy to heart failure at 9-12 months in *kcne2*<sup>-/-</sup>- mice. At one year, 30 % of the *kcne2*<sup>-/-</sup>-mice showed a moderately reduced ejection fraction, consistent with heart failure.

## *Abstract*

Deletion of KCNE2 leads to calcium-induced hypertrophy and partially lethal heart failure. Potential causes of the hypertrophic response are an altered function of the LTCC and increased serum levels of insulin. Here, we have shown a direct link between deletion of a potassium channel ancillary subunit and subsequent development of heart failure.

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

### 1.1.1 Definition

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das bei Patienten mit vererbter oder erworbener Störung der Herzstruktur und/oder -funktion auftritt [1]. Die europäische Gesellschaft für Kardiologie [*European Society of Cardiology (ESC)*] definiert die Herzinsuffizienz als ein

*Syndrom, bei dem der Patient typische Symptome und Zeichen präsentiert, welche aus einer abnormen Herzstruktur oder -funktion resultieren [2].*

Das Syndrom ist durch häufige Hospitalisierungen, eine eingeschränkte Lebensqualität und eine verkürzte Lebenserwartung gekennzeichnet [1].

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, die 1–2 % der westlichen Bevölkerung betrifft [3, 4]. In den USA gibt es jährlich ca. 825 000 neue Fälle [5], und im Jahr 2010 waren knapp 280 000 Todesfälle auf die Diagnose Herzinsuffizienz zurückzuführen [5]. Das Lebensrisiko eines 55-jährigen Menschen, im Laufe seines Lebens an Herzinsuffizienz zu erkranken, liegt zurzeit bei ca. 30 % [6]. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie und trotz der Entwicklung vielfältiger Therapiemöglichkeiten haben die Überlebensraten in den letzten 50 Jahren nur leicht zugenommen [5, 7]: Von den Erkrankten lebt nur jeder zweite länger als fünf Jahre nach Diagnosestellung [5].

Eine Herzinsuffizienz führt zu häufigen Hospitalisierungen und verursacht dadurch hohe Kosten für die Gesundheitssysteme. So erfolgten in Deutschland im Jahr 2012 386 000 stationäre Behandlungen aufgrund einer Herzinsuffizienz. Damit war die Herzinsuffizienz die häufigste Hauptdiagnose bei krankheitsbedingten stationären Krankenhausaufenthalten [8]. Da die Herzinsuffizienz vor allem eine Erkrankung des älteren Menschen ist und die Lebenserwartung in den westlichen Ländern steigt, ist davon auszugehen, dass die Prävalenz der Herzinsuffizienz weiter zunehmen wird [9, 10]: Berechnungen gehen davon aus, dass in



den USA die Zahl der Patienten mit einer Herzinsuffizienz bis zum Jahr 2030 um 46 % auf mehr als 8 Millionen Betroffene steigen wird [9]. Auch für die Kosten wird ein rasanter Anstieg auf 69 Milliarden US-Dollar im Jahr 2030 vorausgesagt [9]. In Deutschland wird ein ähnlicher Anstieg erwartet: Im Jahr 2050 werden in Deutschland ca. 350 000 über 80-jährige an einer Herzinsuffizienz erkrankt sein [10].

### 1.1.3 Klinisches Bild und Klassifikation

Die Hauptsymptome der Herzinsuffizienz sind eingeschränkte Leistungsfähigkeit (Fatigue) und Dyspnoe [1]. Während die Dyspnoe anfangs nur bei körperlicher Belastung auftritt, können in späteren Stadien der Herzinsuffizienz auch Orthopnoe<sup>1</sup> und paroxysmale nächtliche Dyspnoe<sup>2</sup> auftreten [1]. Häufig imponieren in der körperlichen Untersuchung bei Patienten mit Herzinsuffizienz prätibiale Ödeme, gestaute Halsvenen sowie Rasselgeräusche über der Lunge [1, 2]. Entsprechend ihrem klinischen Zustand werden die Patienten nach der NYHA-Klassifikation<sup>3</sup> in vier Klassen eingeteilt (von NYHA I: *keine Einschränkung der körperlichen Aktivität* bis NYHA IV: *jegliche körperliche Anstrengung ist eingeschränkt, Symptome auch in Ruhe*).

Einer der Hauptparameter zur Quantifizierung der Herzinsuffizienz ist die Ejektionsfraktion (EF). Sie ist der Quotient aus Schlagvolumen und enddiastolischem Volumen und wird mittels Echokardiographie bestimmt. Häufig ist sie bei herzinsuffizienten Patienten reduziert (d.h.  $EF < 50\%$ ). Allerdings gibt es auch Patienten, bei denen trotz typischer Zeichen der Herzinsuffizienz die EF nicht oder nur geringgradig eingeschränkt ist. Daher hat sich in letzter Zeit eine Unterteilung der Herzinsuffizienz in zwei Formen etabliert:

- Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Funktion / systolische Herzinsuffizienz (*heart failure with reduced ejection fraction, HF-REF*)
- Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Funktion / diastolische Herzinsuffizienz (*heart failure with preserved ejection fraction, HF-PEF*)

Zur Diagnose der HF-REF müssen typische Zeichen und Symptome der Herzinsuffizienz sowie eine reduzierte Ejektionsfraktion vorliegen. Die Diagnose der HF-PEF erfordert typische Zeichen und Symptome der Herzinsuffizienz, eine normale (oder nur gering reduzierte)

---

<sup>1</sup>Dyspnoe im Liegen

<sup>2</sup>Plötzlich beginnende Episoden akuter Luftnot mit Husten, die vor allem nachts auftreten

<sup>3</sup>New York Heart Association

EF sowie eine relevante strukturelle Herzerkrankung<sup>4</sup>. Verschiedene echokardiographische Parameter sind zur Diagnose der HF-PEF etabliert [2].

### **1.1.4 Therapie**

Die Behandlungsziele in der Therapie der Herzinsuffizienz sind eine Symptomverbesserung, eine Verringerung der Krankenhauseinweisungen sowie die Verbesserung des Überlebens [2]. Die nicht-medikamentöse Therapie stützt sich vor allem auf moderates Ausdauertraining bzw. körperliche Bewegung sowie Begrenzung der täglich zugeführten Natriummenge [1]. Die medikamentöse Therapie stützt sich auf die Gabe von Betablockern und ACE-Inhibitoren (ACE-I) bzw. AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (ARB). Zusätzlich kommen Mineralocorticoid-Rezeptorantagonisten (MRA) in Betracht. ACE-I, ARB und MRA wirken durch Verhinderung des myokardialen Remodelings prognoseverbessernd und senken die Hospitalisierungsrate [11–15]. Rein symptomatisch, jedoch nicht prognoseverbessernd wirken Diuretika.

Bei einer EF < 35 % wird zusätzlich die Implantation eines internen Cardioverter/Defibrillators (ICD) zum Schutz vor plötzlichem Herztod durch Kammerflimmern empfohlen [16]. Die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT-D) bietet eine zusätzliche apparative Therapieoption. Im Endstadium der Herzinsuffizienz kommen sowohl eine Herztransplantation als auch die Implantation eines mechanischen Kreislaufunterstützungssystems in Betracht [17, 18].

### **1.1.5 Pathophysiologie**

Eine Herzinsuffizienz ist die Endstrecke vieler kardialer Erkrankungen und kann sich aufgrund verschiedener Ursachen entwickeln. Die häufigste Ursache einer systolischen Herzinsuffizienz ist die Koronare Herzerkrankung, gefolgt von Arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus [2]. Des Weiteren kann die Herzinsuffizienz durch virale Infektionen, Alkoholabusus, bestimmte Chemotherapeutika sowie „idiopathisch“ bedingt sein [2]. Dabei enthält die Kategorie „idiopathisch“ alle noch nicht näher bekannten Gründe. Obwohl die Ursache der idiopathischen Erkrankungen nicht geklärt sind, könnten einige davon genetischen Ursprungs sein [2].

---

<sup>4</sup>Linksventrikuläre Hypertrophie oder Vergrößerung des linken Vorhofs

Aufgrund der engen Assoziation vieler Formen der Herzinsuffizienz mit einer kardialen Hypertrophie ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die eine solche Hypertrophie induzieren, von großem Interesse [19].

## 1.2 Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie

Als Reaktion auf einen veränderten zirkulatorischen Bedarf kann sich das Herz durch Hypertrophie anpassen. Die Hypertrophie bezeichnet eine Zunahme der Herzmasse und ist vor allem auf eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten zurückzuführen, da das Herz größtenteils aus ausdifferenzierten Kardiomyozyten besteht [19, 20]. Es werden zwei Formen der Hypertrophie unterschieden: die physiologische und die pathologische. Stimuli der physiologischen Hypertrophie sind z. B. eine Schwangerschaft oder aerober Ausdauersport, Stimuli für eine pathologische Hypertrophie sind u. a. eine Druck- oder Volumenbelastung (z. B. bei arterieller Hypertonie oder Aorteninsuffizienz) oder eine Kardiomyopathie (s. Abb. 1.1). Bei beiden Formen der Hypertrophie kommt es zu einer Veränderung der Herzstruktur (vgl. Bernardo *et al.* [19]).

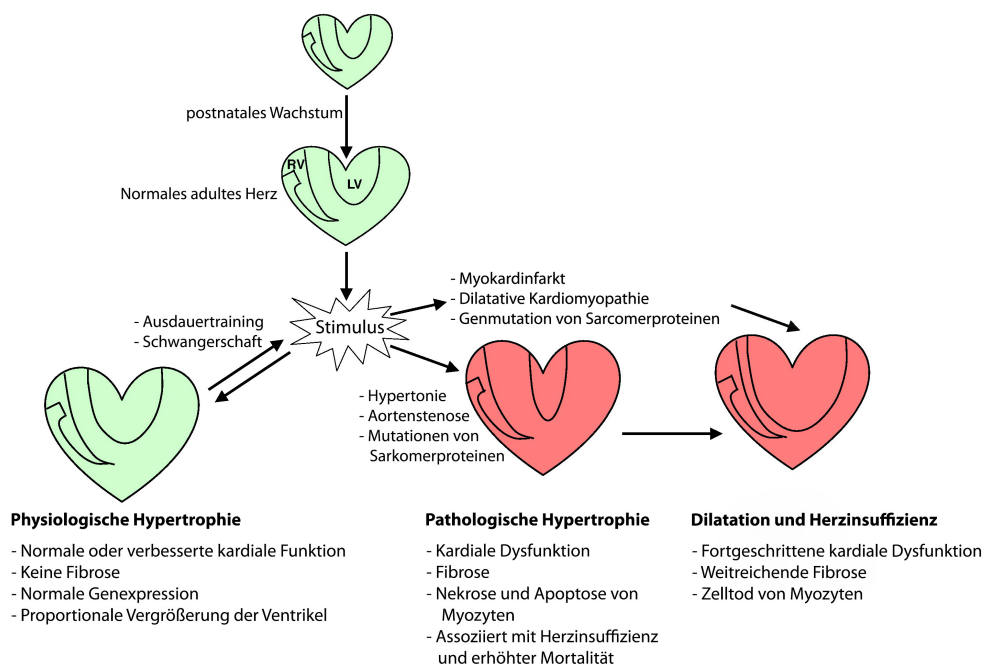


Abbildung 1.1: Formen der kardialen Hypertrophie

LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel. *Abbildung entnommen aus Bernardo, Weeks, Pretorius und McMullen [19]*

Die physiologische Hypertrophie geht mit einer normalen oder sogar verbesserten kardialen Funktion einher [21]. Die pathologische Hypertrophie hingegen ist mit einer gestörten Herzfunktion assoziiert und kann kurzzeitig durch Reduktion der Wandspannung die Pumpfunktion des Herzens erhalten [22]. Bei längerfristigem Bestehen kann sie jedoch zu einer Herzinsuffizienz führen [19, 23].

### **1.2.1 Physiologische Hypertrophie**

Die physiologische Hypertrophie wird über unterschiedliche Tyrosinkinaserzeptoren und nukleäre Rezeptoren vermittelt. Liganden dieser Rezeptoren sind u. a. Triiodthyronin ( $T_3$ ), Insulin und Insuline-like growth factor (IGF-1) [20]. Das Schilddrüsenhormon  $T_3$  ist vor allem während der postnatalen Phase für das Wachstum des Herzens verantwortlich. Über die Stimulation der Transkription nimmt es direkten Einfluss auf die Expression kontraktiler Proteine sowie der Proteine des Calciumhandlings [20]. Insulin bindet an den Insulinrezeptor, dessen Stimulation zur Aktivierung des PI3K-AKT-Signaltransduktionswegs führt. IGF-1 ist ein zentraler Mediator der physiologischen Hypertrophie und aktiviert den gleichen Signaltransduktionsweg [24, 25].

Im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie bleiben bei der physiologischen Hypertrophie die Calcium-handling Proteine unverändert [20]. Auch die Phosphatase Calcineurin, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie spielt, ist bei physiologischer Hypertrophie nicht reguliert. [26, 27].

### **1.2.2 Pathologische Hypertrophie**

Ein Aktivierungsweg der pathologischen Hypertrophie führt über die Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren [28]. Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine sind Liganden dieser Rezeptoren. Über mehrere Stufen kommt es zur Produktion von Inositoltriphosphat und Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Das erhöhte Calcium führt über Calcineurin zur Aktivierung von Nuclear factor of activated T-Cells (NFAT) und über die Calmodulinkinase (CaMK) zur Inaktivierung von Histondeacetylasen (HDACs) [28].

## 1.2.3 Molekulare Vermittler der pathologischen Hypertrophie

### Calcineurin

Calcineurin ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinphosphatase aus der Familie der Phosphoproteinphosphatasen und ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, z. B. bei der Immunantwort, der Signaltransduktion und der Hypertrophie des Herzens [29, 30]. Es ist weitgehend bewiesen, dass Calcineurin- und konsekutive NFAT-Aktivierung bei der Vermittlung der Herzhypertrophie eine wichtige Rolle spielen (vgl. Molkentin [27]). Die Hypertrophiegene, die Ziel der NFAT-Aktivierung sind, sind hauptsächlich maladaptiv, also Vermittler einer pathologischen Hypertrophie [20] – obwohl gezeigt werden konnte, dass der Calcineurin/NFAT-Signalweg zumindest während der Entwicklung des Herzens auch für die normale Zellproliferation notwendig ist [27].

Das Calcineurin-Molekül besteht aus zwei Untereinheiten: der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (CnA) und der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CnB) [28]. CnA besitzt neben der N-terminalen Phosphatasedomäne eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und einen autoinhibitorischen Teil [30]. Im nichtaktivierten Zustand ist Calcineurin durch diese autoinhibitorische Domäne in seiner Phosphataseaktivität gehemmt [30]. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert den NFAT, was zu einer Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern führt [28, 30]. Die Aktivierung von Calcineurin geschieht durch Calmodulin (CaM). CaM ist ein Protein, das zudem in der glatten Muskulatur vorkommt und dort eine dem Troponin C vergleichbare Rolle wahrnimmt [31].

### Calmodulin Kinase II

CaM aktiviert neben Calcineurin auch die Calmodulin Kinase II (CaMKII), eine multifunktionale Proteinkinase, deren Bedeutung bei der pathologischen Hypertrophie in den letzten Jahren genauer untersucht wurde [32]. Die CaMKII beeinflusst einerseits direkt die Kontraktion und Relaxation von Kardiomyozyten durch Regulation von Schlüsselenzymen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts [22]: Unter anderem beeinflusst die CaMKII den L-Type Calcium Channel, der dadurch eine größere Stromdichte zeigt [31]. Andererseits bewirkt die CaMKII auch eine veränderte Gentranskription, z.B. durch die Beeinflussung von HDACs [32]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CaMKII zu einem kardialen Remodeling mit konsekutiver Herzinsuffizienz führt [33, 34]. Die Inhibierung der CaMKII

fürte zu einer abgeschwächten pathologischen Hypertrophie in Tiermodellen mit simulierter Erhöhung der Nachlast [35, 36]. Zusammengefasst kommt der CaMKII eine wichtige Rolle in der Vermittlung der pathologischen Hypertrophie zu. Die pharmakologische Inhibition dieser Kinase scheint – zumindest von einem pathophysiologischen Standpunkt aus gesehen – eine interessante Therapiemöglichkeit bestimmter Formen der Herzinsuffizienz zu sein [22, 35].

## 1.2.4 Elektrophysiologisches Remodeling und kardiale Hypertrophie

Im hypertrophierten Herz kommt es zu einem metabolischen, biochemischen und elektrophysiologischen Remodeling [37]. Ein gemeinsames Merkmal des elektrophysiologischen Remodelings bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese ist eine verlängerte Aktionspotentialdauer (APD) [37, 38]. Diese Verlängerung der APD ist hauptsächlich auf eine Reduktion der auswärts gerichteten Kaliumströme zurückzuführen (*vgl. Review von Furukawa und Kurokawa [39]*). So konnte zum Beispiel in einem Mausmodell der dilatativen Kardiomyopathie eine Reduktion des auswärts gerichteten Kaliumstromes  $I_{to}$  mit gleichzeitiger Down-Regulation des Kaliumkanalproteins Kv 4.2 gezeigt werden [40].

Ob jedoch die Reduktion von  $I_{to}$  und damit die verlängerte APD *Ursache* einer Hypertrophie bzw. Dilatation oder nur deren *Ergebnis* ist, ist umstritten [39]. Perrier *et al.* konnten an Ratten zeigen, dass es als Reaktion auf eine kardiale Ischämie in ventrikulären Myozyten zu einem elektrischen Remodeling kommt, bevor die Zellen hypertrophieren: Eine Woche nach einem Myokardinfarkt waren die APD verlängert und  $I_{to}$  vermindert. Erst weitere zwei Wochen später ließ sich auch eine Hypertrophie nachweisen [37]. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch eine primäre Änderung der kardialen Ionenströme – z. B. durch veränderte Funktion oder Fehlen eines Ionenkanalproteins – eine Hypertrophie auslösen könnte.

## 1.3 Kardiale Ionenkanäle

### 1.3.1 Das Aktionspotential des Herzens

Eine kontinuierliche Zirkulation des Blutes im Gefäßsystem ist für die ungestörte Funktion des Säugetierorganismus essentiell. Die „Pumpe“ in diesem Kreislauf ist das Herz, das durch

## Einleitung

seine regelmäßigen Kontraktionen den Blutkreislauf aufrechterhält. Die Grundlage der Kontraktionsfähigkeit ist die elektrische Erregbarkeit der Myokardzellen. Wird eine Myokardzelle über einen Schwellenwert erregt, entsteht ein Aktionspotential (AP). Dabei wird die Membran der Myokardzelle depolarisiert, und das Membranpotential erreicht positive Werte. Die Depolarisation der Zelle führt zur Öffnung von Calciumkanälen, wodurch Calcium in das Zytosol gelangt. Durch Bindung von Calcium an die kontraktilen Proteine kommt es zur Konformationsänderung der Proteine, die als Kontraktion der Zelle sichtbar wird.

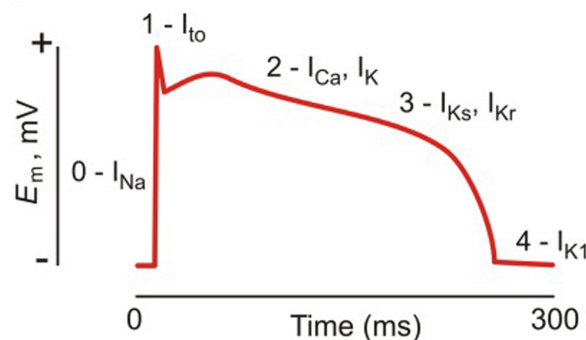


Abbildung 1.2: Aktionspotential einer humanen Ventrikelmyokardzelle. Die Ziffern 0-4 markieren die unterschiedlichen Phasen des Aktionspotentials.  $E_m$ =Membranpotential. Abb. entnommen aus [41].

Das ventrikuläre AP ist durch fünf unterschiedliche Phasen charakterisiert (s. Abb. 1.2): Ausgehend vom Ruhemembranpotential ( $-80 \text{ mV}$ , Phase 0) kommt es bei einer Depolarisation der Zellmembran zu einem schnellen Natriumeinstrom ( $I_{\text{Na}}$ ) durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle, wodurch das Membranpotential in Richtung des Gleichgewichtspotentials für  $\text{Na}^+$  getrieben wird (Phase 1). Durch Inaktivierung der Natriumkanäle und gleichzeitige Aktivierung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle entsteht ein kurzzeitiger, auswärts gerichteter Strom (*transient outward*,  $I_{\text{to}}$ ). Dies führt netto zu einer geringen Repolarisierung des Membranpotentials, wodurch die charakteristische Spitze im Aktionspotential erzeugt wird. Anschließend öffnen sich auch spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Phase 2), durch welche Calciumionen in das Zytosol ( $I_{\text{Ca}}$ , s. Kapitel 1.3.2) fließen. Dies generiert im Zusammenspiel mit auswärts strömenden Kaliumionen ( $I_{\text{K}}$ ) die Plateauphase (Phase 2), in der das Membranpotential nahezu stabil bleibt. Schließlich überwiegt der Kaliumstrom ( $I_{\text{Kr}}$  und  $I_{\text{Ks}}$ ) und führt zur Repolarisation der Zelle (Phase 3), bis das Ruhemembranpotential und damit die Ausgangslage erreicht ist (Phase 4). (Vgl. Crump und Abbott [41])

### 1.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Für eine Kontraktion der Kardiomyozyten ist Calcium notwendig. Das Calcium wird von Troponin C gebunden, was zu einer Konformationsänderung des Tropomyosins führt. Diese Konformationsänderung ermöglicht den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin die Kontraktion [42].

Die schnelle Abfolge von Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels erfordert eine ebenso schnelle Änderung der zytosolischen Konzentration von freiem Calcium  $[\text{Ca}]_i$ . Diese Konzentrationsänderungen werden durch Ionenkanäle und -transporter ermöglicht. Der Calcium-einstrom in das Zytosol geschieht durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ [L-type Calcium Channel (LTCC)], die sich während der Depolarisation öffnen. Durch den Calciumeinstrom und die daraus resultierende Konzentrationserhöhung von  $[\text{Ca}]_i$  im Zytosol öffnen sich Calcium-Kanäle vom T-Typ [auch Ryanodin-Rezeptor (RyR) genannt], die aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zusätzliches Calcium freisetzen. Dieser Prozess wird *Ca<sup>2+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung* genannt, da die Freisetzung von Calcium aus dem SR durch Calcium initiiert wird. (Vgl. Bers [43, 44])

Für die Relaxation der Zelle ist die Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Bindung mit dem Troponin C nötig. Dies erfordert eine Senkung von  $[\text{Ca}]_i$ . Das Calcium wird über zwei unterschiedliche Wege aus dem Zytosol befördert: Der größere Teil des Calciums wird „recycled“, indem es über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [Sarcoplasmatic Reticulum Ca-ATPase (SERCA)] unter Energieverbrauch in das SR zurückgepumpt wird. Ein kleinerer Teil des Calciums wird durch eine sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger, NCX) nach extrazellulär gepumpt [43, 45]. Dabei ist sowohl in der Maus als auch im Menschen der Anteil des von SERCA gepumpten Calciums sehr viel größer als der des NCX: In der Maus ist die SERCA für ca. 92 % der Calciumextrusion verantwortlich, im Menschen für ca. 70 % [46, 47]. Darüber hinaus gibt es noch andere Mechanismen, die das Calcium aus dem Zytosol entfernen; sie spielen aber nur eine untergeordnete Rolle [43].

