Aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Auswirkungen genetischer und struktureller Veränderungen im Kalziumregulator Phospholamban auf die myokardiale Kraftentwicklung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Maximilian Anselm Brinkmann

> > 2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Meiner lieben Frau Viviana.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Funk F, Kronenbitter A, Isić M, Flocke V, Gorreßen S, Semmler D, **Brinkmann M**, Beck K, Steinhoff O, Srivastava T, Barbosa DM, Voigt K, Wang L, Bottermann K, Kötter S, Grandoch M, Flögel U, Krüger M, Schmitt JP, (2022), Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, (173) 47-60

ZUSAMMENFASSUNG

Dilatative Kardiomyopathien (DCM) sind Erkrankungen des Herzmuskels, die zu einer Erweiterung der Herzkammern und progredienter Herzinsuffizienz führen. Die Gründe, die zu einer DCM führen sind vielfältig. Unter den genetischen Formen sind Gendefekte in mehr als 30 verschiedenen kardialen Proteinen bekannt. Eine besonders maligne Mutation ist der heterozygote Austausch der Aminosäure Arginin gegen Cystein in Position 9 (R9C) des myozytären Kalziumregulators Phospholamban (PLN). PLN ist ein alpha-helikales Protein, das *in vivo* überwiegend als Pentamer vorliegt, jedoch nur in monomerer Form die Kalzium-ATPase 2a des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) hemmt. Die SERCA2a stellt den molekularen Motor des Kalziumkreislaufs der Herzmuskelzellen dar und ist damit ein zentraler Regulator der Kontraktion und Relaxation des Herzens.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Kraftentwicklung linksventrikulärer Papillarmuskeln aus transgenen Mausmodellen mit der PLNR9C-Mutation, mit und ohne PLN-Pentamere beziehungsweise ganz ohne PLN (PLNKO) im Vergleich zu Tieren mit unverändertem PLN (WT). Für die Untersuchungen wurde jeweils der posteriore Papillarmuskel aus den Herzen isoliert und die Kraftentwicklung im Organbad unter elektrischer Stimulation (1 Hz) und Veränderung der Vorspannung sowie unter beta-adrenerger Aktivierung mit Isoprenalin gemessen. Zur Normalisierung der ermittelten Werte auf die Dicke der einzelnen Papillarmuskeln wurden Messungen ihres Durchmessers und Querschnitts nach histologischer Aufarbeitung der Papillarmuskeln durchgeführt.

Die Stimulation mit Isoprenalin führte bei allen Mauslinien außer bei PLNR9C und PLNKO zu einem signifikanten Anstieg der maximal generierten Kraft und der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) der Geschwindigkeit des Kraftabfalls war für die Mauslinie PLNR9C tendenziell gegenüber dem WT und Mutanten ohne PLN-Pentamere (mPLNR9C) erhöht. Ohne PLNR9C-Mutation waren die Isoprenalin-vermittelten Steigerungen der maximalen Kraftentwicklung und der Kinetik von Kraftzunahme und -abfall in Muskeln mit PLN-Pentameren höher als in den Mauslinien mit ausschließlich monomerem oder keinem PLN, teilweise sogar signifikant. Gerade bei niedrigen Isoprenalin-Dosierungen waren jedoch die Dosis-Wirkungskurven nach rechts verschoben. Insbesondere waren hier höhere Isoprenalin-Konzentrationen erforderlich, um die gleiche Geschwindigkeit des relativen Kraftabfalls zu erreichen, wenn PLN-Pentamere gebildet werden konnten. Eine schrittweise Erhöhung der Vorspannung der Papillarmuskeln als Surrogat für eine Vorlasterhöhung führte hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden der Kraftgenerierung zwischen den einzelnen Gruppen. Die maximale Kraft entwickelten die Papillarmuskeln bei einer Vorspannung von 1 mN. Der Vergleich der ein- und zweidimensionalen Verfahren zur Normalisierung der Rohwerte auf die Dicke der Papillarmuskeln ergab eine prozentual niedrigere Varianz und im Mittel etwa dreifach höhere Werte, wenn die Muskelquerschnitte histologisch ermittelt worden waren.

Die Daten zeigen eine Beeinflussung der Kraftentwicklung von Herzmuskelgewebe durch PLN-Pentamerisierung, insbesondere eine Dämpfung ihrer Sensibilität auf beta-adrenerge Stimulation bei erhaltener Maximalantwort. In Gewebe mit der PLNR9C-Mutation kann der Verlust der Pentamerbildung zudem die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven aufheben. Anders als bei der Isoprenalin-Antwort ergaben sich keine Hinweise für einen Einfluss der untersuchten PLN-Varianten auf die generierte Muskelkraft in Abhängigkeit von der Vorlast des Herzens.

SUMMARY

Dilatative cardiomyopathies (DCM) are diseases of the heart muscle, which lead to dilatation of the chambers of the heart and progressive heart failure. There are many reasons leading to a DCM. Among the genetic forms mutations are so far known in over 30 different cardiac proteins. A particularly malignant mutation in cardiomyocytes is the heterozygous exchange of the amino acid arginine for cysteine in position 9 (R9C) of the calcium regulator Phospholamban (PLN). PLN is an alpha-helical protein, which is mostly pentamerized *in vivo*, but inhibits the calcium ATPases SERCA2a in its monomeric form. SERCA2a constitutes the main engine of the calcium cycle