### 1.3.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind Proteine, die selektiv Kaliumionen durch die Zellmembran passieren lassen. Sie spielen unter anderem eine entscheidende Rolle in der Repolarisation der Myokard-



zellen. Die Kaliumkanäle haben eine große Funktionsvielfalt [48], welche durch die Zusammenlagerung unterschiedlicher Untereinheiten ermöglicht wird. Kaliumkanäle besitzen durch viele unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten, an die sich  $\beta$ -Untereinheiten lagern können, unter den selektiven Ionenkanälen die größte Funktionsvielfalt [49, 50]. Die Familie der KCNE-Gene kodiert für solche  $\beta$ -Untereinheiten.

### 1.3.4 Die Untereinheit E2 spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (KCNE2)

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte KCNE2-Gen gehört zur Familie der KCNE-Gene. Diese Genfamilie besteht aus fünf unterschiedlichen Vertretern (KCNE 1–5), die für jeweils eine  $\beta$ -Untereinheit von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen ( $K_V$ -Kanal) kodieren [41, 51]. Zwei KCNE-Untereinheiten bilden zusammen mit vier  $\alpha$ -Untereinheiten stabile Komplexe, welche  $K_V$ -Kanäle ergeben (s. Abb. 1.3 A). Die KCNE-Untereinheiten sind Proteine mit einem transmembranären Abschnitt (s. Abb. 1.3 B) [41]. Die  $\beta$ -Untereinheiten verändern u. a. das Schaltverhalten, die Aktivierung/Inaktivierung, die Spannungsabhängigkeit sowie die Ionenleitfähigkeit von  $\alpha$ -Untereinheiten [52].

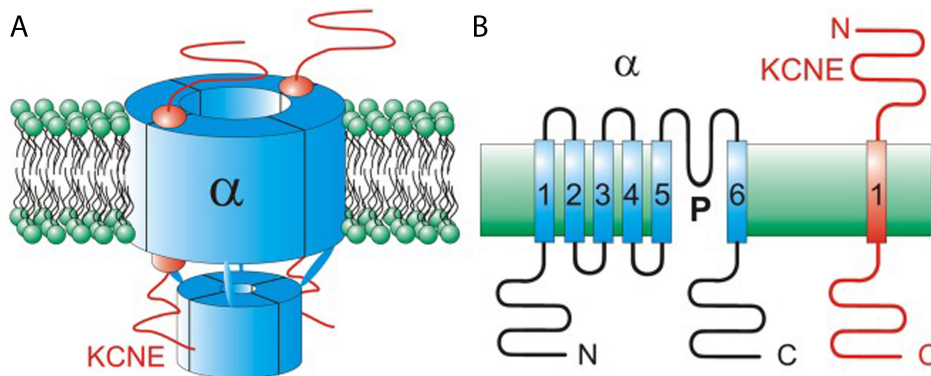


Abbildung 1.3: Modell eines Kaliumkanals.

A) Vorgeschlagene Anordnung der  $\alpha$ - und KCNE-Untereinheiten in einem  $K_V$ -Kanal. B) Anordnung der transmembranären Segmente von einer  $\alpha$ -Untereinheit eines  $K_V$ -Kanals (blau) und einer KCNE-Untereinheit (rot). *Abb. entnommen aus [41].*

### Physiologische Bedeutung von KCNE2

Durch sein weitverbreitetes Vorkommen hat das KCNE2-Protein viele unterschiedliche physiologische Funktionen im Säugetierorganismus: Im Epithel der Magenmukosa ist die  $H^+/K^+$ -ATPase zur Erzeugung von sauren pH-Werten auf einen konstanten Nachschub an Kalium-

ionen angewiesen. Die benötigten Kaliumionen fließen durch einen heteromeren KCNQ1-KCNE2-Kanal [50]. Die KCNE2-Deletion im Mausmodell führte zu einer Achlorhydrie mit konsekutiver Hyperplasie des Magens [53, 54]. Die gestörte Magenfunktion nach KCNE2-Deletion führte auch zu einer Eisenmangelanämie im Tiermodell [55].

Auch für die korrekte Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis (Liquor) sind Kaliumkanäle notwendig. Der Liquor wird im Epithel des Plexus choroideus gebildet und in die Hirnventrikel sezerniert. Ionen werden über Pumpen und Transporter in den Liquor befördert. Dadurch entsteht ein osmotischer Gradient, dem Wasser folgt [56]. KCNE2 bildet im Epithel des Plexus choroideus durch Zusammenlagerung mit zwei unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten Kaliumkanäle aus [57]. Die KCNE2-Deletion in der Maus führte im Plexus choroideus zu einem gestörten Kaliumfluss, Hyperpolarisation der Epithelzellen und zu einer erhöhten Chloridkonzentration im Liquor sowie zu einem myo-inositol-abhängigen Epilepsie-Phänotyp [57, 58].

Des Weiteren ist KCNE2 zusammen mit KCNQ1 in Epithelzellen der Schilddrüse exprimiert. KCNQ1-KCNE2 bildet einen Kanal in Thyreozyten, der für eine ungestörte Iodidakkumulation notwendig ist. Funktioniert der durch KCNE2 und KCNQ1 gebildete Kanal jedoch nicht regelrecht, kommt es zu einer Störung der Iodidakkumulation in der Schilddrüse mit konsekutiver Hypothyreose. (Vgl. [59])

### **Kardiale KCNE2-assoziierte Pathologien**

Mutationen im KCNE2-Gen des Menschen sind mit dem angeborenen Long-QT-Syndrom (LQTS) assoziiert [60]. Bestimmte Polymorphismen im KCNE2-Gen erhöhen die Anfälligkeit für das medikamenteninduzierte LQTS [61]. Auch bei Vorhofflimmern kann ein mutiertes KCNE2-Gen eine ursächliche Rolle spielen: In zwei chinesischen Familien mit Mutationen im KCNE2-Gen konnte ein gehäuftes Auftreten von Vorhofflimmern nachgewiesen werden [62]. Kürzlich wurden auch in einer dänischen Kohorte von Patienten mit Vorhofflimmern zwei unterschiedliche *gain-of-function* Mutationen im KCNE2-Gen nachgewiesen [63].

Im Mausmodell führte die KCNE2-Deletion zu multiplen Störungen, die eine Prädisposition

für den plötzlichen Herztod darstellen können [64]: Die Knockouttiere zeigten einen milden Diabetes mellitus, eine Hyperkaliämie, eine Hypercholesterinämie sowie erhöhte Angiotensin 2-Level und eine Anämie [64]. Auch ein Diät-abhängiger Phänotyp eines plötzlichen Herztodes konnte in Knockouttieren beobachtet werden, wenn diese mit einer fettreichen Nahrung gefüttert wurden [65]. Ein Zusammenhang zwischen einer KCNE2-Deletion und einer kardialen Hypertrophie und/oder Herzinsuffizienz konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Mausmodell die Auswirkungen der KCNE2-Deletion auf die Herzfunktion zu untersuchen. Arbeiten von Roepke *et al.* [66] hatten zeigen können, dass in jungen KCNE2-Knockout-Tieren keine *strukturelle* Herzerkrankung bestand: Die Herzgröße war normal, eine linksventrikuläre Hypertrophie oder Dysfunktion bestand nicht. *Elektrisch* zeigte sich jedoch bereits ein kardialer Phänotyp: Die ventrikuläre Aktionspotentialdauer war verlängert, und die Stromdichte von  $I_{to}$  und  $I_{Ks}$  – zwei wichtige repolarisierende Kaliumkanäle – war verringert [66].

Die Auswirkung der KCNE2-Deletion in alten Mäusen hingegen ist bisher nicht bekannt. Dazu wurde in dieser Arbeit die Herzfunktion 12–15 Monate alter *kcne2<sup>-/-</sup>*-Mäuse (KO) mit unterschiedlichen Methoden untersucht und mit der Herzfunktion gleichaltriger *kcne2<sup>+/+</sup>*-Tiere (WT) verglichen. Dies geschah insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Herzinsuffizienz im Menschen vor allem ältere Individuen betrifft [4, 6]. Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Führt die KCNE2-Deletion im Alter zu einer erhöhten Mortalität?
2. Führt die KCNE2-Deletion im Alter zu einer Herzinsuffizienz?
3. Welche strukturellen, funktionellen, elektrischen und molekularen Parameter sind verändert?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere stammten aus unserer eigenen Zucht einer C57Bl6 *kcne2<sup>-/-</sup>*-Mauslinie. Die Generierung dieser Mauslinie erfolgte in unserem Labor (*für Details s. Roepke et al. [53]*). Würfe von heterozygoten Zuchtpaaren zeigten eine den Mendelschen Gesetzen entsprechende Genotypverteilung von 1:2:1, was darauf hinweist, dass die Deletion des KCNE2-Gens nicht direkt mit erhöhter Sterblichkeit im Embryonalstadium einhergeht.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere waren männlich und zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 12 und 15 Monate alt (so weit nicht anders angegeben). Die Unterbringung und Versorgung der Tiere erfolgte in einem Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durch geschultes Personal. Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (*standard pathogen free*) in standardisierten Käfigen gehalten. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.

Für alle Tierexperimente lag bei Beginn der Versuche eine Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin vor (Referenznummer G0239/10). Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung der *Grundsätze der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis* und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) sowie der europäischen Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt.

#### 2.1.1 Präparation und Organentnahme

Alle Tiere wurden vor der Organentnahme zunächst mit einer Mischung aus 200 mg/kg KG Ketamin (Ketavet, Pharmacia GmbH) und 20 mg/kg KG Xylazin (Rompun 2 %, Bayer Vital GmbH) anästhesiert. Dies erfolgte durch intraperitoneale Injektion. Gleichzeitig wurden 50 µl Heparin (5000 IU/ml, Ratiopharm) zur Antikoagulation appliziert. Nach Kontrolle der tiefen Anästhesie und Analgesie per tailpinch<sup>1</sup> wurde das Tier auf dem Operationstisch gelagert und fixiert. Mit einer Schere wurde zunächst das Fell um den Proc. xiphoideus großzügig entfernt. Durch einen Schnitt kaudal des Proc. xiphoideus wurde ein Zugang zur

---

<sup>1</sup>Hierbei wird mit einer Pinzette in den Schwanz der Maus gekniffen. Dies löst bei einem wachen Tier einen Fluchtreflex aus, der in tiefer Narkose erlischt.

Peritonealhöhle geschaffen. Beidseitige Schnitte in der Axillarlinie nach kranial (sog. *clam-shell* Thorakotomie) und ein weiterer durch das Diaphragma erlaubten die Deflektierung des Brustkorbes nach kranial-ventral. Das Perikard wurde eröffnet und die Aorta auf Höhe des Aortenbogens mit einer Pinzette abgeklemmt. Das weiterhin kontrahierende Herz wurde nun durch einen einzigen Schnitt exzidiert, indem alle seine zu- und abführenden Gefäße gleichzeitig durchtrennt wurden. Das Organ wurde direkt in eine mit 4 °C kaltem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP, s. Kapitel 2.2.2) gefüllte Präparationsschale überführt. In dieser erfolgte unter einem Mikroskop die Kanülierung der Aorta mit einer 1.8 F Stahlkanüle (Hugo Sachs Elektronik). Die Kanüle wurde mit einem Polyamidfaden (USP 4.0, SMI, Belgien) durch eine doppelte Ligatur befestigt. Verbleibendes Blut wurde durch retrograde Spülung der Aorta mit 4 °C kaltem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) aus den Koronararterien und dem Myokard entfernt.

## **2.2 Isoliertes Herz im Langendorff-Versuch**

Messungen am schlagenden Säugerherzen außerhalb des Körpers werden seit Mitte des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Oskar Langendorff beschrieb 1895 erstmals eine Methode [67], welche in leicht abgewandelter Art in dieser Arbeit angewendet wurde.

### **2.2.1 Aufbau der Langendorff-Anlage**

In unserem Labor wurde eine Langendorff-Anlage für kleine Säugerherzen verwendet (IHSR, Type 884, Hugo Sachs Elektronik [HSE]). Das frisch exzidierte und kanülierte Herz (s. Kapitel 2.1.1) wurde in eine geschlossene und auf 37 °C erwärmte Kammer überführt und über die Aortenkanüle mit der Apparatur verbunden. Das Herz wurde mit einem oxygenierten Perfusat (s. Kapitel 2.2.2) kontinuierlich perfundiert: Eine Rollerpumpe (REGLO Digital MS-4/8, Ismatec, CH) pumpte das Perfusat retrograd in die Aorta. Dadurch schloss sich die Aortenklappe passiv, und das Perfusat strömte durch die Koronarostien in die Koronararterien. Das Perfusat wurde bei 37 °C kontinuierlich mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Der Perfusionsdruck wurde mithilfe eines manuellen Flusswiderstandregulators auf 60 mmHg eingestellt. Der resultierende Druck und der Koronarfluss wurden zur Kontrolle gemessen. Eine PC-gesteuerte Infusionspumpe (Pump 22, Harvard Instruments, MA, USA) ermöglichte es, dem Perfusat direkt im Aortenblock unterschiedliche Pharmaka beizumischen.

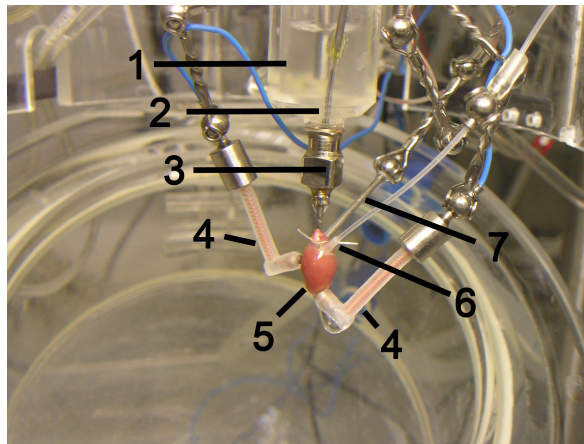


Abbildung 2.1: Herz in der Langendorff-Anlage.

(1) Aortenblock, (2) Schlauch für Infusionen, (3) Aortenkanüle, (4) EKG-Elektroden, (5) Herz, (6) PVC-Ballonkatheter, (7) Stimulationselektrode

Der linksventrikuläre Druck wurde über einen selbst hergestellten und mit Wasser gefüllten Ballonkatheter aus Polyvinylchlorid (PVC) abgenommen, der in den linken Ventrikel eingebracht wurde. Die Ableitung des EKGs erfolgte mit zwei direkt auf dem Herzen platzierten Elektroden. Über eine Stimulationselektrode (Stimulator C, Type 224, HSE) wurde das Herz im Bereich des Sinusknotens mit einer Frequenz von 500 bpm stimuliert.

## 2.2.2 Krebs-Henseleit-Puffer

Eine häufig verwendete Pufferlösung für Langendorff-Experimente ist der Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) [68]. Dieser ähnelt der Elektrolytkonzentration des Blutes und ermöglicht den Sauerstofftransport. In unserem Labor wurde ein KHP folgender Ionenkonzentration benutzt (in mM): NaCl 118,0; NaHCO<sub>3</sub> 24,7; KCl 4,7; MgSO<sub>4</sub> 2,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2,0 und Glukose 11,0. Die Lösung wurde durch einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm filtriert, um mögliche Embolien von Präzipitaten in den Koronarien zu vermeiden. Eine kontinuierliche Erwärmung des Perfusionsreservoirs über einen externen Wasserkreislauf gewährleistete die gleichbleibende Temperatur des Perfusats von 37 °C, welche regelmäßig mit einem Handthermometer (GTH 1170, Greisinger Electronic) kontrolliert wurde.

## 2.2.3 Experimenteller Ablauf

Dieser Versuch diente dem Vergleich der Herzfunktion von KCNE2-Knockout-Mäusen (KO) mit Wildtyp-Tieren (WT) gleichen Alters. Der im Voraus festgelegte Ablauf wurde für beide

## Material und Methoden

Gruppen exakt gleich ausgeführt. Der Versuch und die Auswertung erfolgten hinsichtlich des Genotyps der untersuchten Tiere verblindet. Direkt nach der Exzision des Herzens und der Kanülierung der Aorta wurde das Herz in der Langendorff-Apparatur aufgehängt und mit dem KHP perfundiert. Durch einen kleinen Schnitt in den Anulus fibrosus der Mitralklappe konnte der Ballonkatheter vom offenen linken Vorhof über die nun etwas erweiterte Öffnung der Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt werden. Anschließend wurde der Ballondruck mit einer Stellschraube auf 10 mmHg eingestellt. Nach Positionierung der Stimulationselektrode am rechten Vorhof in der Nähe des Sinusknotens (s. Abb 2.1) wurde das Herz mit 1 V bei 500 Hz stimuliert. Darauf folgte eine Äquilibrationsphase von 20 Minuten bei konstanter Stimulation. Die folgenden 60 Sekunden wurden aufgenommen und als *Basalwert* verwendet. Anschließend erfolgte die kontinuierliche Applikation von Isoprenalin für fünf Minuten. Dabei wurde das Pharmakon über die PC-gesteuerte Infusionspumpe dem KHP hinzugefügt, so dass am Organ eine Endkonzentration von 100 nmol resultierte. Nach Erreichen eines *steady states* wurde wiederum für 60 Sekunden gemessen und die resultierenden Werte als *Stimulationswert* verwendet.

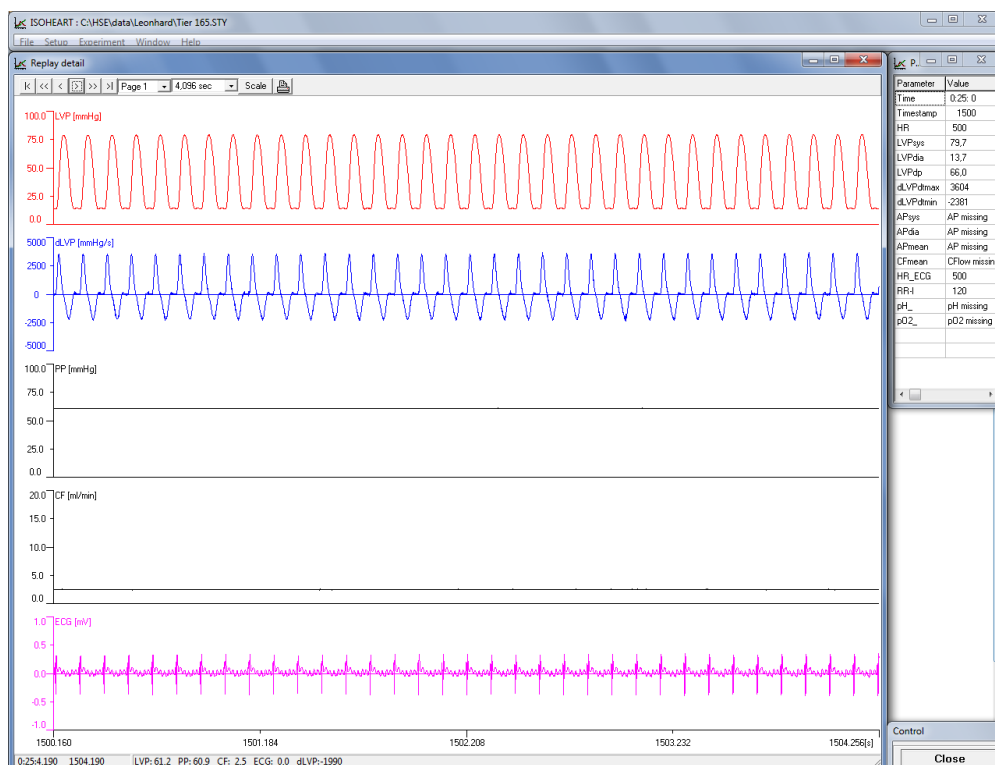


Abbildung 2.2: Screenshot der Akquisitionsoftware ISOHEART

Mit Beginn der warmen Herzperfusion mit der Pufferlösung wurde die computergestützte Datenaufnahme mit dem Programm *ISOHEART* (Version 1.5, HSE) gestartet. Analoge Si-

gnale wurden durch spezielle Druckabnehmer (Isotec) registriert und durch separate Verstärkermodule (TAM A und TTFM) amplifiziert. Alle Module waren in einem passenden Gehäuse (Plugsys, alle HSE) untergebracht. Nach Analog-Digital-Wandlung wurden die Daten digital und in Echtzeit mit einem PC aufgenommen (s. Abb. 2.2). Dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten, während des Versuches gemessenen Parameter aufgezeichnet. In die Auswertung wurden nur Herzen aufgenommen, bei denen die Ischämiezeit<sup>2</sup> weniger als fünf Minuten betrug.

Nach Beendigung des Experimentes wurden mit Hilfe der Software *ISOHEART* die einzelnen Kontraktionszyklen der basalen und der stimulierten Messungen offline analysiert. Nach Berechnung der arithmetischen Mittel für die einzelnen Parameter wurden diese in das Programm MS Excel (Version 2010, Microsoft, Wa, USA) exportiert und dort weiter analysiert.

Tabelle 2.1: **Parameter in *ISOHEART***

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Erklärung</b>
Zeit	[s]	Zeit seit Beginn des Experimentes
HF	[Schläge/min]	Herzfrequenz
LVP	[mmHg]	systolischer linksventrikulärer Druck
$dLVPdt$	[mmHg/s]	1. Ableitung des LVP nach der Zeit
CF	[ml/min]	Koronarfluss ( <i>coronary flow</i> )
PP	[mmHg]	Perfusionsdruck ( <i>perfusion pressure</i> )
ECG	[Graph]	Elektrokardiogramm

## 2.3 Isolation von Kardiomyozyten

Zur Isolation von einzelnen Zellen wurde eine modifizierte Langendorff-Apparatur verwendet. Die Isolation erfolgte nach einer Methode, die sich an die von Berry [69] und Vahouny [70] entwickelten Techniken anlehnt.

Kürzlich beschrieben wir die Optimierung dieser Methode in unserem Labor für murine Kar-

---

<sup>2</sup>Die Ischämiezeit bezeichnet die Zeit von Exzision des Herzens aus dem Versuchstier bis zum Beginn der Perfusion mit Pufferlösung in der Langendorff-Anlage.



diomyozyten [71]: Dabei werden nacheinander unterschiedliche Lösungen (siehe Tab. 2.2) verwendet. Ziel ist es zunächst, in einem calciumfreien Milieu das Gewebe zu reinigen. Anschließend werden mit dem Enzym Kollagenase die Kollagenfasern des Bindegewebes gespalten und die Kardiomyozyten schrittweise wieder an eine Calciumkonzentration von 1 mM gewöhnt.

Als Stocklösung wurde ein modifizierter KHP mit folgender Zusammensetzung verwendet (in mM): NaCl 117; KCl 4; HEPES 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; NaHCO<sub>3</sub> 4; MgCl<sub>2</sub> 1,7; Glucose 10. Nach zehnminütiger Begasung der Stocklösung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde der pH mit NaOH auf 7,40 (37 °C) eingestellt. Aus dieser oxygenierten Stocklösung wurden die einzelnen Isolationslösungen durch Zusatz unterschiedlicher Stoffe hergestellt (siehe Tab. 2.2).

Nach Befestigung des kanülierten Herzens in der modifizierten Langendorff-Apparatur wurde es für zwei Minuten mit Lösung 1 perfundiert, um verbleibendes Blut aus dem Gewebe zu waschen. Anschließend wurde das Herz für acht Minuten mit Lösung 2 perfundiert. Danach wurde das Organ in eine mit Lösung 3 befüllte Präparationsschale überführt. Nicht-kardiales Gewebe, die Atrien und die freie Wand des rechten Ventrikels wurden mit einer Schere sauber abgetrennt und verworfen. Darauf erfolgte die mechanische Dissoziation des übrigen Herzgewebes mithilfe von Pinzetten. Vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der Lösung in der Plastikspitze einer 5 mL Pipette führte zu weiterer Dissoziation des Herzgewebes und zum Herauslösen der einzelnen Kardiomyozyten aus dem Zellverband.

Die so entstandene Zellsuspension wurde anschließend durch ein Nylonnetz mit einer Maschengröße von 200 µm gefiltert, um Gewebeklumpen und andere Verunreinigungen zu entfernen. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 16  $\vec{g}$  wurden der Überstand verworfen und die Zellen in einer weiteren Lösung (Lösung 4) resuspendiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen durch Zentrifugation und Resuspendierung in Lösung 5 wieder an eine Calciumkonzentration von 1 mM gewöhnt.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden anschließend entweder für Messungen im IonOptix-System (s.u.) oder *Whole-cell Voltage Clamp*-Experimente (s. Kapitel 2.5) verwendet.

Tabelle 2.2: Lösungen für die Isolation von Kardiomyozyten

Lösung	Zusatz
Lösung 1	115 $\mu$ L 100 nM EGTA
Lösung 2	40 mg Collagenase (300 U/mg); 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
Lösung 3	16 mg Collagenase (300 U/mg); 20 mg BSA; 0,2 mM CaCl <sub>2</sub>
Lösung 4	15 mg BSA; 0,5 mM CaCl <sub>2</sub>
Lösung 5	15 mg BSA; 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>

## 2.4 IonOptix<sup>®</sup>-System

Mit dem IonOptix<sup>®</sup> System lassen sich Kontraktionen und Änderungen des Calciumgehaltes von einzelnen Kardiomyozyten untersuchen, indem mithilfe eines digital aufgenommenen Livebildes von einer Computer-Software die Längenänderung einer Zelle sowie deren Calciumgehalt detektiert und quantifiziert werden.

### 2.4.1 Aufbau der IonOptix-Anlage

In unserem Labor wurde ein Mehrkomponentensystem der Firma IonOptix LLC (Milton, Ma, USA) verwendet. Dieses besteht aus der *HyperSwitch* Lichtquelle, einem invertierten Mikroskop (Motic Inc., D), der Hochgeschwindigkeitskamera *MyoCam-S*, dem *Cell Framing Adapter* CFA300, dem *Fluorescence System Interface* FSI-700, dem Stimulator *MyoPacer* und einem PC mit der Software *IonWizard 6.0* (alle IonOptix).

### Strahlengang des Lichts

Die HyperSwitch Lichtquelle dient der Erzeugung und dem gleichzeitigen hochfrequenten Wechsel von Licht unterschiedlicher Wellenlängen. In ihr befindet sich eine Xenon-Gasentladungslampe, deren Lichtstrahl durch einen rotierenden Spiegel geleitet wird. Der Spiegel alterniert zwischen zwei verschiedenen Positionen mit einer Frequenz von 250 Hz und gibt damit dem Licht zwei unterschiedliche Wege vor. So gelangt das Licht von zwei Seiten in einen dichroischen Filterwürfel, dem zwei unterschiedliche Wellenlängenfilter (340 nm bzw. 380 nm) vorgeschaltet sind. Die im Filterwürfel zusammengeführten Wege des Lichts der beiden Wellenlängen verlassen den Filterwürfel an der gleichen Stelle und werden über ein gemeinsames Glasfaserkabel zum Mikroskop geleitet. Im Mikroskop trifft das Licht auf die mit Fura-2 AM beladenen Zellen (s. Kapitel 2.4.3) und erregt den Fluoreszenzfarbstoff. Dieser emittiert Licht, welches zunächst von einem Photomultiplier verstärkt und anschließend

durch einen CCD-Sensor detektiert wird, der sich in der MyoCam-S befindet. Eine vorge-schaltete Blende, der Cell Framing Adapter, ermöglicht die Einstellung der Kamera auf einen einzelnen Kardiomyozyten und damit eine Reduktion des Hintergrundsignals. Die Kamera liefert eine Auflösung von 774x490 Pixeln bei 240 fps und erlaubt so die Aufzeichnung schneller Änderungen des Calciumgehalts und der Zelllänge während einer Kontraktion. Über einen USB-Port ist die Kamera mit dem PC verbunden.

## **2.4.2 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM**

Fura-2 AM ist ein Ester des Calciumchelators Fura-2. Die lipophile Esterform ermöglicht dem Farbstoff die Permeation durch die Zellmembran in das Zytosol. Dort spalten zelleigene Esterasen diese Bindung auf, so dass der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann [72]. Fura-2 bindet Calcium mit hoher Affinität und ändert bei dieser Bindung sein Exzitationsspektrum von 380 nm zu 340 nm [72], während das Emissionsspektrum unverändert bei 510 nm bleibt. Anhand der Gleichung

$$R = \frac{f_{340}}{f_{380}} \quad (2.1)$$

$f_{340}$  = emittiertes Licht bei Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm

$f_{380}$  = emittiertes Licht bei Exzitation mit Licht der Wellenlänge 380 nm

lässt sich das relative Verhältnis (R) von an Calcium gebundenem Fura-2 zu freiem Fura-2 bestimmen. Da diese Bindung hochaffin ist, lässt sich so eine Aussage über den relativen zytosolischen Calciumgehalt einer Zelle treffen.

## **2.4.3 Vorbereitung der Zellen**

Nach Isolation (s. Kap. 2.3) der ventrikulären Kardiomyozyten wurden diese in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Für die Messung im IonOptix-System wurden die Zellen in mit Laminin beschichteten Kammern ausgesät, damit die Zellen am Boden der Kammer haften konnten. Dazu wurden 50 µL Laminin (1 mg/mL, Sigma) in 3 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf acht Kammern aufgeteilt. Die Zellen wurden im Medium M199 (Sigma) auf 40 000/mL verdünnt. Anschließend wurden 500 µL dieser Zellsuspension (entsprechend 20 000 Zellen) in jede Kammer gegeben und die Kammern zwei Stunden lang in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Zellüberstandes wurden 500 µL Fura-2

AM (2  $\mu\text{M}$  in HBBS) pro Zellkammer appliziert. Nach 15 Minuten erfolgte ein erster Waschschrift mit reinem HBBS, gefolgt von einem weiteren nach 30 Minuten.

#### 2.4.4 Experimenteller Ablauf

Nach Befestigung der mit Kardiomyozyten beladenen Kammer auf dem Tisch des Mikroskopes wurden zwei mit dem MyoPacer verbundene Stimulationselektroden in die Kammer eingebracht. Der Tisch wurde über eine Heizplatte auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt, um möglichst körperähnliche Bedingungen für die Kardiomyozyten zu schaffen. Pro Zellkammer wurde jeweils eine Zelle zur Untersuchung ausgewählt, welche folgende Kriterien erfüllte:

- keine Spontankontraktionen, jedoch regelmäßige Kontraktion unter Stimulation
- rechteckige Form ohne aufgetriebene Enden, klar erkennbare Querstreifung
- frei liegend

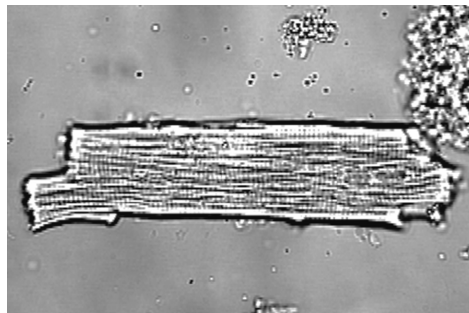


Abbildung 2.3: Exemplarische Zelle während der Messung im IonOptix-System. Querstreifung und rechteckige Enden sind gut erkennbar.

Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch eine Zelle während der Messung. Nach Auswahl einer Zelle wurden die Kamera auf diese fokussiert, die Blende eingestellt und mithilfe der *Soft Edge Detection*-Funktion der Software die Begrenzungen des Kardiomyozyten markiert. Die Zelle wurde mit 20 mV bei 1 Hz stimuliert. Nach einer Minute durchgehender Stimulation wurden über 30 Sekunden die Kontraktionen aufgezeichnet und als *Basalwert* verwendet. Anschließend wurde Isoprenalin in einer Konzentration von 100 nM in die Badlösung gegeben. Nach Erreichen eines *steady states*<sup>3</sup> wurden weitere 60 Sekunden gemessen und die resultierenden Werte als *Stimulationswert* verwendet.

<sup>3</sup>Der *steady state* wurde definiert als Sistieren der Zunahme der maximalen Verkürzung.

## 2.4.5 Datengewinnung

Mithilfe der *IonWizard*-Software lassen sich die Änderungen von Länge und Calciumgehalt einer Zelle während der Kontraktion in Echtzeit beobachten und graphisch darstellen. Des Weiteren ermöglicht die Software eine Offline-Analyse des Kontraktionsvorganges: Dazu ermittelt die Software aus dem Signal der Kamera Längen- und Fluoreszenztransienten, welche anhand mathematischer Algorithmen in unterschiedliche Abschnitte zerlegt werden. Auf diese Weise lassen sich die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Parameter ableiten.

Die *time to peak x%* gibt die Zeit an, die bis zum Erreichen von  $x\%$  des Kontraktionsmaximums benötigt wird. Sie ist ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit der Zelle. Die *time to baseline x%* gibt die Zeit an, die nach dem Erreichen des Kontraktionsmaximums benötigt wird, um zu  $x\%$  der Ausgangslänge zurückzukehren. Sie ist also ein Maß für die Relaxationsfähigkeit bzw. für die Elastizität einer Zelle.

Für jeden einzelnen Kontraktionsvorgang wurden diese Werte von der Software berechnet. Anschließend wurde für jede untersuchte Zelle jeweils der Mittelwert aus 30 Kontraktionen für *baseline* und *Iso* gebildet und nach MS Excel exportiert. Diese Mittelwerte wurden in den beiden Gruppen Knockout (KO) und Wildtyp (WT) zusammengefasst und mit statistischen Methoden verglichen.

Tabelle 2.3: Parameter in der *IonWizard*-Software

Parameter	Einheit	Erklärung
peak h		Maximale Auslenkung des Transienten
length	[ $\mu\text{m}$ ]	Länge der Zelle in relaxiertem Zustand
t to peak $x\%$	[ms]	Zeit bis zum Erreichen von $x\%$ des Maximums
peak time	[ms]	Zeit bis zum Erreichen des Extremwerts
t to baseline $x\%$	[ms]	Zeit bis zum Erreichen von $x\%$ des Ausgangswertes
bl% peak h		Prozentuale Verkürzung

## 2.5 Whole-cell Voltage Clamp

Grundprinzip dieser Methode ist es, mit einer intrazellulär gelegenen Elektrode einen elektrischen Zugang zum Zytosol der zu untersuchenden Zelle zu schaffen, um anschließend entweder die über der Zellmembran liegende Spannung oder den über die Membran fließenden Strom zu messen.

Der Begriff Patch-Clamp bezeichnete ursprünglich die Messung von Strömen über ein der Zellmembran entrissenes Stück (den sog. *patch*). Er wird jedoch auch für intrazelluläre Messungen an intakten Zellen (*whole cell*) verwendet. Bei der *whole cell* Konfiguration lassen sich folgende Varianten unterscheiden: *voltage clamp* (Spannungsklemme) oder *current clamp* (Stromklemme). Bei der ersten Variante wird ein definiertes Potential an der Zellmembran angelegt und der resultierende Strom gemessen. Bei der anderen Variante erfolgt die Messung einer Spannungsänderung, die durch Applikation eines definierten Stromes hervorgerufen wird. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die *Whole-cell Voltage Clamp* Konfiguration der Patch-Clamp Technik angewandt.

### 2.5.1 Aufbau des Messstandes

Für die Experimente wurde in unserem Labor das Komplettsystem PatchPro-4000 der Firma Scientifica (UK) verwendet. Auf einem mit Druckluft schwingungsgedämpften Tisch war ein Objektisch (SlicePlatform) fest fixiert, auf welchem sich zwei Mikromanipulatoren (PatchStar) und die Objektschale befanden. Die Objektschale war mit einer Badlösung (s. unten) gefüllt, in die die frisch isolierten Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 2.3) überführt wurden. Zur Betrachtung der Zellen diente ein invertiertes Mikroskop (IX71, Olympus, D), welches sich auf einer beweglichen Plattform unter dem fixierten Objektisch befand. Diese Anordnung ermöglichte es, das Mikroskop und damit den betrachteten Bildausschnitt zu bewegen, ohne gleichzeitig die Position der Mikromanipulatoren in Bezug auf die Zellen zu verändern. Ein Mikromanipulator bewegte eine Headstage mit einem integrierten Pipettenhalter (CV-7B, Molecular Devices, CA, USA), der andere einen Mikrokatheter, durch den Pharmaka direkt an der untersuchten Zelle appliziert werden konnten. Die Mikromanipulatoren erlaubten über einen Joystick die exakte Positionierung von Pipette und Mikrokatheter im Bad mit einer Auflösung von 20 nm. Der Pipettenhalter bestand aus einem Gehäuse, in dessen Innerem ein chlorierter Silberdraht lag. Dieser Draht diente als Elektrode und wur-

de von der eingespannten Pipette umfasst. Die Spitze der Pipette war mit einer Intrazellulärlösung (s. unten) gefüllt, in die der Silberdraht eintauchte. Zum Ändern des Druckes innerhalb der Pipette war am Pipettenhalter ein Silikonschlauch angebracht, über den mittels eines Mundstückes ein positiver bzw. negativer Druck angelegt werden konnte. Alle oben beschriebenen Geräte befanden sich in einem Faradaykäfig und waren geerdet, um das elektrische Hintergrundrauschen so gering wie möglich zu halten.

## **Mikropipetten**

Zur Herstellung der Mikropipetten wurden Kapillaren aus Borsilikatglas (Hilgenberg, D) verwendet. Die Kapillaren wurden in einem vertikalen Pipettenzieher (PIP 6, Heka, D) durch eine zweistufige Erhitzung jeweils direkt vor Benutzung hergestellt. Nach Hitzepolierung der Pipettenspitzen in der *Microforge* (CPM-2, ALA Scientific Instruments, NY, USA) wurden die Pipetten mit Intrazellulärlösung befüllt und im Pipettenhalter befestigt. Bei Eintauchen in die Badlösung (s. unten) resultierten Pipettenwiderstände von 2–5 M $\Omega$ . Für die Patch Clamp Experimente wurden folgende Lösungen verwendet:

- **Intrazellulärlösung:** CsCl 130; EGTA 11; HEPES 20; Na<sub>2</sub>ATP 5; Na<sub>2</sub>GTP 0,4; Na<sub>2</sub>CP 5; CaCl<sub>2</sub> 4,87; MgCl<sub>2</sub> 2, pH 7,20 (CsOH)
- **Badlösung:** NaCl 117; CsCl 20; HEPES 10; CaCl<sub>2</sub> 2,0; MgCl<sub>2</sub> 1,8; Glucose 10, pH 7,40 (CsOH)

Die Headstage wurde über eine Software (*MultiClamp Commander*) am PC gesteuert. Die elektrischen Signale der Headstage wurden durch einen Verstärker (Multiclamp 700B) amplifiziert und nach Digitalisierung durch einem A/D-Wandler (Digidata 1440A) in Echtzeit mit einem PC mit der Software *Axon pClamp 10.1* aufgenommen. Diese Daten wurden anschließend offline analysiert und ausgewertet.

## **2.5.2 Experimenteller Ablauf**

Frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten (zur Isolation der Zellen siehe 2.3) wurden in die mit 1 mL Badlösung gefüllte Objektschale überführt. Es wurden nur Zellen zur Untersuchung ausgewählt, die folgenden Kriterien entsprachen:

- keine Spontankontraktionen im Bad

- rechteckige Form ohne aufgetriebene Enden, klar erkennbare Querstreifung
- frei liegend

Nach Auswahl einer geeigneten Zelle unter dem Mikroskop wurde eine frisch hergestellte Pipette aus Borsilikatglas mit Intrazellulärlösung befüllt und in der Headstage befestigt. Über den am Pipettenhalter befestigten Schlauch wurde nun ein leichter Überdruck in der Pipette erzeugt. Dies verhinderte, dass es beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung zu Verunreinigungen der Pipettenspitze kam, da bei Kontakt mit der Badlösung durch den Druck kontinuierlich Intrazellulärlösung aus der Spitze ausströmte. Über den Mikromanipulator wurde die Pipette in unmittelbare Nähe der Zelle positioniert. Anschließend wurde per Software der Fehlerstrom (*Hold*) genullt und die Pipette auf der Zellmembran aufgesetzt.

### **Zugang zum Intrazellulärraum**

Durch Ablassen des positiven Druckes über den mit der Pipette verbundenen Schlauch wurde eine sehr dichte Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran hergestellt, die zu einem extrem hohen elektrischen Widerstand, dem sog. *Gigaseal*, führte (da dieser im Bereich von  $10^9 - 10^{11} \Omega$  liegt, taufte Hamill, Neher und Sakmann diesen Vorgang 1981 Gigaseal [73]). Anschließend wurde durch leichten Unterdruck oder durch Applikation eines elektrischen Impulses (*Zap*) über die Software ein kleines Membranstück aus der Zellmembran herausgerissen und somit ein Zugang zum Intrazellulärraum geschaffen. Das Einreißen des Patches ließ sich über die Software gut verfolgen: Bei Applikation eines Testpulses (10 mV für 20 ms) waren zunächst keine Transienten sichtbar, solange die Zellmembran noch intakt war. Da die Zellmembran als Kondensator wirkte, sobald der Patch riss und ein Zugang zum Zytosol bestand, wurden ab diesem Moment Kapazitätstransienten sichtbar.

### **Software**

Die Software *pClamp* (Version 10, Molecular Devices, Ca, USA) ist ein speziell für Patch-Clamp Experimente entwickeltes Programm. Es besteht aus den Teilen *Clampex* (für die Datenaufnahme) und *Clampfit* (für die Datenanalyse). *Clampex* berechnet anhand der Antwort der Zellmembran auf einen Puls von 10 mV mehrere Werte automatisch, die in Tabelle 2.4 aufgeführt sind.



Die Membrankapazität  $C_m$  ist proportional zur Größe der Zellmembran und daher ein geeigneter Parameter zur Messung der Zellgröße. Der Membranwiderstand  $R_m$  sollte vor Zerreißen des Patches in der Größenordnung von  $10^9 - 10^{11} \Omega$  liegen, damit die anderen Messwerte nicht falsch niedrig sind (vgl. hierzu Hamill *et al.* [73]). Der Zugangswiderstand  $R_a$  und die Zeitkonstante  $\tau$  sind proportional zueinander und beschreiben die Güte des Zugangs zum Zytosol (d.h. je kleiner  $\tau$  und  $R_a$ , desto besser der Zugang). Der Fehlerstrom *Hold* ist umgekehrt proportional zum Membranwiderstand vor Zerreißen des Patches und eignet sich zur Kontrolle der Güte des Seals.

Tabelle 2.4: **Parameter im Programm *Clampex***

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Erklärung</b>
$C_m$	[pF]	Membrankapazität
$R_m$	[G $\Omega$ ]	Membranwiderstand
$R_a$	[M $\Omega$ ]	Zugangswiderstand
$\tau$	[ $\mu$ s]	Zeitkonstante
Hold	[pA]	Fehlerstrom

## Pulsprotokolle

Ca<sup>2+</sup>-Ströme wurden bei Raumtemperatur (22 °C) mit zwei unterschiedlichen Spannungsprotokollen (siehe Abb. 2.4) evoziert: Protokoll A diente der Bestimmung von Strom-Spannungskurven. Mit Protokoll B wurde der maximale Strom bei 0 mV bestimmt. Dabei betrug der Membranwiderstand  $R_m$  vor Einreißen des Patches immer  $>1 \text{ G}\Omega$ . Der Zugangswiderstand  $R_a$  war immer  $<10 \text{ M}\Omega$  und wurde soweit wie möglich über die Software elektronisch kompensiert, ohne im resultierenden Signal Oszillationen auszulösen.

Bei Protokoll A erfolgte, ausgehend vom Ruhemembranpotential von  $-80 \text{ mV}$ , ein 50 ms langer Vorpuls auf  $-40 \text{ mV}$  zur Deaktivierung des schnellen Natriumkanals. Diesem folgten 300 ms lange, stufenweise ansteigende Pulse zwischen  $-50 \text{ mV}$  und  $70 \text{ mV}$  und ein 300 ms langer Puls bei  $0 \text{ mV}$ . Abschließend folgte ein Puls von 50 ms bei  $-80 \text{ mV}$  (siehe Abb. 2.4 A). Die Zykluslänge zwischen den Wiederholungen betrug 4 s. Bei Protokoll B erfolgte, ausgehend vom Ruhemembranpotential von  $-80 \text{ mV}$ , ein 50 ms langer Vorpuls auf  $-40 \text{ mV}$  zur Deaktivierung des schnellen Natriumkanals, gefolgt von einem 300 ms langen Puls bei

## Material und Methoden

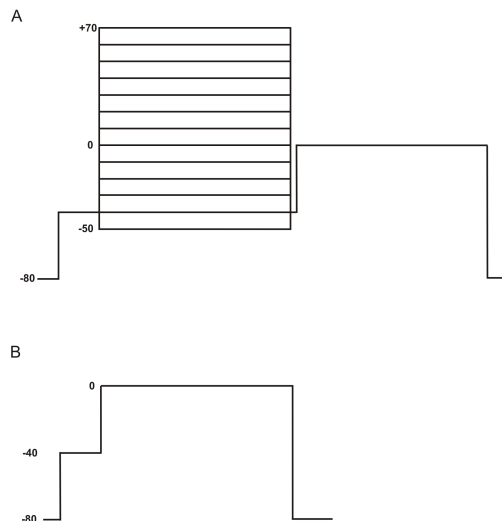


Abbildung 2.4: Pulsprotokolle der PatchClamp-Messungen.

A) Protokoll zur Bestimmung von Strom-Spannungskurven. B) Protokoll zur Bestimmung des maximalen Stromes bei 0 mV.

0 mV und einem abschließenden Puls von 50 ms bei  $-80$  mV (siehe Abb. 2.4 B). Die Zykluslänge zwischen den Wiederholungen betrug 4 s.

Pro Zelle wurden mit Protokoll B zwanzig Wiederholungen ausgeführt und anschließend eine Messung mit Protokoll A. Dann wurde über den Mikromanipulator Extrazellulärlösung direkt neben der zu messenden Zelle appliziert, die zusätzlich Isoproterenol in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  enthielt. Nach einer Äquilibrierungszeit von drei Minuten bei konstantem Fluss der Stimulationslösung wurden wiederum beide Pulsprotokolle angewendet, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme unter Einfluss von Isoproterenol zu evozieren.

### Datenanalyse

Die aufgezeichneten Ströme wurden nach Versuchsende offline im Programm *Clampfit* analysiert und ausgewertet. Mit Protokoll A gemessene Ströme wurden als Strom-Spannungskurven für jede Zelle individuell in *Clampfit* dargestellt und anschließend arithmetisch gemittelt. Zur Bestimmung der Inaktivierungszeiten  $\tau_{slow}$  und  $\tau_{fast}$  wurden die mit Protokoll B gemessenen Stromkurven zunächst für jede Zelle separat arithmetisch gemittelt. Anschließend wurde der resultierende Graph durch Anwendung der Gleichung

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C \quad (2.2)$$

mit der Chebyshev-Methode an eine Exponentialfunktion angepasst. Danach wurden die Werte für  $\tau_{slow}$  und  $\tau_{fast}$  pro Gruppe arithmetisch gemittelt.

Durch den Einsatz von Caesium anstelle von Kalium in Intra- und Extrazellulärlösung gelang die Isolation von  $Ca^{2+}$ -Strömen, ohne dass potentiell störende Kaliumkanäle aktiviert wurden. Die resultierenden Kurven aus Protokoll B wurden jeweils pro Zelle vor der weiteren Analyse arithmetisch gemittelt.

## **2.6 Echokardiographie**

In Zusammenarbeit mit der Core Facility des MDC wurden transthorakale Echokardiographien an den Tieren durchgeführt. Dafür wurde das Vevo 2100 System (Visual Sonics) verwendet. Die Tiere wurden mit 1,5 % Isofluran anästhesiert. Das Fell der ventralen Thoraxwand wurde entfernt und das Tier auf einer Wärmeplattform fixiert. Mit einer 30 MHz Sonde (MS400 transducer) wurden mittels M- und B-Mode Wanddicken, fractional shortening (FS) und Ejektionsfraktion (EF) bestimmt.

## **2.7 Molekularbiologie**

### **2.7.1 Calcineurinaktivität**

Zur Messung der Calcineurin-Aktivität wurde das kommerzielle *Calcineurin Cellular Activity Assay Kit* (Enzo Life Sciences GmbH, USA) verwendet und den Herstellerangaben entsprechend benutzt. Mit dem Kit lässt sich die Phosphataseaktivität von Calcineurin in einem isolierten Gewebe colorimetrisch bestimmen.

Für diese Arbeit wurde myokardiales Gewebe aus 3 Monate und 12 Monate alten WT- und KO-Tieren benutzt, deren Herz nach terminaler Analgosedierung exzidiert worden war. Das Gewebe wurde mit einem Puffer lysiert. Überschüssige Phosphatasen und Nukleotide im Gewebe wurden über eine Entsalzungssäule entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Gewebes mit Phosphopeptiden. In einem Platerader wurde die Phosphatfreisetzung in nmol aus dem Gewebelysat bei einer Wellenlänge von 600 nm in mehreren unterschiedli-

chen Ansätzen quantifiziert: Zunächst wurde die gesamte Phosphataseaktivität und anschließend die Calcium-unabhängige Phosphataseaktivität durch Quantifizierung des freiwerdenden Phosphats ( $\text{PO}_4$ ) bestimmt. Dies gelang durch Substratzug (mittels EGTA) oder spezifische Inhibition (mit Okadasäure). Durch Subtraktion der beiden Werte wurde die verbleibende Phosphataseaktivität ermittelt, die der Calcineurinaktivität entspricht.

## **2.7.2 Proteinexpression von CamKII $\delta$**

Die Experimente wurden nach einem etablierten Protokoll von einer technischen Assistentin der AG Röpke durchgeführt (vgl. Protokoll von Cheng *et al.* [74]). Myokardiales Gewebe aus drei Monate alten WT- und KO-Tieren, deren Herz nach terminaler Analgesedierung exzidiert worden war, wurde mit einem Puffer lysiert. Je 30  $\mu\text{g}$  Herzlysat pro Tier wurden auf ein Acrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Blockung wurde die Membran mit einem monoklonalen CaMKII $\delta$ -Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) in der Verdünnung 1:100 über Nacht inkubiert. Die quantitative densitometrische Analyse erfolgte nach Visualisierung mit einem Infrarot-Imager (LI-COR Imager, Odyssey, USA) mittels der zugehörigen Odyssey infrared imaging software.

## **2.8 Laborparameter im Serum**

### **2.8.1 Schilddrüsenhormone**

Zur Untersuchung der Schilddrüsenfunktion wurden TSH,  $\text{fT}_3$  und  $\text{fT}_4$  im Blut von zwölf Monate alten Mäusen untersucht. Dazu wurde den Tieren Blut entnommen. Durch Abzentrifugation der Erythrozyten wurde Serum gewonnen, welches schockgefroren und zur Firma Labor 28 geschickt wurde. Dort wurden mittels Electrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) am *cobas e Module*<sup>®</sup> der Firma Roche TSH,  $\text{fT}_3$  und  $\text{fT}_4$  im Serum bestimmt.

### **2.8.2 Endokrine Pankreasfunktion**

Zur Untersuchung der endokrinen Pankreasfunktion wurde das C-Peptid im Blut von jungen Mäusen (3-6 Monate alt) untersucht. Dazu wurde den Tieren Blut entnommen. Durch Abzentrifugation der Erythrozyten wurde Serum gewonnen, welches schockgefroren und zur

Firma Laboklin geschickt wurde. Dort wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Konzentration von C-Peptid im Serum bestimmt.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden unter Zuhilfenahme von Computerprogrammen analysiert: Die erste Reduktion und Auswertung der Daten erfolgte im zum jeweiligen Versuch gehörenden Programm (*ISOHEART*, *IonWizard* und *pClamp* bzw. *Clampfit*). Anschließend wurden Mittelwerte nach MS Excel exportiert und im selben Programm sowie mithilfe des Statistikprogramms *Prism* (GraphPad Software, Inc., CA, USA) statistisch ausgewertet. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test und bei Vorliegen von mehr als zwei Gruppen One-way-ANOVA angewendet. Zur Analyse des Langzeitüberlebens wurde der Kaplan-Meier-Schätzer mit dem Log-rank Test verwendet. p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Ergebnisse sind als arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler (*SEM*, *Standard Error of Mean*) dargestellt, soweit nicht anders angegeben. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm *Prism* verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 KCNE2-Deletion führt zu einer erhöhten Mortalität

In unserer Tierzucht ließ sich beobachten, dass einige Tiere früher starben als andere. Diese Tiere wurden ohne äußerliche Verletzungen oder Spuren eines Kampfes mit anderen Tieren tot im Käfig gefunden. Eine genauere Analyse der genotypspezifischen Todeszahlen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven: KO-Tiere starben signifikant häufiger als die Tiere der Kontrollgruppe ( $p=0,03$ ).

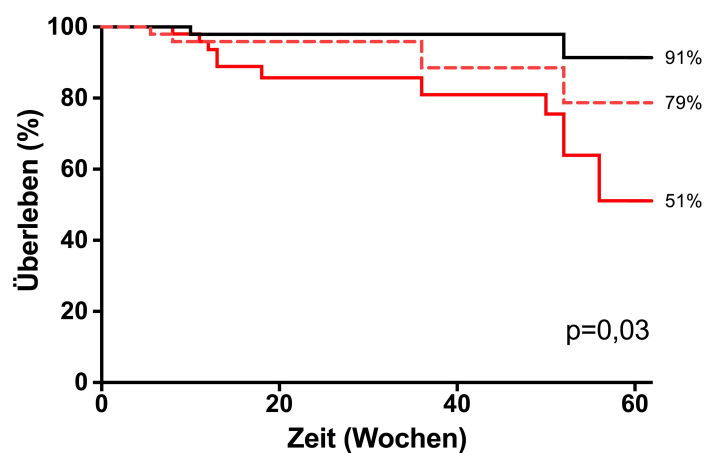


Abbildung 3.1: Kaplan-Meier Kurve für das Langzeitüberleben.

$kcne2^{-/-}$ -Tiere starben in unserer eigenen Zucht signifikant häufiger als Heterozygote oder Wildtyp-tiere im Beobachtungszeitraum von 14 Monaten (Log-rank Test,  $p=0,03$ ).  $n=52$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=50$  ( $kcne2^{+/-}$ ),  $n=52$  ( $kcne2^{-/-}$ ), schwarz= $kcne2^{+/+}$ , rot-gestrichelt= $kcne2^{+/-}$ , rot= $kcne2^{-/-}$ .

### 3.2 Deletion von KCNE2 führt zu einer verminderten systolischen Funktion im isolierten Herz

Im Langendorff-Versuch wurde die Kontraktion isolierter Herzen aus  $kcne2^{-/-}$ -Tieren im Vergleich mit Wildtypherzen untersucht. Insgesamt wurden 10 WT-Tiere und 6 KO-Tiere untersucht. Bei Thoraxeröffnung und Entnahme der Herzen für die weiteren Versuche fiel eine deutliche Vergrößerung der Organe der  $kcne2^{-/-}$ -Tiere auf: Abb. 3.2A veranschaulicht exemplarisch die unterschiedliche Herzgröße im WT und KO. Im Rahmen der Langendorff-Versuche aufgezeichnete EKGs zeigten eine signifikante Verlängerung der QT-Zeit im KO ( $p<0,05$ ; s. Abb. 3.2B). Während der Untersuchung eines KO-Herzens im Langendorff-Ver-

## Ergebnisse

sich kam es unter Stimulation bei 500 bpm zu einer spontanen Episode einer Torsade-de-pointes Tachykardie, die spontan terminierte (s. Abb. 3.2C).

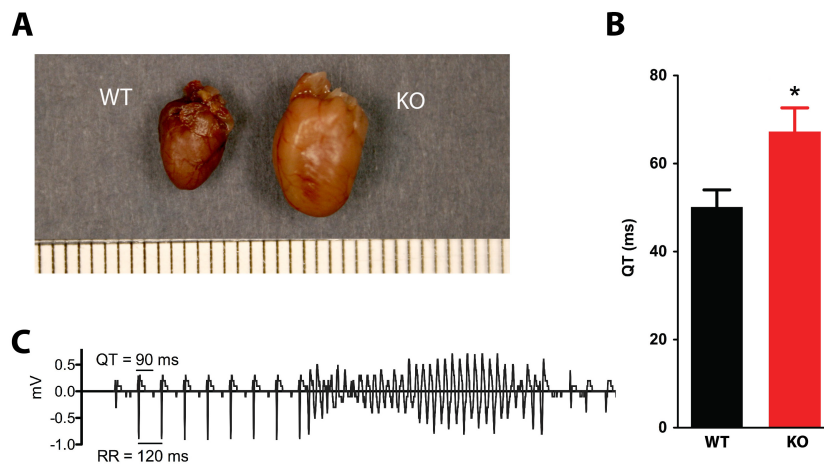


Abbildung 3.2: Phänotyp eines spontanen Herztodes in 12 Monate alten *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren. A) Herzen aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren waren vergrößert (Skala: 1 mm). B) EKG-Auswertungen zeigten eine verlängerte QT-Zeit in den Knockouttieren.  $n=8$ ,  $*p<0,05$ . C) Spontane Episode einer *Torsade-de-pointes* Tachykardie im Langendorff-Experiment.  $WT=kcne2^{+/+}$ ,  $KO=kcne2^{-/-}$ .

Der systolische linksventrikuläre Druck war in den KO-Tieren signifikant verringert: Herzen aus WT-Tieren erzeugten im Durchschnitt einen Druck von 65,6 mmHg, während jene aus der KO-Gruppe durchschnittlich 35,4 mmHg erreichten. Dies entsprach 53 % des Druckes im WT ( $p=0,001$ ; s. Abb. 3.3).

Auch die Maxima der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit waren im KO gegenüber dem WT verringert. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit entspricht der ersten Ableitung des Druckes über der Zeit in der Kontraktionsphase ( $dLVPdt_{max}$ ); die maximale Relaxationsgeschwindigkeit entspricht der ersten Ableitung des Druckes über der Zeit in der Entspannungsphase ( $dLVPdt_{min}$ ). In Herzen aus KO-Tieren betrug der basale  $dLVPdt_{max}$  1507 mmHg/s. Das entsprach einer statistisch signifikanten Reduktion auf 54 % des Wertes im WT, der bei 2873 mmHg/s lag ( $p=0,01$ ; s. Abb. 3.4A). Auch der  $dLVPdt_{min}$  war mit  $-1017$  mmHg/s gegenüber dem Wert in den WT-Tieren ( $-2022$  mmHg/s) signifikant verringert ( $p=0,005$ ; s. Abb. 3.4B).

Die Durchblutung der Koronararterien unterschied sich nicht in den beiden Gruppen, wie Abbildung 3.3B zu entnehmen ist. Im WT betrug der gemessene Koronarfluss 2,55 mL/min, im KO 2,53 mL/min.

## Ergebnisse

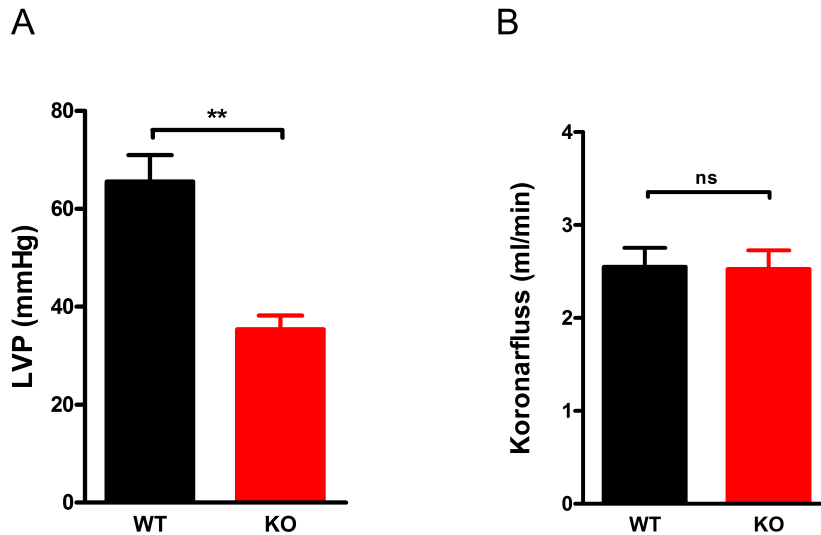


Abbildung 3.3: Systolischer LV-Druck und Koronarperfusion in isolierten Herzen.

A) Herzen aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten eine verschlechterte Pumpfunktion. Im Langendorff-Versuch gemessene basale systolische linksventrikuläre Drücke bei isovolumetrischer Kontraktion unterschieden sich signifikant in beiden Gruppen. B) Die gemessene Perfusion der Koronargefäße unterschied sich nicht zwischen Herzen aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren und der Kontrollgruppe. *ns*=nicht signifikant.

*LVP*: linksventrikulärer Druck. *\*\*p*<0,01. *n*=10 (*kcne2*<sup>+/+</sup>), *n*=6 (*kcne2*<sup>-/-</sup>), schwarz=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rot=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

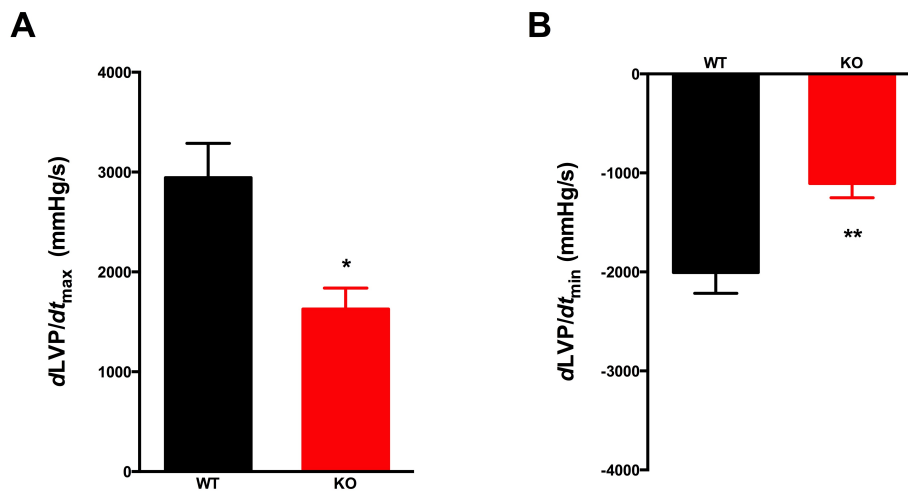


Abbildung 3.4: Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in isolierten Herzen.

Signifikant verlangsamte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in Herzen aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren. A) Kontraktionsgeschwindigkeit. B) Relaxationsgeschwindigkeit. *dLVPdt<sub>max/min</sub>*: Maximaler/minimaler Wert der ersten Ableitung des LVP nach der Zeit. *\*p*<0,05; *\*\*p*<0,01. *n*=10 (*kcne2*<sup>+/+</sup>), *n*=6 (*kcne2*<sup>-/-</sup>), schwarze Balken=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Balken=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel ± Standardfehler.



### 3.2.1 Systolische Funktion unter Stimulation mit Isoprenalin

Im zweiten Teil dieses Versuches wurden die Herzen nach Stimulation mit Isoprenalin untersucht. Auch hierbei zeigten sich Differenzen zwischen Wildtyp und Knockout, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p=0,10$ ): Der durchschnittliche Druck unter Isoprenalinstimulation betrug im WT 153,1 mmHg und im KO 87,5 mmHg (s. Abb. 3.5A).

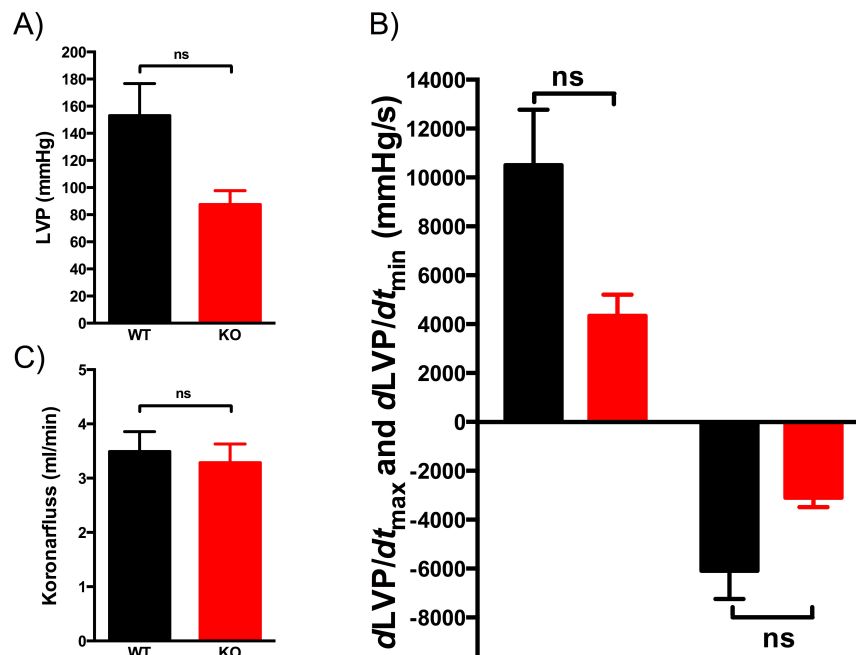


Abbildung 3.5: Isolierte Herzen im Langendorff-Versuch unter  $\beta$ -Stimulation.

Es zeigten sich Unterschiede in Herzen aus  $kcne2^{-/-}$ -Tieren und  $kcne2^{+/+}$ -Tieren bei Stimulation mit 100 nmol Isoprenalin, jedoch ohne statistische Signifikanz. A) Systolischer linksventrikulärer Druck. B) Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten. C) Koronarfluss. *LVP*: systolischer linksventrikulärer Druck.  $dLVPdt_{max/min}$ : Maximaler/minimaler Wert der ersten Ableitung des LVP nach der Zeit.  $n=6$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=3$  ( $kcne2^{-/-}$ ), schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , rote Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler.

Auch die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten unterschieden sich unter Einfluss des  $\beta$ -Stimulators voneinander, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p=0,11$  bzw.  $p=0,12$ ): Im WT betragen die Kontraktionsgeschwindigkeit  $dLVPdt_{max}$  10 503 mmHg/s und die Relaxationsgeschwindigkeit  $dLVPdt_{min}$  -6093 mmHg/s, im KO waren es 4335 mmHg/s bzw. -3103 mmHg/s (vgl. Abb. 3.5B).

Die Koronarperfusion war in in beiden Gruppen auch unter Stimulation annähernd gleich groß (3,49 mL/min im WT und 3,29 mL/min im KO,  $p=0,73$ ; vgl. dazu Abb. 3.5C).

### 3.3 Kontraktion und Calciumgradienten im IonOptix-System

Die Kontraktionseigenschaften isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten wurden mit dem IonOptix-System untersucht. Im ersten Versuchsschritt erfolgte die Messung der basalen Kontraktions- und Relaxationszeiten sowie des intrazellulären Calciums während mehrerer Kontraktionsvorgänge. Danach wurden die Zellen mit Isoprenalin stimuliert und die Messungen unter dieser Stimulation wiederholt.

#### 3.3.1 Kontraktion isolierter Kardiomyozyten

Insgesamt wurden für die basalen Kontraktionsmessungen 63 Zellen aus acht KO-Tieren und 39 Zellen aus zehn WT-Tieren untersucht. Ein Vergleich der basalen Zelllänge ergab keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p=0,95$ ; siehe Abb. 3.6A).

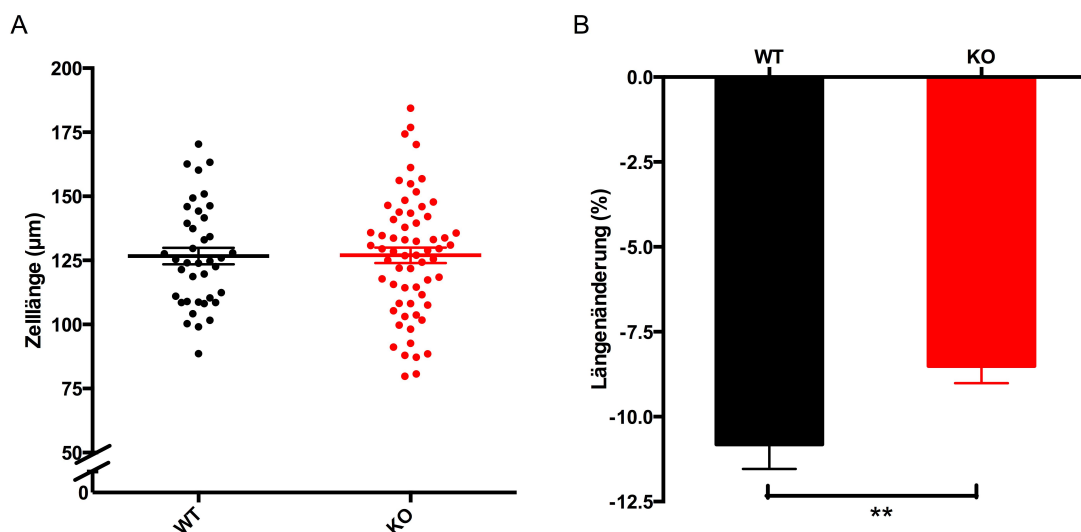


Abbildung 3.6: Länge und prozentuale Verkürzung isolierter Kardiomyozyten.

Myozyten von *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten bei gleicher Ausgangslänge eine verschlechterte Kontraktilität. A) Im *IonOptix*-Versuch gemessene Zelllängen unterschieden sich nicht in beiden Gruppen ( $p=0,95$ ). B) Prozentuale Verkürzung während des Kontraktionsvorganges. *Kcne2*<sup>-/-</sup>-Myozyten zeigten eine signifikant verringerte maximale Verkürzungsfähigkeit.  $**p<0,01$ .  $n=39$  (*kcne2*<sup>+/+</sup>),  $n=63$  (*kcne2*<sup>-/-</sup>) Zellen pro Gruppe, schwarze Symbole=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Symbole=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler.

Die Kontraktionsfähigkeit isolierter Zellen aus KO-Tieren war vermindert: Die Knockout-Zellen zeigten im Vergleich mit der WT-Gruppe eine signifikant schlechtere prozentuale Verkürzung während des Kontraktionsmaximums: Von ihrer Ausgangslänge verkürzten sie

## Ergebnisse

sich unter maximaler Kontraktion im Mittel um 8,5 %, während die WT-Zellen 10,8 % erreichten ( $p=0,009$ , siehe Abb. 3.6B).

Darüber hinaus zeigten Myozyten aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine veränderte Kontraktionskinetik: Der gesamte Kontraktions-Relaxations-Zyklus war verlängert, was vor allem auf eine signifikante Verlängerung der Relaxation der KO-Zellen gegenüber dem WT zurückzuführen war. Alle Werte für die *time to baseline* waren verlängert, wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist. Hochsignifikant verlangsamt war dabei vor allem die zweite Hälfte des Relaxationszyklus: Die *time to baseline* 90 % betrug im WT 194 ms, im KO dagegen 245 ms. Die KO-Zellen brauchten also 26 % länger ( $p<0,0001$ ) als die Zellen aus dem WT, um zu 90 % ihrer Ausgangslänge zurückzugelangen.

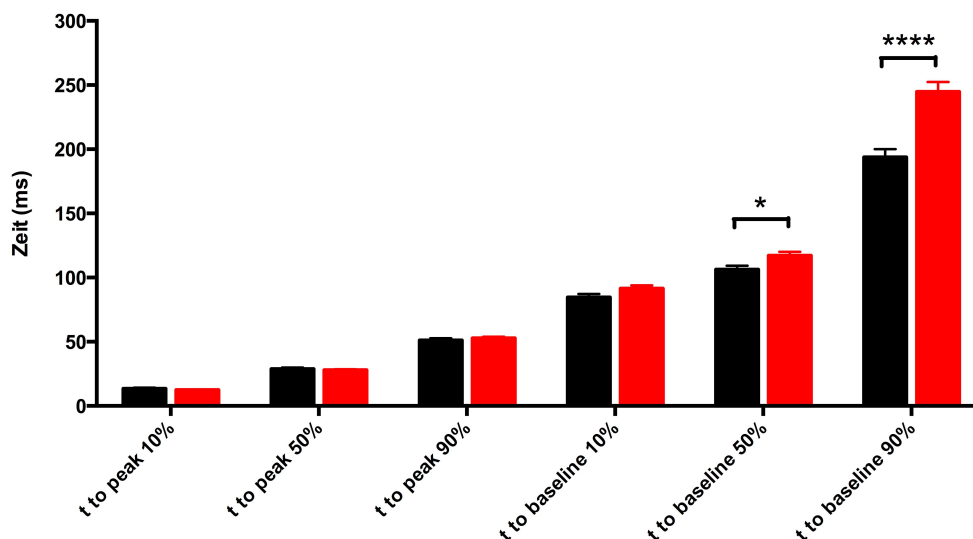


Abbildung 3.7: Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten.

Myozyten von *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten eine verlangsamt Relaxation. Myozyten aus KO-Tieren benötigten für die Relaxation hoch signifikant mehr Zeit.  $*p<0,05$ ,  $****p<0,0001$ .  $n=39$  (*kcne2*<sup>+/+</sup>),  $n=63$  (*kcne2*<sup>-/-</sup>) Zellen pro Gruppe, schwarze Symbole=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Symbole=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler.

### 3.3.2 Kontraktion unter Stimulation mit Isoprenalin

Die Stimulation mit Isoprenalin führte bei vielen untersuchten Zellen zu einem verfrühten Zelltod: Mehr als die Hälfte der auf diese Weise untersuchten Zellen starben während des Versuches, so dass für die Auswertung nur 7 Zellen in der WT-Gruppe und 20 in der KO-Gruppe zur Verfügung standen.

## Ergebnisse

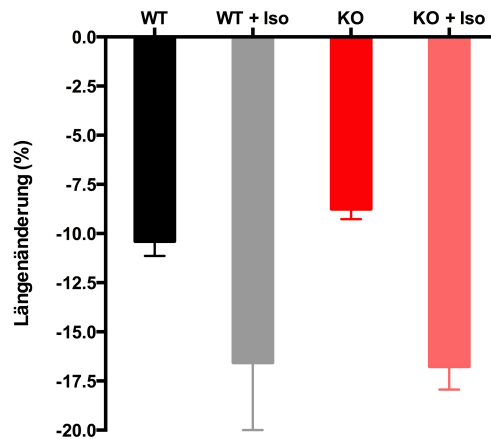


Abbildung 3.8: Prozentuale Verkürzung isolierter Kardiomyozyten unter  $\beta$  Stimulation.

Bei Stimulation mit 100nM Isoprenalin nahm die prozentuale Verkürzung zu.  $n=39$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=63$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen pro Gruppe basal,  $n=7$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=20$  ( $kcne2^{-/-}$ ) unter Stimulation, schwarz/grau= $kcne2^{+/+}$ , rote/hellrot= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Die Zellen beider Gruppen reagierten auf die Stimulation mit Isoprenalin mit einer Zunahme der prozentualen Verkürzung: Kardiomyozyten aus dem WT verkürzten sich unter Stimulation um 16,6 %, Zellen aus dem KO erreichten 16,8 % (siehe Abb. 3.8). Die Kontraktionszyklen von WT- und KO-Tieren unterschieden sich bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation signifikant: Hier waren wie schon bei den basalen Messungen die Zeiten für die zweite Hälfte der Relaxation (*time to baseline 50 % und 90 %*) im KO signifikant verlängert.

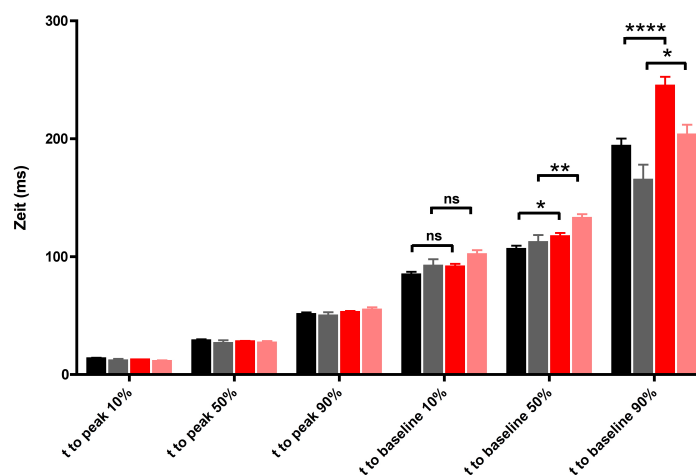


Abbildung 3.9: Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten unter  $\beta$ -Stimulation.

Bei Stimulation mit 100nM Isoprenalin bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen in der Relaxationsphase. *ns*=nicht signifikant, \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ .  $n=39$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=63$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen pro Gruppe basal,  $n=7$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=20$  ( $kcne2^{-/-}$ ) unter Stimulation, schwarz/grau= $kcne2^{+/+}$ , rote/hellrot= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Des Weiteren veränderte sich die Relaxationsphase im WT und im KO unter Stimulation gleichartig: In beiden Gruppen führte die Isoprenalinstimulation gegenüber den basalen Messungen zu einer verlängerten *time to baseline* 50 % und zu einer verkürzten *time to baseline* 90 % (siehe Abb. 3.9). Die signifikanten Unterschiede zwischen KO- und WT-Zellen blieben dabei bestehen.

### 3.3.3 Calciumgradienten in isolierten Kardiomyozyten

Für die Messungen des zytosolischen Calciums während der Kontraktion wurden 37 Zellen aus zehn WT-Tieren und 58 Zellen aus acht KO-Tieren untersucht. Anschließend wurden analog zum Kontraktionsversuch aus den gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten Zeiten für unterschiedliche Abschnitte des Kontraktions- und Relaxationszyklus bestimmt (*time to peak*, *time to baseline*).

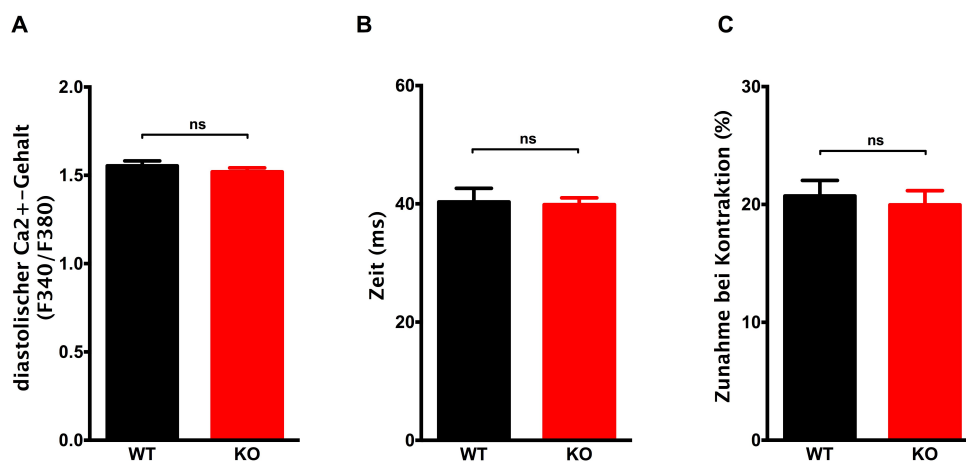


Abbildung 3.10: Intrazelluläres Calcium in isolierten Kardiomyozyten.

Eine Veränderung des zytosolischen Calciums ließ sich nicht beobachten. A) Der diastolische Calciumgehalt war in Zellen aus WT- und KO-Tieren gleich groß ( $p=0,35$ ). B) Weder die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Calciumkonzentration ( $p=0,85$ ) noch C) die prozentuale Zunahme der Calciumkonzentration ( $p=0,68$ ) bei Kontraktion unterschieden sich. *ns*=nicht signifikant,  $n=37$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=58$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen pro Gruppe, schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Der relative diastolische Calciumgehalt, dargestellt als  $R = \frac{F_{340}}{F_{380}}$  (s. Kapitel 2.4.2), betrug im Wildtyp (WT) 1,55 und im Knockout (KO) 1,52; die beiden Gruppen zeigten keinen wesentlichen Unterschied ( $p=0,35$ ; s. Abb 3.10A). Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration ist in Abb. 3.10B dargestellt. In beiden Gruppen war die maximale Calciumkonzentration nach rund 40 ms erreicht und unterschied sich somit

## Ergebnisse

nicht ( $p=0,84$ ). Dabei war auch die prozentuale Zunahme des Calciumgehalts der Zellen während der Kontraktion in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich: Im WT nahm die Calciumkonzentration um 20,7 % zu, im KO um 20,0 % ( $p=0,68$ ; s. Abb. 3.10C).

Sowohl die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Calciumkonzentration unter Kontraktion als auch die Rückkehr zum Ausgangswert in der Relaxationsphase unterschieden sich nicht signifikant zwischen Zellen aus KO- und WT-Tieren (s. Abb. 3.11). Jedoch fiel eine nicht signifikante Verlängerung der *time to baseline* 50 % im KO gegenüber dem WT auf ( $p=0,13$ ).

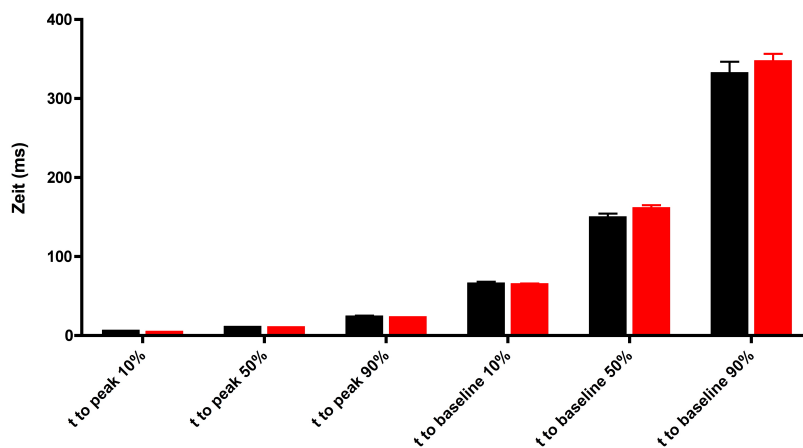


Abbildung 3.11: Time to peak/baseline der Calcium-Transienten.

Die Zeiten für den Calciumgehalt in Myozyten aus *kcne2<sup>-/-</sup>*-Mäusen unterschieden sich nicht signifikant von denen der Vergleichsgruppe.  $n=37$  (*kcne2<sup>+/+</sup>*),  $n=58$  (*kcne2<sup>-/-</sup>*) Zellen pro Gruppe, schwarze Balken=*kcne2<sup>+/+</sup>*, Balken=*kcne2<sup>-/-</sup>*; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

### 3.3.4 Calciumgradienten unter Stimulation mit Isoprenalin

Bei Stimulation mit Isoprenalin ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ermittelten Zeiten bei Kontraktion und Relaxation der WT- und KO-Zellen beobachten. In beiden Gruppen führte die Stimulation mit Isoprenalin zu einer Verkürzung der Relaxationsphase gegenüber der basalen Messung in der jeweiligen Gruppe (s. Abb 3.12).

## Ergebnisse

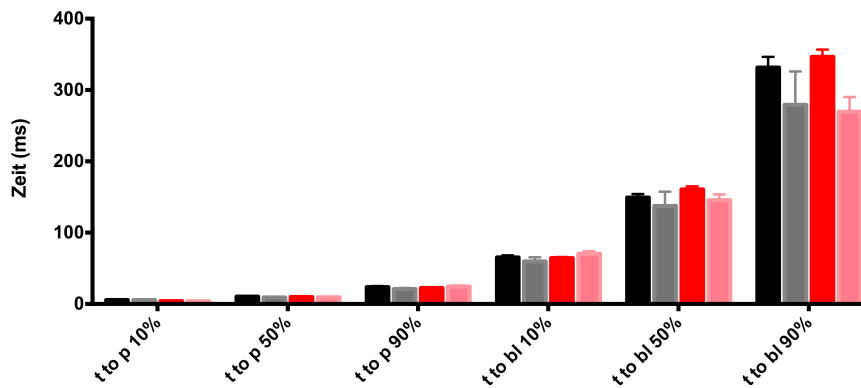


Abbildung 3.12: Time to peak/baseline isolierter Kardiomyozyten basal und unter  $\beta$ -Stimulation.

Bei Stimulation mit 100nM Isoprenalin zeigte sich kein signifikanter Unterschied der *time to peak* oder der *time to baseline* zwischen den beiden Genotypen.  $n=37$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=57$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen pro Gruppe basal,  $n=7$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=20$  ( $kcne2^{-/-}$ ) unter Stimulation, schwarze Symbole= $kcne2^{+/+}$ , graue Symbole= $kcne2^{+/+}$ +100nM Isoprenalin, rote Symbole= $kcne2^{-/-}$ , hellrote Symbole= $kcne2^{-/-}$ +100nM Isoprenalin; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

### 3.4 Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen

#### 3.4.1 Calciumströme (LTCC) in Kardiomyozyten junger Tiere

Für die Bestimmung der Strom-Spannungskurven in den Patch-Clamp-Experimenten wurden insgesamt 10 Zellen aus Wildtyp-Tieren und 9 Zellen aus Knockout-Tieren mithilfe des Pulsprotokolls A untersucht und nach oben beschriebener Datenreduktion in die Auswertung aufgenommen. Bei 7 WT- und 5 KO-Zellen wurde zusätzlich eine Stimulation mit Isoprenalin durchgeführt. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Zellisolation 3–6 Monate alt. Abbildung 3.13 zeigt die resultierende Strom-Spannungskurve für den Calciumkanal.

Isolierte Kardiomyozyten aus  $kcne2^{-/-}$ -Tieren zeigten einen größeren Calciumstrom über die Membran als die Zellen der Kontrollgruppe. Der Strom war bei Haltepotentialen zwischen 10 mV und 40 mV signifikant größer. Der maximale Stromfluss war in beiden Gruppen jeweils bei einem Haltepotential von 10 mV messbar: Im WT waren dies  $-5,96$  A/F und im KO  $-7,31$  A/F .

Unter Stimulation mit Isoprenalin reagierten die Knockoutzellen besser als die Vergleichsgruppe: In den KO-Zellen kam es bei einer Spannung von 10 mV zu einer Zunahme um 80 % (von  $-7,31$  A/F auf  $-13,18$  A/F). In den WT-Zellen waren es ca. 71 % (von  $-5,96$  A/F auf

## Ergebnisse

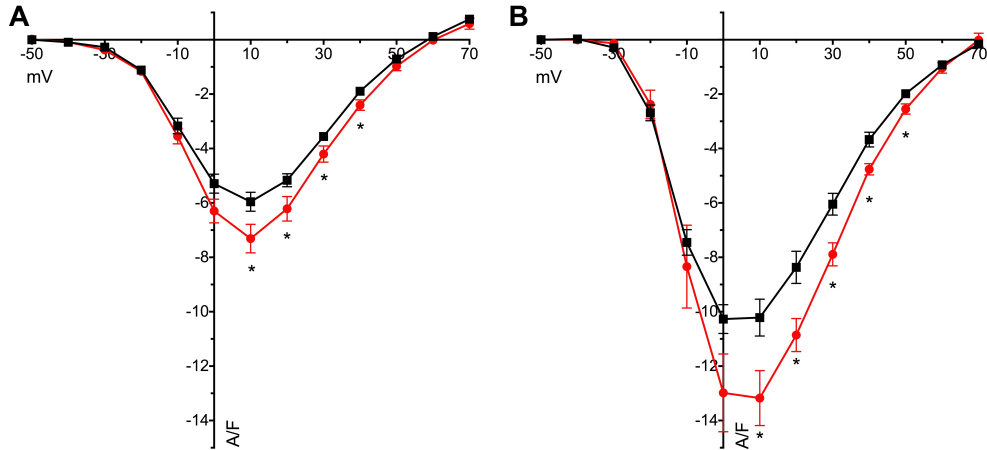


Abbildung 3.13: Vergrößerter Calciumstrom in isolierten Kardiomyozyten junger Tiere. Strom-Spannungskurven in isolierten Ventrikelmuskardzellen bei Whole-cell Voltage Clamp Experimenten. A) Zellen aus *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren zeigten eine signifikant vergrößerte Stromdichte bei Haltepotentialen zwischen 10 mV und 40 mV. B) Unter Stimulation mit 100 nM Isoprenalin vergrößerte sich der Strom um 80 % im KO und um 70 % im WT. \* $p < 0,05$ ;  $n = 10$  (*kcne2<sup>+/+</sup>*),  $n = 9$  (*kcne2<sup>-/-</sup>*) Zellen (A) bzw.  $n = 7$  (*kcne2<sup>+/+</sup>*),  $n = 5$  (*kcne2<sup>-/-</sup>*) (B) pro Gruppe, schwarz=*kcne2<sup>+/+</sup>*, rot=*kcne2<sup>-/-</sup>*; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

-10,22 A/F). Auch die Kinetik des Schaltverhaltens der Calciumkanäle war verändert, wie Abbildung 3.14 zu entnehmen ist. Die Inaktivierungszeit der Kanäle war im KO gegenüber dem WT signifikant verlängert: Der Wert für  $\tau_{fast}$  betrug 10,4 ms im KO gegenüber 8,7 ms im WT. Die  $\tau_{slow}$  verlängerte sich um knapp 7 ms von 72 ms im WT auf 87,3 ms. Diese Verlängerung war jedoch nicht statistisch signifikant.

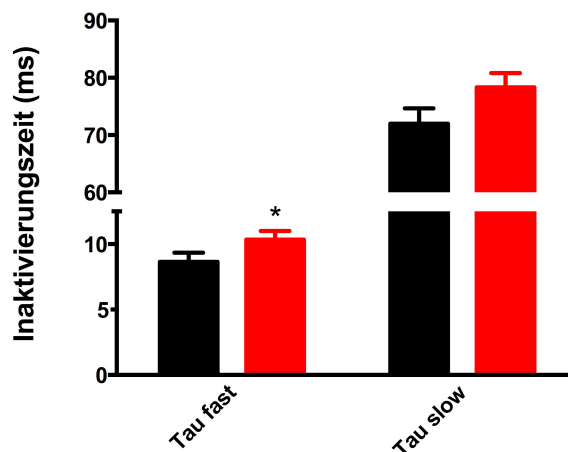


Abbildung 3.14: KCNE2-Deletion führte zu verlangsamer Inaktivierung. Inaktivierungszeiten in isolierten Ventrikelmuskardzellen bei Whole-cell Voltage Clamp Experimenten. Zellen aus *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren hatten eine signifikant verlangsamte  $\tau_{fast}$  im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Tieren. \* $p < 0,05$ ;  $n = 10$  (*kcne2<sup>+/+</sup>*),  $n = 9$  (*kcne2<sup>-/-</sup>*) Zellen pro Gruppe, schwarze Balken=*kcne2<sup>+/+</sup>*, rote Balken=*kcne2<sup>-/-</sup>*; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.



### 3.4.2 Calciumströme (LTCC) in Kardiomyozyten alter Tiere

Für die Bestimmung der Strom-Spannungskurven in den Patch-Clamp Experimenten wurden insgesamt 12 Zellen aus Wildtyp-Tieren und 16 Zellen aus Knockout-Tieren mithilfe des Pulsprotokolls A untersucht und nach oben beschriebener Datenreduktion in die Auswertung aufgenommen. Bei 11 (WT) bzw. 14 (KO) Zellen wurde zusätzlich eine Stimulation mit Isoprenalin durchgeführt. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme und anschließender Zellisolation 12–15 Monate alt. Abbildung 3.15 zeigt die resultierenden Strom-Spannungskurven für den Calciumkanal.

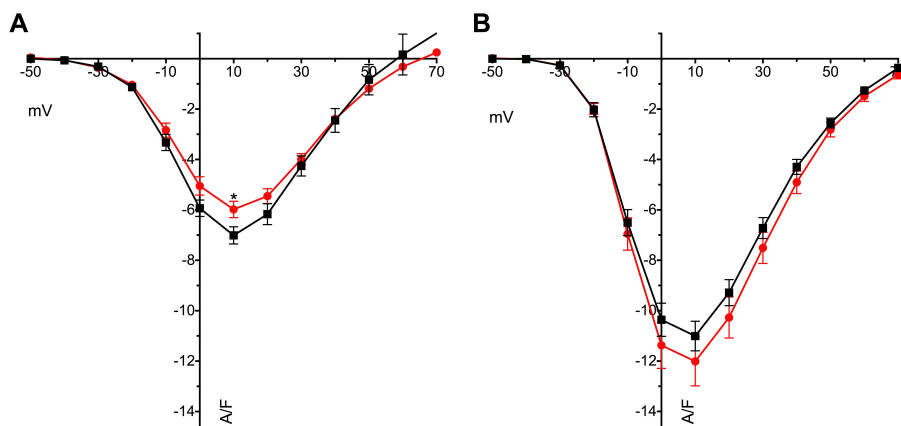


Abbildung 3.15: Verminderter Calciumstrom in isolierten Kardiomyozyten alter Tiere. Strom-Spannungskurven in isolierten Ventrikelmyokardzellen bei Whole-cell Voltage Clamp Experimenten. A) Zellen aus KO-Tieren hatten eine signifikant geringere Stromdichte bei einem Haltepotential von 10 mV. B) Unter Stimulation mit 100 nM Isoprenalin vergrößerte sich der Strom um ca. 100 % im KO und um ca. 60 % im WT.  $*p < 0,05$ ;  $n = 12$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n = 16$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen (A) bzw.  $n = 11$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n = 14$  ( $kcne2^{-/-}$ ) (B) pro Gruppe, schwarz =  $kcne2^{+/+}$ , rot =  $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Der Knockout von KCNE2 führte in isolierten Kardiomyocyten zu einem verminderten Strom über die Membran, der bei einem Haltepotential von 10 mV signifikant kleiner war. Unter Stimulation mit Isoprenalin reagierten die Knockoutzellen besser als die Zellen der Vergleichsgruppe. In der KO-Gruppe kam es bei einer Spannung von 10 mV zu einer Zunahme um ca. 100 % (–5,98 A/F zu –12,01 A/F), in der WT Gruppe waren es ca. 60 % (–7,01 A/F zu –11,01 A/F). Auch die Kinetik des Schaltverhaltens der Kanäle war verändert. Die Inaktivierungszeiten der Kanäle war in der KO-Gruppe gegenüber dem WT signifikant verlängert: Der Wert für  $\tau_{fast}$  war 10,84 ms im KO gegenüber 8,82 ms im WT. Dies entspricht einer Verlängerung der  $\tau_{fast}$  um 23 %. Die  $\tau_{slow}$  verlängerte sich um mehr als 10 ms von 96,37 s im WT auf 106,74 ms.

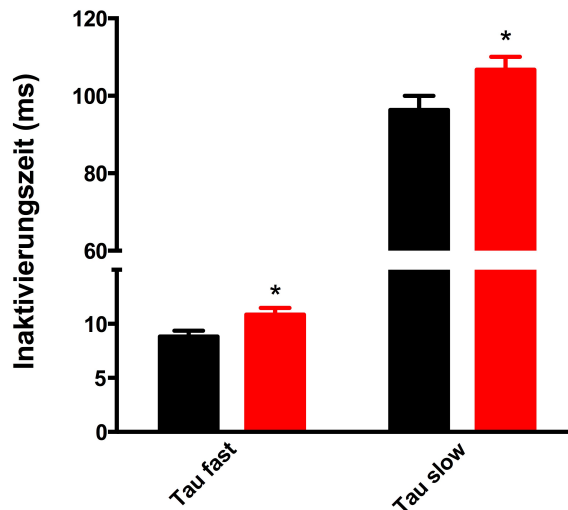


Abbildung 3.16: KCNE2-Deletion führte zu verlangsamer Inaktivierung.

Inaktivierungszeiten in isolierten Ventrikelsmyokardzellen bei Whole-cell Voltage Clamp Experimenten. Zellen aus  $kcne2^{-/-}$ -Tieren hatten eine signifikant verlangsamte  $\tau_{fast}$  und eine signifikant verlangsamte  $\tau_{slow}$  im Vergleich zu Zellen aus Wildtypen. \* $p < 0,05$ ;  $n=10$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=9$  ( $kcne2^{-/-}$ ) Zellen pro Gruppe, schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , rote Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

### 3.5 Echokardiographie

Um die bereits makroskopisch sichtbare Vergrößerung der Herzen der KO-Tiere genauer zu definieren sowie die im isolierten Herzen und in der Einzelzellmessung dokumentierte Kontraktionsschwäche *in vivo* zu messen, wurden mithilfe der transthorakalen Echokardiographie (TTE) die Herzen von fünf jeweils 9 Monate alten Tieren der WT- und der KO-Gruppe untersucht. Anschließend wurden an 12 Monate alten Tieren mittels TTE die Herzen von 23 Tieren pro Gruppe untersucht.

#### 3.5.1 Echokardiographie in 9 Monate alten Tieren

Im KO waren sowohl die Hinterwand des linken Ventrikels ( $p=0,009$ ) als auch das Septum in der Diastole ( $p=0,02$ ) signifikant dicker als im WT (s. Abb. 3.17A).

Der ventrikuläre Innendurchmesser war nicht signifikant verändert, es zeigte sich aber ein etwas größerer diastolischer und ein etwas geringerer systolischer Innendurchmesser des linken Ventrikels im KO gegenüber dem WT. Außerdem waren sowohl die linksventrikuläre Masse (LV Masse,  $p=0,006$ ) als auch der Quotient von LV Masse zu Körpergewicht ( $p=0,03$ ) im KO signifikant größer als im WT (s. Abb. 3.17C). Die Ejektionsfraktion und prozentuale systolische Verkürzungsfraction (im Folgenden FS genannt) waren in beiden Gruppen

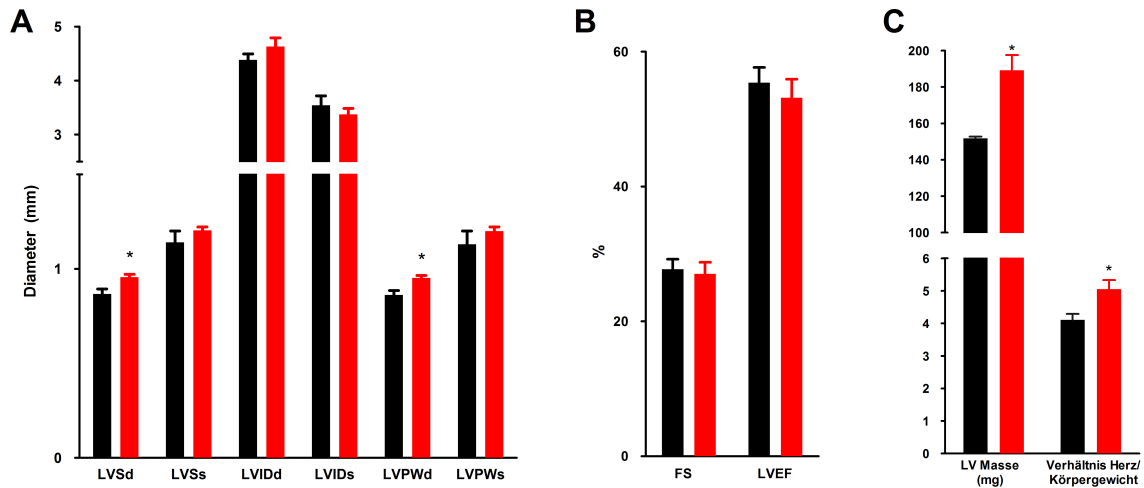


Abbildung 3.17: Transthorakale Echokardiographie 9 Monate alter Tiere.

A) Im KO ist eine signifikante Zunahme der Wanddicken (LVSd, LVPWs) zu beobachten. B) LVEF und FS sind in beiden Gruppen nahezu gleich groß. C) Die LV Masse und der Quotient aus LV Masse und Körpergewicht sind im KO signifikant vergrößert. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 4$  (*kcne2*<sup>+/+</sup>),  $n = 5$  (*kcne2*<sup>-/-</sup>), LVSd/s: Linksventrikuläres Septum, diastolisch/systolisch; LVIDd/s: linksventrikulärer Innendurchmesser, diastolisch/systolisch; LVPWd/s: Linksventrikulärer Hinterwanddurchmesser, diastolisch/systolisch; FS: fractional shortening; LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LV: Linker Ventrikel; schwarze Balken=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Balken=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

annähernd gleich groß (s. Abb. 3.17B).

### 3.5.2 Echokardiographie in 12 Monate alten Tieren

Hier zeigte sich ein im Vergleich mit den Ergebnissen aus den 9 Monate alten Tieren erheblich anderes Bild: Die Herzen aus den 12 Monate alten KO-Tieren zeigten eine exzentrische Dilatation. Die Wanddicken im KO waren im Alter von 12 Monaten verringert: Die linksventrikuläre posteriore Wand war sowohl in der Diastole ( $p = 0,03$ ) als auch in der Systole ( $p = 0,01$ ) im KO signifikant dünner als im WT. Der Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID) war über den gesamten Kontraktions-Relaxationszyklus hoch signifikant vergrößert ( $p < 0,001$ ); er nahm diastolisch und systolisch um mehr als 0,5 mm zu (s. Abb. 3.18A). Auch die diastolische Septumdicke war in den 12 Monate alten KO-Tieren signifikant kleiner als in den 9 Monate alten: Sie sank von 0,96 mm auf 0,83 mm ( $p = 0,01$ ).

Darüber hinaus ließen sich Zeichen der Herzinsuffizienz im KO beobachten: Sowohl die EF als auch das FS waren in den 12 Monate alten KO-Tieren signifikant niedriger als im WT. Die mittlere EF war im KO mit einem Wert von 50 % signifikant kleiner als diejenige im WT (57 %,  $p = 0,03$ ). Auch das FS verringerte sich von 29 % im WT auf 24,8 % im KO ( $p = 0,02$ ,

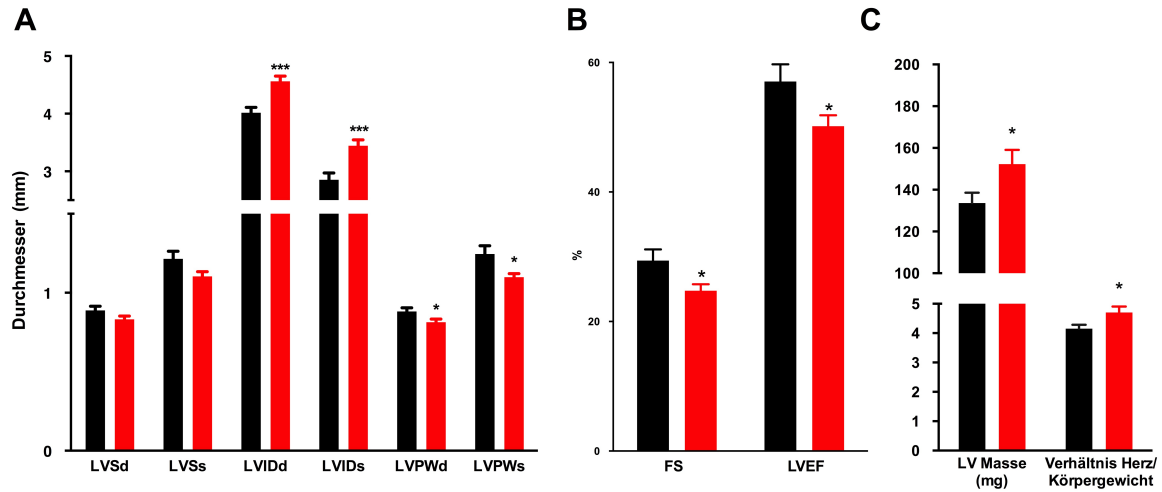


Abbildung 3.18: Transthorakale Echokardiographie 12 Monate alter Tiere.

A) Im KO waren Zeichen der Herzinsuffizienz erkennbar: Der ventrikuläre Innendurchmesser (LVID) war hochsignifikant vergrößert, während der Durchmesser der Hinterwand (LVPW) signifikant abnahm. B) Auch linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF) und prozentuale systolische Verkürzungsfraction (FS) waren im KO signifikant verringert. C) Die linksventrikuläre Masse und der Quotient aus LV Masse und Körpergewicht sind im KO signifikant vergrößert. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n=23$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=23$  ( $kcne2^{-/-}$ ), Abk. und Beschriftungen wie in Abb. 3.17.

s. Abb. 3.18B). Analog zu den 9 Monate alten Tieren waren sowohl die linksventrikuläre Masse (LV Masse) als auch der Quotient von LV Masse zu Körpergewicht im KO signifikant größer als im WT (s. Abb. 3.18C). Dies war jedoch nach 12 Monaten weniger stark ausgeprägt als nach 9 Monaten.

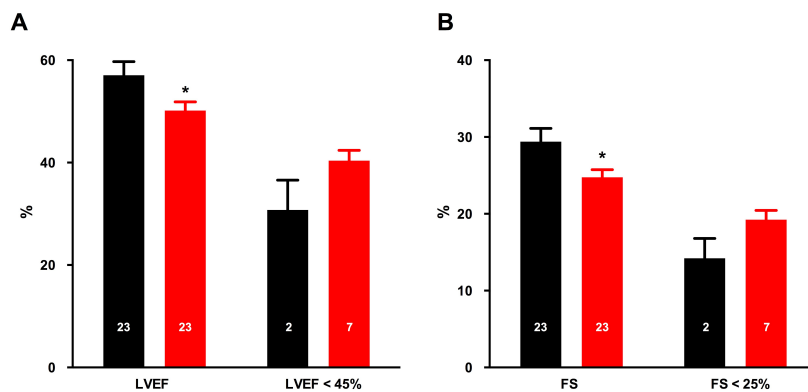


Abbildung 3.19: LVEF und FS in 12 Monate alten Tieren.

Unterteilung in reduzierte und normale Werte für Ejektionsfraktion und Fractional shortening. A) Linksventrikuläre Ejektionsfraktion in  $kcne2^{+/+}$ - und  $kcne2^{-/-}$ -Tieren. Linke Balken = alle Tiere, rechte Balken = alle Tiere mit  $EF < 45\%$ . B) FS in  $kcne2^{+/+}$ - und  $kcne2^{-/-}$ -Tieren. Linke Balken = alle Tiere, rechte Balken = alle Tiere mit  $FS < 25\%$ . \* $p < 0,05$ ; weiße Zahlen = Tiere pro Gruppe, FS: fractional shortening; LVEF: left ventricular ejection fraction; schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , rote Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Auffällig bei der Betrachtung der Ergebnisse für EF und FS war die Tatsache, dass es in der Gruppe der 12 Monate alten KO-Tiere wesentlich mehr Tiere gab als in der WT-Gruppe, die eine mittelgradig eingeschränkte LVEF zeigten. Diese Grenze wurde, der gängigen Konvention entsprechend, bei  $<45\%$  für die EF und bei  $<25\%$  für das FS angelegt. 7 KO-Tiere und lediglich 2 WT-Tiere fielen unter diese Grenze. Das entspricht einem Anteil von  $30\%$  im KO gegenüber  $9\%$  im WT (s. Abb. 3.19).

### 3.6 Molekularbiologie

#### 3.6.1 Calcineurinaktivität in jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren

Mithilfe des Calcineurin Cellular Activity Assay Kits wurde die kardiale Calcineurinaktivität von jungen und alten Tieren verglichen. Dazu wurde in lysiertem Herzgewebe die Phosphataseaktivität von Calcineurin colorimetrisch bestimmt. In der Gruppe der jungen Tiere wurden jeweils die Herzen von fünf KO- und fünf WT-Tieren untersucht. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme 3 Monate alt. In diesen Herzen zeigte sich im KO eine signifikant erhöhte Calcineurinaktivität gegenüber dem WT ( $p=0,01$ , s. Abb. 3.20A).

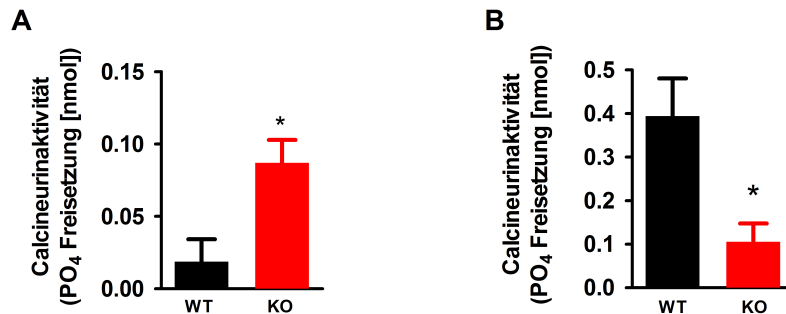


Abbildung 3.20: Calcineurinaktivität in jungen und alten Tieren.

A) In 3 Monaten alten *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren war die Calcineurinaktivität signifikant erhöht; in 12 Monate alten *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren (B) war sie signifikant verringert.  $n=5$  (A) bzw.  $n=3$  (B) Tiere pro Gruppe,  $*p<0,05$ ; schwarze Balken=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Balken=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

In der Gruppe der 12 Monate alten Tiere wurden drei Tiere pro Gruppe untersucht. Hier zeigte sich das umgekehrte Bild (s. Abb. 3.20B): Die Calcineurinaktivität war im KO im Vergleich zum WT nicht erhöht, sondern vermindert: Die WT-Herzen setzten im Mittel um den Faktor 4 mehr PO<sub>4</sub> frei als die Herzen aus den KO-Tieren. Dies war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p=0,04$ ).

### 3.6.2 CaMKII $\delta$ -Expression in jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren

Die Expression von CaMKII $\delta$  wurde in lysiertem Herzgewebe 3 Monate alter Tiere bestimmt. Die Proteinexpression im Knockout wurde in das Verhältnis gesetzt mit der Proteinexpression im Wildtyp, für welche der Wert auf 1 festgelegt wurde. Abb. 3.21A zeigt die relative Proteinexpression von CaMKII $\delta$ , Abb. 3.21B den Western Blot. In *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren war die Expression von CaMKII $\delta$  zweieinhalbmal so groß wie in den WT-Tieren und damit signifikant erhöht ( $p=0,003$ ).

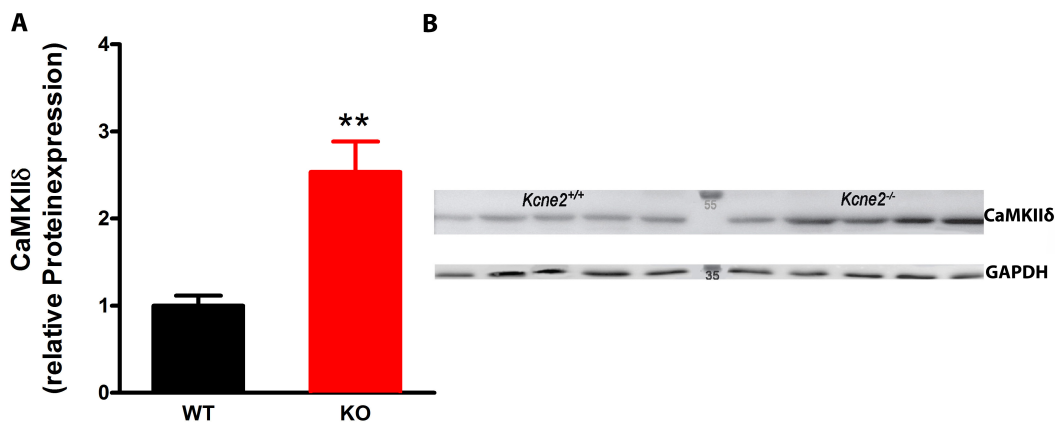


Abbildung 3.21: Expression der CaMKII $\delta$  in 3 Monate alten Tieren.

A) Relative Proteinexpression von CaMKII $\delta$  in Herzen von 3 Monaten alten Tieren. In *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren war die relative Expression von CaMKII $\delta$  signifikant erhöht. B) Exemplarischer Westernblot; aufgetragen sind CaMKII $\delta$  und GAPDH als Kontrolle.  $n=5$ ,  $**p<0,01$ ; schwarze Balken=*kcne2*<sup>+/+</sup>, rote Balken=*kcne2*<sup>-/-</sup>; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

## 3.7 Laborparameter im Serum

### 3.7.1 Hyperinsulinämie in jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren

Mittels ELISA wurden von der Firma *Laboklin* die Konzentrationen von C-Peptid im Serum von 3 Monate alten Tieren gemessen. C-Peptid ist ein Spaltprodukt des Proinsulins, das bei der Aktivierung des Hormons Insulin entsteht. Aufgrund seiner längeren Halbwertszeit wird es bei der Messung der Insulinspiegel im Blut bevorzugt bestimmt. Abb. 3.22 zeigt die Konzentration von C-Peptid im Serum von jungen WT- und KO-Tieren. Die C-Peptid-Spiegel waren in jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren bei Vergleich mit den WT-Tieren signifikant erhöht ( $p=0,03$ ). Das bedeutet, dass *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tiere im Alter von 3 Monaten eine Hyperinsulinämie zeigten.

## Ergebnisse

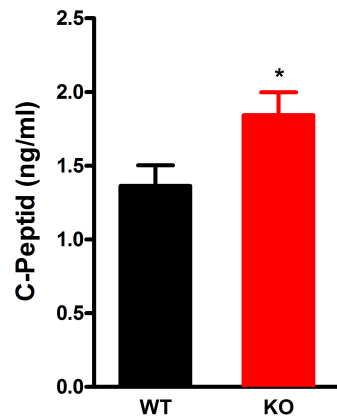


Abbildung 3.22: Konzentration von C-Peptid im Serum von 3 Monate alten Tieren. In 3 Monaten alten  $kcne2^{-/-}$ -Tieren war die Konzentration von C-Peptid im Serum signifikant erhöht.  $n=5$ ,  $**p<0,01$ ; schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , rote Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

### 3.7.2 Euthyreose in 12 Monate alten $kcne2^{-/-}$ -Tieren

Mittels ECLIA wurden von der Firma *Labor 28* die Konzentrationen von TSH,  $fT_3$  und  $fT_4$  im Serum von 12 Monate alten  $kcne2^{-/-}$ -Tieren und Wildtypkontrollen gemessen.

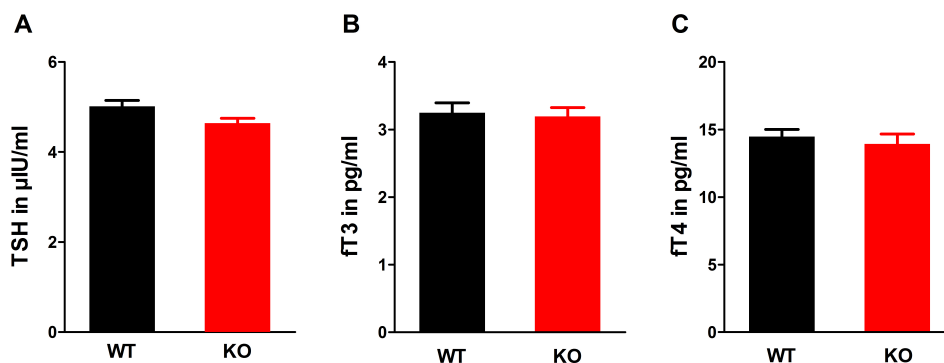


Abbildung 3.23: Konzentration von TSH,  $fT_3$  und  $fT_4$  im Serum von 12 Monate alten Tieren. 12 Monate alte  $kcne2^{-/-}$ -Tiere zeigten keine veränderten Konzentrationen von TSH,  $fT_3$  oder  $fT_4$  im Serum. Die Tiere waren euthyreot. (A)  $n=17$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=10$  ( $kcne2^{-/-}$ ), (B)  $n=19$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=21$  ( $kcne2^{-/-}$ ) und (C)  $n=19$  ( $kcne2^{+/+}$ ),  $n=20$  ( $kcne2^{-/-}$ ), schwarze Balken= $kcne2^{+/+}$ , rote Balken= $kcne2^{-/-}$ ; dargestellt sind arithmetisches Mittel + Standardfehler.

Abb. 3.23 zeigt die Konzentrationen von TSH,  $fT_3$  und  $fT_4$  im Serum von WT- und KO-Tieren. Sowohl das TSH als auch die peripheren Schilddrüsenhormone  $fT_3$  und  $fT_4$  unterschieden sich nicht signifikant voneinander in beiden Gruppen. Die  $kcne2^{-/-}$ -Tiere waren im Alter von 12 Monaten ebenso wie die WT-Tiere euthyreot.

# 4 Diskussion

## 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Mausmodell die Auswirkung der KCNE2-Deletion auf die kardiale Funktion untersucht. Dazu wurde eine KCNE2-Knockout-Mauszucht etabliert, in welcher mittels unterschiedlicher Methoden die Ausprägung eines kardialen Phänotyps dieses Knockouts in jungen (3-6 Monate) und alten (12-15 Monate) männlichen Knockout-Mäusen untersucht und mit Wildtyp-Kontrollen verglichen wurde.

Ziel der Arbeit war der Beweis der Hypothese, dass der Knockout von KCNE2, einer regulierenden Untereinheit spannungsgesteuerter Kaliumkanäle, die Ursache einer im Alter auftretenden Herzinsuffizienz ist. Des Weiteren sollten zugrunde liegende Ursachen und Mechanismen genauer charakterisiert werden.

Der Knockout (KO) von KCNE2 führte in unserer Zucht zu einer erhöhten Sterblichkeit. Circa 50 % der Tiere verstarben spontan im höheren Alter (siehe Abb. 3.1). Neben einer Verlängerung der QT-Zeit im Alter (siehe Abb. 3.2 B) sowie dem Nachweis von einzelnen potentiell letalen Herzrhythmusstörungen (siehe Abb. 3.2 C) zeigte sich führend eine strukturelle bzw. funktionelle kardiale Dysfunktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf zellulärer Ebene.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der KO von KCNE2 zu einer verminderten kardialen Kontraktilität führt: Der linksventrikuläre Druck in isolierten Herzen war im Langendorff-Experiment vermindert. Mit dem IonOptix-System wurde eine geringere maximale Verkürzung sowie eine verlängerte Relaxationsphase isolierter Kardiomyozyten nachgewiesen. Eine Änderung des intrazellulären Calciumgehalts oder signifikant veränderte Calciumtransienten konnten nicht beobachtet werden. Durch Anwendung der Whole-cell Voltage Clamp-Technik an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten fand sich jedoch eine veränderte Funktion des L-Type Calcium Kanals: Junge KO-Tiere zeigten hierbei einen erhöhten Stromfluss über den LTCC ( $I_{Ca,L}$ ) sowie verlängerte Inaktivierungszeiten des Kanals. Der durch den Kanal fließende Strom  $I_{Ca,L}$  war in alten Tieren hingegen signifikant verringert.



Echokardiographische Messungen (transthorakale Echokardiographie, TTE) konnten eine verminderte Pumpfunktion sowie eine Dilatation in den 12 Monate alten *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren *in vivo* bestätigen. 30 % dieser Tiere zeigten echokardiographisch eine mindestens mittelgradig eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF < 45 %). Kontrollmessungen in 9 Monate alten Tieren (ergänzend zu den bekannten Daten aus 6 Monate alten Tieren, vgl. Roepke *et al.* 2008 [66]) ergaben zu diesem früheren Zeitpunkt eine normwertige LVEF bei einer kardialen Hypertrophie und beginnender Dilatation des linken Ventrikels.

Auf molekularer Ebene konnten Veränderungen in Calcium-abhängigen Hypertrophie pathways gezeigt werden: So fand sich eine veränderte Calcineurinaktivität sowie eine Hochregulation der Calmodulin-Kinase II (CaMKII).

Auf diese Weise konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Knockout von KCNE2, einer Untereinheit von Kaliumkanälen, zu einer kardialen Hypertrophie und einer Herzinsuffizienz führen kann.

## 4.2 Diskussion der Methoden

### 4.2.1 Das *kcne2<sup>-/-</sup>*-Mausmodell

Der Knockout eines definierten Gens im murinen Organismus ist eine häufig angewendete Methode zur Untersuchung der Funktion des Gens. Bei der Verwendung eines Knockout-Mausmodells zur Klärung möglicher Ursachen der Herzinsuffizienz im Menschen stellt sich die Frage, inwieweit sich die gewonnenen Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus übertragen lassen. Zwar ist die basale Physiologie von murinem und humanem Herz ähnlich, aber trotzdem gibt es wichtige Unterschiede zwischen beiden Spezies: Die Herzfrequenz ist in der Maus bis zu zehn Mal höher, was mit einer viel kürzeren Dauer der Ionenflüsse über die Membran einhergeht [75]. Auch die Form des Aktionspotentials (AP) unterscheidet sich zwischen Maus und Mensch; das AP der Maus zeigt nach Depolarisierung keine Plateauphase. Dies ist bedingt durch unterschiedliche repolarisierende Kaliumströme: Zum Beispiel markiert der Kaliumstrom  $I_{to}$  in der Maus den Beginn der Repolarisierungsphase, während er im Menschen die kurze repolarisierende Phase vor dem Plateau vermittelt (vgl. Abb. 1.2). Aufgrund eines anderen Expressionsmusters der Kanalproteine wirken als repolarisierende

Kaliumströme in der Maus vor allem  $I_{K, \text{slow1}}$  und  $I_{K, \text{slow2}}$  anstelle der humanen Ströme  $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$  [76].

Trotz der nicht unerheblichen Unterschiede zwischen Maus und Mensch bleibt das genetisch manipulierte Mausmodell eine der wichtigsten Quellen für Erkenntnisse in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen. Insbesondere kardiale Erkrankungen – und darunter vor allem die Herzinsuffizienz – sind gekennzeichnet durch ein strukturelles, elektrisches und molekulares Remodeling, das sich ausschließlich *in vivo* untersuchen lässt [75]. Beachtet man bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse die Limitationen, die jedem Versuchsmodell (einschließlich der genetisch veränderten Maus) immanent sind, bleibt das transgene Mausmodell eine der erfolgversprechendsten Methoden, um pathologische kardiale Prozesse zu untersuchen und zu verstehen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell ist ein globaler Knockout von KCNE2 (vgl. Roepke *et al.* [53]). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Auswirkungen des Knockouts, die am Herzen sichtbar werden, die kardiale Reaktion auf eine fehlende KCNE2-Funktion in einem anderen Organ sind. Schließlich ist die Wirkung von KCNE2 nicht nur im Herz, sondern auch an weiteren Organen beschrieben worden, unter anderem im Magen und in der Schilddrüse [54, 59]. Kürzlich zeigten Hu *et al.*, dass die KCNE2-Deletion zu einem Syndrom mit vielen unterschiedlichen Pathologien im gesamten Organismus führt: Die KO-Tiere hatten eine Dyslipidämie, Diabetes mellitus sowie eine Anämie [64].

Zusammenfassend ist der globale Knockout ein Modell, das zwar gewisse Schwächen hat, aber insgesamt gut geeignet ist, um die kardiale Funktion in ihrer gesamten Komplexität innerhalb eines Organismus nach KCNE2-Deletion zu untersuchen.

### 4.2.2 Funktionelle Methoden

Die Kontraktionskraft isolierter Herzen wurde in einem Langendorff-Aufbau gemessen, in dem das schlagende Herz in einer kontrollierten Umgebung untersucht werden kann. Durch die Kontrolle der Versuchsbedingungen (u.a. Vorlast, Nachlast, Temperatur) ist dieser experimentelle Ansatz gut geeignet, um die Herzfunktion zu analysieren. Potentiell störende Einflüsse anderer Organe lassen sich durch die isolierte Untersuchung des Herzens konsequent eliminieren [68]. Beispielsweise konnten Braz *et al.* mit dieser Methode die verbesserte

Kontraktilität nach Deletion der Proteinkinase  $C\alpha$  zeigen [77]. Ein Nachteil der Methode ist, dass es sich um ein *ex vivo* Experiment und damit um eine prinzipiell sterbende Präparation handelt [68, 78]. Dies ist jedoch in der vorliegenden Arbeit nachrangig, da der Versuch lediglich dem Vergleich von *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren mit Wildtyp-Tieren diene und nicht der Bestimmung absoluter Werte. Insbesondere in Kombination mit den Daten aus den TTE-Messungen ist das Langendorff-Modell ein geeigneter Ansatz, um die basale Herzfunktion nach KCNE2-Deletion zu untersuchen.

Längenänderung und Calciumgehalt von stimulierten Kardiomyozyten wurden mit dem Ion-Optix-System während der Kontraktion gemessen. Diese Messungen sind ein wichtiger Bestandteil und ein breit angewendetes Werkzeug der Charakterisierung der Herzinsuffizienz in Tiermodellen [34, 79, 80]. Die Calciumkonzentration wurde durch Messung der wechselnden Emissionsspektren von Fura-2 AM bestimmt. Mit dieser Methode lässt sich freies Calcium im Zytosol während der Systole und der Diastole bestimmen [72]. Allerdings ist es dabei nicht möglich, Aussagen über bestimmte Subkompartimente (wie z. B. das Sarkoplasmatische Retikulum (SR)) zu treffen. Dies ist im Hinblick auf eine ggf. verminderte Füllung des SR besonders interessant (s. unten). Daher sollte in weiterführenden Experimenten eine genauere Untersuchung des SR angestrebt werden, zum Beispiel durch Verwendung von Koffein zur Stimulation der SR-Entleerung (vgl. Varro *et al.* [81]).

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.3.1 KCNE2-Deletion führt zu einer Calcium-induzierten Hypertrophie und einer Herzinsuffizienz mit teils letalem Ausgang im Alter

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion von KCNE2 in der Maus im Alter von 12 Monaten zu einer gestörten kardialen Funktion führt: Im isolierten Herz wurde eine signifikant verringerte linksventrikuläre Pumpfunktion nachgewiesen. Auch auf der Ebene isolierter Zellen war eine Funktionseinschränkung beobachtbar: Die Kontraktion dieser Zellen war verringert und die Relaxation dauerte länger. Darüber hinaus war die Mortalität in der KO-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöht. Die nächstliegende Erklärung für diese Beobachtungen ist eine im Alter auftretende Herzinsuffizienz.

Um den Verdacht einer Herzinsuffizienz zu erhärten, wurden die Tiere echokardiographisch untersucht. Mittels TTE konnte — zusätzlich zu einer signifikanten linksventrikulären Dilatation — *in vivo* eine Reduktion von EF und FS nachgewiesen werden. Bei 30 % der KO-Tiere zeigte sich eine mindestens moderat eingeschränkte LVEF < 45 % (FS < 25 %).

Wie ist die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Alter zu erklären? In jungen Tieren liegt nach KCNE2-Deletion keine strukturelle Herzerkrankung vor; die Tiere zeigen lediglich eine verlängerte Dauer des Aktionspotentials, wie Röpke *et al.* in einer früheren Arbeit nachweisen konnten [66]. Mit der verlängerten Aktionspotentialdauer ist es denkbar, dass auch die Calciumhomöostase während der Zellerregung verändert ist. Hier zeigte sich tatsächlich eine größere Stromdichte über den L-Type Calcium-Kanal (*L-Type Calcium Channel*, LTCC) sowie eine signifikant verlängerte Inaktivierungszeit  $\tau_{fast}$  des Kanals in 3-6 Monate alten KO-Tieren.

Des Weiteren leitete der LTCC in diesen Tieren mehr Strom. Ein erhöhter Calciumeinstrom über den LTCC wurde in unterschiedlichen Modellen mit pathologischen Umbauprozessen in Verbindung gebracht (siehe Review von Richard *et al.* [82]). Der in jungen Tieren beobachtete erhöhte Strom über den LTCC könnte also der Auslöser für ein hypertrophes Remodeling sein, das über eine initiale Hypertrophie schließlich zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt. Bestätigt werden konnte diese Hypothese durch den Nachweis einer vermehrten Calcineurinaktivität in jungen KO-Tieren sowie eine vermehrte Expression von CaMKII $\delta$ , einer weiteren Calcium-abhängigen Kinase.

Fluoreszenzmessungen an isolierten Kardiomyozyten aus *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren zeigten zwar keine signifikant veränderten Calciumtransienten während der Systole in alten KO-Tieren, obgleich die systolischen Calciumtransienten (wenn auch nicht signifikant) gering niedriger waren als im WT. Im Alter fand sich jedoch auch eine verminderte Stromdichte über den LTCC. Dies ist interessant, da sich auf zellulärer Ebene eine gestörte Kontraktion und eine gestörte Relaxation nachweisen ließ.

Die postulierte Hypertrophie als Zwischenstufe ließ sich echokardiographisch in neun Monate alten *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren zeigen: Das Septum und die Hinterwand des linken Ventrikels (LV)

waren signifikant dicker als in *kcne2<sup>+/+</sup>*-Tieren, die LV Masse sowie das Verhältnis Herz/Körpergewicht waren erhöht. Die endsystolisch und enddiastolisch gemessenen Innendurchmesser des LV (LVIDs und LVIDd) waren jedoch noch nicht verändert. Dies entspricht einer linksventrikulären Hypertrophie *ohne* Dilatation. Diese Hypertrophie schreitet im Verlauf zu einer LV-Dilatation voran: In 12 Monate alten Tieren waren die linksventrikulären Durchmesser hoch signifikant vergrößert, während die Hinterwand des LV signifikant dünner war. Bei 30 % der 12 Monate alten *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tiere (7 aus 23) ließ sich echokardiographisch eine LVEF < 45 % nachweisen — im Vergleich zu nur 10 % der WT-Tiere (2 aus 23).

Der globale Knockout von KCNE2 bewirkt also bereits frühzeitig die Initiierung von Calcium-abhängigen Hypertrophie pathways; dies lässt sich strukturell *in vivo* nach ca. 9 Monaten nachweisen. Im Verlauf geht diese Hypertrophie in eine dilatative Herzinsuffizienz über, welche sich ab einem Lebensalter von 12 Monaten manifestiert.

### **4.3.2 Intrakardiale Faktoren, die an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt sein könnten**

#### **Störung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase**

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei Herzinsuffizienz ist eine gestörte elektromechanische Kopplung durch Störung der Calciumhomöostase: Der Calciumtransient bei Exzitation der Zelle hat eine verringerte Amplitude, dauert länger an und hat einen verlangsamt Abfall [83]. Dies macht sich in einer verminderten Kontraktilität und einer verminderten EF bemerkbar; gleichzeitig ist das enddiastolische Calcium erhöht [83].

Dies konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden: Die Untersuchung des intrazellulären Calciumgehalts der Kardiomyozyten aus 12 Monate alten Tieren zeigte keine Veränderung nach KCNE2-Deletion gegenüber WT-Kontrollen (siehe Abb. 3.10 und 3.11). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die intrazelluläre Calciumhomöostase zwar gestört ist – aber diese Störung bei Betrachtung des *gesamten* intrazellulären Calciums nicht sichtbar ist, da sie sich nur in kleinen Bereichen abspielt: Der Calciumgehalt in sog. Microdomänen (*Microdomains*) könnte gestört sein. Microdomains sind definiert als ein durch Calcium ausgelöstes Signalereignis an einer spezifischen Lokalisation innerhalb der Zelle [84, 85]. Eine solche Microdomain ist der Raum zwischen Sarcolemma und junctionaler

Membran des Sarcoplasmatischen Retikulums, in dem sich der LTCC und der Ryanodin-Rezeptor (RyR) befinden. Despa *et al.* zeigten kürzlich, dass sich die Calciumkonzentration in diesem junctionalen Spalt von der im restlichen Zytosol unterscheidet [86]. Indirekte Hinweise sprechen dafür, dass lokales Calcium in diesem Umfeld auch an der Aktivierung von Calcineurin oder CaMKII beteiligt ist [87], welche wiederum wichtig in der Pathogenese der Herzinsuffizienz sind (s. unten).

Zudem fand sich im Gegensatz zu den jungen KO-Tieren eine verminderte Stromdichte über den LTCC. Dies ist in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen beschrieben worden [88, 89].

### **Gestörte Funktion des Sarkoplasmatischen Retikulums**

Eine weitere mögliche Ursache für die beobachtete Herzinsuffizienz in alten *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tieren ist eine gestörte Funktion des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Dies kann sowohl durch ein Leck im SR (sog. *leaky SR*) oder eine verminderte Füllung des SR bedingt sein.

Der Begriff leaky SR bezeichnet eine erhöhte diastolische Calciumkonzentration, die durch eine gestörte Funktion des Ryanodin-Rezeptors (RyR) verursacht wird [44]. Es konnte gezeigt werden, dass der RyR durch CaMKII phosphoryliert wird [90]. Die Phosphorylierung führte zu einer Änderung der Offenheitswahrscheinlichkeit und damit zu einem Calciumfluss aus dem Sarkoplasmatisches Retikulum (SR) in das Zytosol während der Diastole [83, 90]. Zwar wurde in dieser Arbeit keine erhöhte diastolische Calciumkonzentration gemessen. Da aber eine erhöhte Aktivität der CaMKII in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte, ist es nicht auszuschließen, dass die Funktion des RyR, ausgelöst durch eine CaMKII-bedingte Phosphorylierung, gestört ist. Daher sollte in kommenden Studien im *kcne2<sup>-/-</sup>*-Tiermodell die Funktion und der Phosphorylierungsgrad des Ryanodin-Rezeptors untersucht werden.

Erste Messungen von Calcium Sparks und Waves mittels konfokaler Mikroskopie in unserer Arbeitsgruppe zeigten hier eine deutliche Zunahme der Frequenz beider Signale im KO.

Eine verminderte Füllung des SR führt zu einer verminderten Ausschüttung von Calcium aus dem SR während der Kontraktion. Dies vermindert die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten, da weniger Calcium für die Bindung an die kontraktilen Proteine bereitsteht. Bei

Herzinsuffizienz lässt sich eine solche verminderte Ausschüttung von Calcium aus dem SR beobachten [91]. Ursache dafür kann einerseits ein Defekt am RyR oder eine verminderte Verfügbarkeit von Calcium aus dem SR sein [91]. Sowohl funktionelle Änderungen der Aktivität des LTCC als auch strukturelle Änderungen (eine reduzierte Anzahl von mit RYR gekoppelten LTCCs) können die Effektivität der elektrochemischen Kopplung vermindern [91]. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant verminderte Stromdichte über den LTCC. Zusätzlich könnte eine Reduktion der Anzahl funktionierender LTCC die elektrochemische Kopplung stören.

### **Gestörte Funktion des L-Type Calcium Kanals**

Im Gegensatz zu den jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren, in denen der Calciumstrom ( $I_{Ca,L}$ ) durch den L-type Calcium Channel (LTCC) signifikant erhöht war, kam es in den >12 Monate alten KO-Tieren zu einer Reduktion von  $I_{Ca,L}$  bei weiterhin verlängerter Inaktivierungszeit. In verschiedenen Studien zur Stromdichte des LTCC bei Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz wurden ähnliche Ergebnisse berichtet: So wurde vorgeschlagen, dass die Stromdichte zunächst zunimmt, bevor es zur Hypertrophie der Zellen kommt [92]. Anschließend normalisiert sich die Stromdichte bzw. kommt es zu einer Verminderung dieser bei manifester Herzinsuffizienz [88, 89]. Auch die Kinetik des Schaltverhaltens des LTCC ist bei Herzinsuffizienz häufig verändert; es kommt zu einer verlangsamten Inaktivierung der Kanäle [91]. Dies konnte sowohl in Kardiomyozyten aus jungen als auch in denen aus alten *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren bestätigt werden. Die Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation war bei uns jedoch anders als in den meisten publizierten Studien zur Aktivität des LTCC bei Herzinsuffizienz: Die Kardiomyozyten aus >12 Monate alten Tieren zeigten nach Applikation von Isoprenalin eine starke Zunahme des Stroms. Dies steht im Gegensatz zu den meisten Herzinsuffizienzmodellen, bei denen es durch eine dauerhafte  $\beta$ -Stimulation zu einer Desensibilisierung und Internalisierung der  $\beta$ -Rezeptoren kommt [93].

Liu *et al.* beschrieben kürzlich eine direkte Assoziation von *kcne2* mit dem LTCC. Sie zeigten, dass  $I_{Ca,L}$  durch *kcne2* bidirektional moduliert wurde: KCNE2-Überexpression verringerte den Strom, und KCNE2-Knockdown erhöhte diesen [94]. Diese Daten stammen jedoch nicht aus primären Zellen, sondern aus kultivierten Rattenmyokardzellen, die mit humaner *kcne2*-DNA transfiziert wurden, sowie aus HEK-Zellen. Ob *kcne2* auch in der Maus mit dem LTCC assoziiert ist und damit einen direkten Einfluss auf den LTCC hat, war nicht Gegen-

stand dieser Arbeit. In kommenden Studien sollte daher untersucht werden, ob es auch *in vivo* zu einer Interaktion von *kcne2* und dem LTCC in Kardiomyozyten kommt.

### **Potenzielle Interaktionen von *kcne2* mit kardialen kontraktilen Proteinen**

In einzelnen Kardiomyozyten aus *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren konnte mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden keine Verringerung der Calciumtransienten beobachtet werden. Trotzdem waren gleichzeitig die Kontraktion und Relaxation dieser Zellen signifikant eingeschränkt. Daher ist es denkbar, dass die Ursache der eingeschränkten Kontraktilität nicht im Calciumhandling, sondern im kontraktilen Apparat liegt: Eine Änderung der kardialen kontraktilen Funktion kann durch die Phosphorylierung von Sarkomerproteinen bedingt sein. Als Beispiel dafür sei die Phosphorylierung von Troponin I genannt [95].

Eine wichtige Rolle bei der Generierung von passiver Spannung in Kardiomyozyten spielt das Sarkomerprotein Titin [95]. Als größtes Protein im menschlichen Körper besitzt es Hunderte von potentiellen Phosphorylierungsstellen [95]. Eine erhöhte Steifheit von Titin ist neben der Fibrose einer der Hauptgründe für die diastolische Herzinsuffizienz [96]. Bisher sind nur die Auswirkungen der Phosphorylierung von wenigen der vielen potentiellen Phosphorylierungsstellen von Titin untersucht [95]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Titin durch die CaMKII an mehr als einem Dutzend Stellen phosphoryliert wird [97]. Neben CaMKII können weitere Kinasen Titin phosphorylieren, u.a. PKA, PKC $\alpha$  und PKG. Diese Phosphorylierungen führen insgesamt zu einer Reduktion der passiven Spannung der Kardiomyozyten — mit der Ausnahme von PKC $\alpha$ , die das Gegenteil bewirkt [95].

In den jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren wurde eine Hochregulation der CaMKII nachgewiesen. Die Hochregulation von CaMKII könnte neben den Wirkungen auf die Proteine des Calciumhandlings zusätzlich auch Titin phosphorylieren und auf diese Weise einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten ausüben. Erste Daten aus einem Yeast-two hybrid-Modell sowie Mikroarray-Daten aus der KCNE2 KO-Maus zeigten darüber hinaus jedoch außerdem eine potentielle direkte Interaktion von *kcne2* mit Titin und Myomesin (unveröffentlichte Daten von Geoffrey W. Abbott<sup>1</sup>). Diese Daten sind jedoch noch sehr rudimentär; es bedarf hier zukünftiger Studien am KCNE2-Knockout, um eine mögliche direkte

---

<sup>1</sup>Geoffrey W. Abbott, PhD, Bioelectricity Laboratory, Department of Physiology and Biophysics and School of Medicine, University of California, Irvine, USA



Interaktion von *kcne2* und einzelnen kontraktilen Proteinen genauer zu untersuchen.

### 4.3.3 Extrakardiale Faktoren

#### Einfluss der Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) beeinflussen maßgeblich die kardiale Funktion. Hypothyreote Stoffwechsellagen wurden in unterschiedlichen Publikationen mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (siehe Review von Dillmann *et al.* [98]). Die physiologischen Effekte der Schilddrüsenhormone am Herzen werden über spezielle nukleäre Rezeptoren vermittelt [99]. Im humanen Herz beeinflusst  $T_3$  viele wichtige kardiale Proteine, darunter die sarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -ATPase 2 (SERCA2), den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und den LTCC [99].

Röpke *et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass KCNE2 eine wichtige Rolle in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone spielt [59]: Zusammen mit KCNQ1 bildet KCNE2 einen Kaliumkanal in Thyreozyten, der für eine ungestörte Aufnahme von Iodid in die Zelle notwendig ist. Bei Deletion von KCNE2 kam es zu einer Störung der Produktion der Schilddrüsenhormone. Eine klinisch manifeste Hypothyreose bildete sich aber nur aus, wenn die *kcne2*<sup>-/-</sup>-Jungtiere von *kcne2*<sup>-/-</sup>-Muttertieren gesäugt wurden; die Jungtiere zeigten dann eine Zwergwüchsigkeit, Alopezie sowie Kardiomegalie. Dieser kardiale Phänotyp war jedoch nicht in Tieren zu beobachten, die aus der Kreuzung von *kcne2*<sup>+/-</sup>-Tieren entstanden waren und von *kcne2*<sup>+/-</sup>-Muttertieren aufgezogen wurden [66]: Die mit der Muttermilch aufgenommenen Schilddrüsenhormone konnten den latenten Mangel im Jungtier ausgleichen [59]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Tiere verwendet, die von *kcne2*<sup>+/-</sup>-Muttertieren aufgezogen wurden.

In der oben erwähnten Arbeit wurde auch ein erniedrigtes  $T_4$  und eine TSH-Erhöhung in >12 Monate alten *kcne2*<sup>-/-</sup>-Mäusen gesehen. Die Autoren schlossen daraus auf das Vorliegen einer latenten Hypothyreose im Alter [59]. Diese Trends konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden: Die Spiegel für TSH und  $fT_4$  unterschieden sich nicht zwischen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren und der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.22). Insbesondere in Anbetracht der großen Zahl der untersuchten Tiere in der vorliegenden Arbeit (n=20 bzw. 19 pro Gruppe!) kann somit eine Hypothyreose als Grund für den im Alter beobachteten kardialen Phänotyp

labordiagnostisch ausgeschlossen werden.

## **Einfluss von Insulin**

Im Serum 3 Monate alter *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tiere konnte in unserem Labor eine Erhöhung der C-Peptid-Spiegel nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22); die Tiere zeigten eine Hyperinsulinämie. Dies passt zu den Ergebnissen von Hu *et al.*, die vor kurzem zeigen konnten, dass *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tiere den Phänotyp eines Diabetes mellitus entwickeln können [64].

Eine Hyperinsulinämie kann zu einer vermehrten Produktion von Insulin like growth factor 1 (IGF-1) führen [100]. Insulin und IGF-1 binden an strukturell sehr ähnliche Rezeptoren [den Insulin-Rezeptor (IR) und Insulin like growth factor-Rezeptor (IGFR)]. Für den IGFR konnte gezeigt werden, dass er an der Vermittlung der physiologischen Hypertrophie beteiligt ist [19, 28]: Bindet ein Ligand an den IGFR, entsteht über die Kinase PI3K $\alpha$  (auch *p110 $\alpha$*  genannt) Phosphoinositoltriphosphat, das zur Aktivierung von Akt führt. Akt ist eine Kinase, die eine wichtige Rolle in der Vermittlung der physiologischen Hypertrophie spielt [28].

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Signaltransduktionsweg auch den L-type Calcium Channel (LTCC) beeinflusst: So wurde  $I_{Ca,L}$ , der Strom durch den LTCC, durch die Behandlung mit IGF-1 über eine PI3K $\alpha$ -abhängige Aktivierung der Proteinkinase B verstärkt [101]. Der herzspezifische Knockout von *p110 $\alpha$*  in der Maus führte zur Reduktion von  $I_{Ca,L}$  und zu einer kontraktilen Dysfunktion [102]. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien, erscheint es möglich, dass die beobachtete Hyperinsulinämie über eine Aktivierung des IGF-1/PI3K/Akt-Weges den LTCC stimuliert. Der resultierende erhöhte Calciumeinstrom könnte neben dem durch die Verlängerung des Aktionspotentials bedingten Anstieg der Stromdichte somit eine Ursache für die beobachtete Hypertrophie im globalen Knockout sein.

## **4.4 Ausblick**

### **4.4.1 Generierung eines herzspezifischen Knockouts**

Für ein tiefergehendes Verständnis der kardialen Pathologie muss zwischen direkten kardialen Effekten der KCNE2-Deletion und extrakardialen Effekten, die eine Auswirkung auf das

Herz haben, unterschieden werden. Die Untersuchung eines herzspezifischen Knockoutmodells erscheint daher sinnvoll und notwendig.

Nach erfolgreicher Generierung eines solchen herzspezifischen Knockouts in unserer Arbeitsgruppe wurde bereits mit der Charakterisierung des Phänotyps begonnen. Die ersten Beobachtungen dieser herzspezifischen Knockout-Tiere (hsKO) deuten auf einen beeindruckenden Phänotyp hin: Im jungen Alter war die Herzfunktion ähnlich wie bei den in dieser Arbeit untersuchten globalen KO-Tieren vollkommen normal. Nach vier bis fünf Monaten jedoch entwickelten die hsKO-Tiere eine schwere Herzinsuffizienz bei einer deutlichen Dilatation des LV. Die Ejektionsfraktion (EF) der Tiere betrug in exemplarischen echokardiographischen Untersuchungen  $\sim 5\%$ . Nach sechs Monaten lag die Letalität dieser Tiere bei annähernd 100%. Vergleicht man die oben dargestellten Ergebnisse aus dem konventionellen Knockout mit den ersten Beobachtungen im hsKO, lassen sich folgende zwei Beobachtungen zusammenfassen:

- Der konventionelle Knockout von KCNE2 führt über eine Hypertrophie zu einer Dilatation des Herzens, die im Alter von  $>12$  Monaten in eine Herzinsuffizienz mündet.
- Der herzspezifische Knockout von KCNE2 führt frühzeitig zu einem dilatativen Phänotyp mit schwerer Herzinsuffizienz ohne vorangehendes hypertrophes Remodeling.

Diese ersten Ergebnisse aus den hsKO-Tieren deuten darauf hin, dass der konventionelle Knockout des KCNE2-Gens gegenüber dem herzspezifischen Knockout *protektive* Funktionen hat. Was also verhindert die direkte Entstehung einer Herzinsuffizienz im konventionellen Knockout und bewirkt stattdessen die hypertrophe Anpassung mit der folgenden vergleichsweise mild ausgeprägten Herzinsuffizienz?

Denkbar ist, dass die Hyperinsulinämie und eine konsekutive Aktivierung des *IGFR-PI3K-Akt*-Signaltransduktionswegs Teil dieser protektiven Wirkung ist: Der genannte Signaltransduktionsweg ist an der Vermittlung der Hypertrophie beteiligt und könnte somit die direkten kardialen Effekte der KCNE2-Deletion, die im hsKO sichtbar werden, zunächst ausbalancieren. Außerdem ist es möglich, dass die Aktivierung von Akt einen direkten stimulierenden Effekt auf den LTCC – z. B. durch Stimulation des Traffickings – und durch die vermehrte Stromdichte via LTCC einen positiv inotropen Effekt hat.

Für ein genaueres Verständnis der Interaktionen zwischen protektiven und maladaptiven Prozessen sind weitere Studien sowohl am globalen KO als auch im hsKO unerlässlich.

#### 4.4.2 Untersuchung weiterer intrazellulärer Signaltransduktionswege

Auch eine genauere Untersuchung derjenigen molekularen Signaltransduktionswege, die an der Vermittlung der Hypertrophie beteiligt sind, ist nötig. In der vorliegenden Arbeit konnte die Hochregulation bzw. Aktivierung von Calcineurin und CaMKII $\delta$  in jungen *kcne2*<sup>-/-</sup>-Tieren gezeigt werden. Es ist jedoch eine Großzahl von Proteinen an der Vermittlung der Hypertrophie beteiligt, wie die folgende Abbildung veranschaulicht [28]:

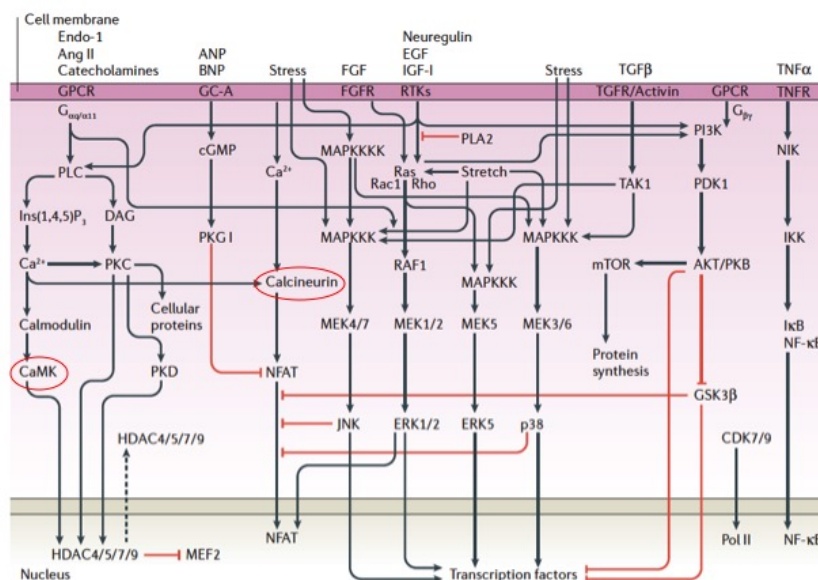


Abbildung 4.1: An der Vermittlung der Hypertrophie beteiligte intrazelluläre Signalwege. Schematische Darstellung einiger intrazellulärer Signaltransduktionswege, die an der Vermittlung der kardialen Hypertrophie beteiligt sind. Rote Kreise markieren Proteine, deren veränderte Expression nach *KCNE2*-Deletion in dieser Arbeit gezeigt wurde. *CaMK*, calmodulin-dependent kinase. *Abbildung entnommen aus Heineke und Molkenin [28] und adaptiert mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, ©2006.*

Neben der bloßen Bestimmung, *wie* welche Proteine reguliert sind, muss natürlich auch die zeitliche Reihenfolge der Regulation untersucht werden. Aufgrund der großen Zahl der an der Hypertrophie beteiligten Proteine – Abb. 4.1 gibt nur einen Überblick über die besser verstandenen Wege – scheint dies eine komplexe Aufgabe zu sein. Nur so können allerdings ein weitergehendes Verständnis der potentiell protektiven und maladaptiven Prozesse nach *KCNE2*-Deletion erreicht und potentielle therapeutische Targets identifiziert werden.

# Literatur

1. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL und Loscalzo J, Hrsg. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. New York: McGraw Hill, 2012.
2. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail* 2012;14:803–869.
3. Mosterd A und Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;93:1137–1146.
4. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Mahoney DW, Bailey KR und Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003;289:194–202.
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL *et al.* Executive summary: Heart Disease and Stroke Statistics–2014 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014;129:399–410.
6. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM *et al.* Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2004;25:1614–1619.
7. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG *et al.* Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397–1402.
8. Gesundheit 2012. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12 Reihe 6.2.1. Statistisches Bundesamt. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2013.
9. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA *et al.* Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail* 2013;6:606–619.
10. Neumann T, Biermann J, Erbel R *et al.* Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:269–275.
11. Pitt B, Zannad F, Remme WJ *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709–717.

## Literatur

12. Flather MD, Yusuf S, Køber L *et al.* Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. *Lancet* 2000;355:1575–1581.
13. Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y *et al.* Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. *Circulation* 2001;103:148–154.
14. Zannad F, McMurray JJV, Krum H *et al.* Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11–21.
15. Agarwal V, Briasoulis A und Messerli FH. Effects of renin-angiotensin system blockade on mortality and hospitalization in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Rev* 2013;18:429–437.
16. Bardy GH, Lee KL, Mark DB *et al.* Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *NEJM* 2005;352:225–237.
17. Banner NR, Bonser RS, Clark AL *et al.* UK guidelines for referral and assessment of adults for heart transplantation. *Heart (British Cardiac Society)* 2011;97:1520–1527.
18. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA *et al.* Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N Engl J Med* 2009;361:2241–2251.
19. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L und McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;128:191–227.
20. Maillet M, Berlo JH van und Molckentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:38–48.
21. Pluim BM, Zwinderman AH, Laarse A van der und Wall EE van der. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 2000;101:336–344.
22. Berlo JH van, Maillet M und Molckentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest* 2013;123:37–45.
23. Simone G de, Gottdiener JS, Chinali M und Maurer MS. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J* 2008;29:741–747.

## Literatur

24. Kim J, Wende AR, Sena S *et al.* Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* 2008;22:2531–2543.
25. McMullen JR, Shioi T, Huang WY *et al.* The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 2004;279:4782–4793.
26. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF *et al.* Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2004;94:110–118.
27. Molkentin JD. Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells. *Circ Res* 2013;113:16–19.
28. Heineke J und Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:589–600.
29. Rusnak F und Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000;80:1483–1521.
30. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009;139:468–484.
31. Maier LS und Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:919–939.
32. Anderson ME, Brown JH und Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:468–473.
33. Zhang T, Johnson EN, Gu Y *et al.* The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 2002;277:1261–1267.
34. Zhang T, Maier LS, Dalton ND *et al.* The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003;92:912–919.
35. Backs J, Backs T, Neef S *et al.* The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2342–2347.

## Literatur

36. Ling H, Zhang T, Pereira L *et al.* Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1230–1240.
37. Perrier E, Kerfant BG, Lalevee N *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:776–783.
38. Näbauer M und Kääb S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:324–334.
39. Furukawa T und Kurokawa J. Potassium channel remodeling in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:753–761.
40. Suzuki T, Shioya T, Murayama T *et al.* Multistep ion channel remodeling and lethal arrhythmia precede heart failure in a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy. *PloS one* 2012;7:e35353.
41. Crump SM und Abbott GW. Arrhythmogenic KCNE gene variants: current knowledge and future challenges. *Front Genet* 2014;5:3.
42. Klinke R, Pape H und Silbernagel S. *Physiologie*. 5. Stuttgart: Thieme, 2005.
43. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415:198–205.
44. Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: Basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol* 2014;76:107–127.
45. Fischer TH, Maier LS und Sossalla S. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev* 2013;18:475–483.
46. Hove-Madsen L und Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1993;73:820–828.
47. Li L, Chu G, Kranias EG und Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 1998;274:H1335–H1347.
48. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:473–508.



49. Li Y, Um SY und McDonald TV. Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *Neuroscientist* 2006;12:199–210.
50. Abbott GW. KCNE2 and the K<sup>+</sup> channel: The tail wagging the dog. *Channels* (Austin, Tex.) 2012;6:1–10.
51. Abbott GW und Goldstein SA. A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q Rev Biophys* 1998;31:357–398.
52. McCrossan ZA und Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;47:787–821.
53. Roepke TK, Anantharam A, Kirchhoff P *et al.* The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2006;281:23740–23747.
54. Roepke TK, Purtell K, King EC, La Perle KMD, Lerner DJ und Abbott GW. Targeted deletion of *Kcne2* causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia. *PloS One* 2010;5:e11451.
55. Salsbury G, Cambridge EL, McIntyre Z *et al.* Disruption of the potassium channel regulatory subunit KCNE2 causes iron-deficient anemia. *Exp Hematol* 2014;42:1053–8.e1.
56. Damkier HH, Brown PD und Praetorius J. Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology* (Bethesda, Md.) 2010;25:239–249.
57. Roepke TK, Kanda VA, Purtell K, King EC, Lerner DJ und Abbott GW. KCNE2 forms potassium channels with KCNA3 and KCNQ1 in the choroid plexus epithelium. *FASEB J* 2011;25:4264–4273.
58. Abbott GW, Tai KK, Neverisky DL *et al.* KCNQ1, KCNE2, and Na<sup>+</sup>-coupled solute transporters form reciprocally regulating complexes that affect neuronal excitability. *Sci signal* 2014;7:ra22.
59. Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A *et al.* *Kcne2* deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nat Med* 2009;15:1186–1194.
60. Abbott GW, Sesti F, Splawski I *et al.* MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97:175–187.

## Literatur

61. Sesti F, Abbott GW, Wei J *et al.* A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10613–10618.
62. Yang Y, Xia M, Jin Q *et al.* Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;75:899–905.
63. Nielsen JB, Bentzen BH, Olesen MS *et al.* Gain-of-function mutations in potassium channel subunit KCNE2 associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Biomark Med* 2014;8:557–570.
64. Hu Z, Kant R, Anand M *et al.* Kcne2 deletion creates a multisystem syndrome predisposing to sudden cardiac death. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;7:33–42.
65. Lee SM, Nguyen D, Hu Z und Abbott GW. Kcne2 deletion promotes atherosclerosis and diet-dependent sudden death. *J Mol Cell Cardiol* 2015;87:148–151.
66. Roepke TK, Kontogeorgis A, Ovanez C *et al.* Targeted deletion of kcne2 impairs ventricular repolarization via disruption of I(K,slow1) and I(to,f). *FASEB J* 2008;22:3648–3660.
67. Langendorff O. Untersuchungen am lebenden Säugetierherzen. *Pflugers Arch* 1895;61:291–332.
68. Bell RM, Mocanu MM und Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:940–950.
69. Berry MN, Friend DS und Scheuer J. Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ Res* 1970;26:679–687.
70. Vahouny GV, Wei R, Starkweather R und Davis C. Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* 1970;167:1616–1618.
71. Köhncke C, Lisewski U, Schleußner L, Gaertner C, Reichert S und Roepke TK. Isolation and Kv channel recordings in murine atrial and ventricular cardiomyocytes. *J Vis Exp* 2013;e50145.
72. Sipido KR und Callewaert G. How to measure intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in single cardiac cells with fura-2 or indo-1. *Cardiovasc Res* 1995;29:717–726.
73. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B und Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85–100.

## Literatur

74. Cheng L, Yung A, Covarrubias M und Radice GL. Cortactin is required for N-cadherin regulation of Kv1.5 channel function. *J Biol Chem* 2011;286:20478–20489.
75. Molkenin JD und Robbins J. With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:130–136.
76. Nerbonne JM. Studying cardiac arrhythmias in the mouse—a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:83–93.
77. Braz JC, Gregory K, Pathak A *et al.* PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004;10:248–254.
78. Sutherland FJ und Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 2000;41:613–627.
79. Dorn GW, Robbins J, Ball N und Walsh RA. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol* 1994;267:H400–H405.
80. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH und Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 2003;92:904–911.
81. Varro A, Negretti N, Hester SB und Eisner DA. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1993;423:158–160.
82. Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C und Nargeot J. Ca<sup>2+</sup> currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:300–311.
83. Gorski PA, Ceholski DK und Hajjar RJ. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure—a rational approach for disease treatment. *Cell Metab* 2015;21:183–194.
84. Berridge MJ. Calcium microdomains: Organization and Function. *Cell Calcium* 2006;40:405–412.
85. Rizzuto R und Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006;86:369–408.

## Literatur

86. Despa S, Shui B, Bossuyt J, Lang D, Kotlikoff MI und Bers DM. Junctional cleft  $[Ca^{2+}]_i$  measurements using novel cleft-targeted  $Ca^{2+}$  sensors. *Circ Res* 2014;115:339–347.
87. Goonasekera SA und Molkenin JD. Unraveling the secrets of a double life: contractile versus signaling  $Ca^{2+}$  in a cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:317–322.
88. Aimond F, Alvarez JL, Rauzier JM, Lorente P und Vassort G. Ionic basis of ventricular arrhythmias in remodeled rat heart during long-term myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1999;42:402–415.
89. Bénitah JP, Kerfant BG, Vassort G, Richard S und Gómez AM. Altered communication between L-type calcium channels and ryanodine receptors in heart failure. *Front in Biosci* 2002;7:263–275.
90. Dobrev D und Wehrens XHT. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ Res* 2014;114:1311–9; discussion 1319.
91. Bitó V, Heinzel FR, Biesmans L, Antoons G und Sipido KR. Crosstalk between L-type  $Ca^{2+}$  channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. *Cardiovasc Res* 2008;77:315–324.
92. Benitah JP, Alvarez JL und Gómez AM. L-type  $Ca^{2+}$  current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:26–36.
93. Sato PY, Chuprun JK, Schwartz M und Koch WJ. The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev* 2015;95:377–404.
94. Liu W, Deng J, Wang G *et al.* KCNE2 modulates cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channel. *J Mol Cell Cardiol* 2014;72:208–218.
95. Linke WA und Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 2014;114:1052–1068.
96. Stienen GJM. Pathomechanisms in heart failure: the contractile connection. *J Muscle Res Cell Motil* 2015;36:47–60.
97. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM *et al.* Crucial role for  $Ca^{2+}$  /calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 2013;112:664–674.

## *Literatur*

98. Dillmann W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev* 2010;15:125–132.
99. Biondi B. Mechanisms in endocrinology: Heart failure and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol* 2012;167:609–618.
100. LeRoith D und Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003;195:127–137.
101. Sun H, Kerfant BG, Zhao D *et al.* Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling. *Circ Res* 2006;98:1390–1397.
102. Lu Z, Jiang YP, Wang W *et al.* Loss of cardiac phosphoinositide 3-kinase p110 alpha results in contractile dysfunction. *Circulation* 2009;120:318–325.

# Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
BSA	Bovine Serum Albumine
CCD	Charge-coupled Device
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin Kinase II
ECLIA	Electrochemilumineszenz-Immunoassay
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESC	European Society of Cardiology
fps	frames per second, <i>engl. für</i> Bilder pro Sekunde
FS	fractional shortening
HDACs	Histondeacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny1)-ethansulfonsäure
HF-PEF	heart failure with preserved ejection fraction
HF-REF	heart failure with reduced ejection fraction
HBBS	Hank's Buffered Salt Solution
IGF-1	Insuline like growth factor 1
IGFR	Insulin like growth factor-Rezeptor
IR	Insulin-Rezeptor
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KO	Knockout
LQTS	Long-QT-Syndrom
LTCC	L-type Calcium Channel
LV	Linker Ventrikel

## *Abkürzungsverzeichnis*

NFAT	Nuclear factor of activated T-Cells
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Sarcoplasmatic Reticulum Ca-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TTE	transthorakale Echokardiographie
WT	Wildtyp

# Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Leonhard Schleußner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *KCNE2-Deletion führt zu Herzinsuffizienz im Mausmodell* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Leonhard Schleußner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. C. Köhncke, U. Lisewski, **L. Schleußner**, C. Gärtner, S. Reichert, and T. K. Roepke. Isolation and Kv channel recordings in murine atrial and ventricular cardiomyocytes. *J Vis Exp*, e50145(73), 2013.

Beitrag im Einzelnen:

Herr Schleußner hatte erheblichen Anteil an der Optimierung der in der Publikation beschriebenen Methode und verfasste als Koautor Teile des Manuskriptes.

Unterschrift, Datum und Stempel  
des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift  
des Doktoranden



# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

## Publikationen

1. Köhncke C, Lisewski U, **Schleußner L**, Gaertner C, Reichert S und Roepke TK. Isolation and Kv channel recordings in murine atrial and ventricular cardiomyocytes. *J Vis Exp* 2013;e50145

## Kongressbeiträge

1. Köhncke CF, Lisewski U, **Schleußner L**, Morano I, Abbott GW, Baumann G, Haverkamp W, Röpke TK. Abstract 17523: Cardiac Hypertrophy, Heart Failure and Altered Calcium Handling in Aged Kcne2<sup>-/-</sup> Mice. Oral presentation auf der AHA-Jahrestagung 2012. *Circulation* 2012; 126: A17523
2. Köhncke C, Gärtner C, Lisewski U, **Schleußner L**, Abbott GW, Morano I, Haverkamp W, Baumann G, Röpke T. Cardiac hypertrophy/heart failure and altered Calcium handling in aged KCNE2<sup>-/-</sup> mice. Oral presentation auf der DGK-Jahrestagung 2012. *Clin Res Cardiol* 101, Suppl 1, April 2012

# Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Torsten K. Röpke für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und das in mich gesetzte Vertrauen. Meinem Mentor Herrn Dr. med. Clemens Köhncke gebührt als Betreuer dieser Dissertation der größte Dank. Ohne seine vielen Ratschläge, Unterweisungen, Hilfestellungen und seinen humorvollen Charakter hätte ich diese Arbeit nicht fertigstellen können. Durch sein intensives Mentoring und seine mitreißende Freude am Experimentieren war die Arbeit im Labor nie langweilig. Bei Carolin Gärtner und Saskia Reichert möchte ich mich für exzellente technische Assistenz bedanken, bei Dr. rer. nat. Ulrike Lisewski und David Mundiger für viele hilfreiche Hinweise.

Auch Herrn Prof. Dr. Ingo Morano vom MDC, der die Kooperation unserer Labore ermöglichte, und seinen Mitarbeitern Dr. rer. nat. Hannelore Haase, Petra Domaing, Petra Sakel und Steffen Lutter gebührt mein Dank.

Bei Herrn Prof. Geoffrey W. Abbott, PhD, von der University of California, Irvine, sowie seinem ganzen Labor möchte ich mich für die Aufnahme und Unterstützung bedanken, die ich während eines Gastaufenthaltes im Rahmen dieser Dissertation erfahren durfte.

Am wichtigsten jedoch war die kontinuierliche Unterstützung durch meine Familie, meine Freunde und meine Freundin Katharina. Ohne eure Geduld, eure Motivation und euer Verständnis wäre diese Arbeit nie fertig geworden. Vielen Dank!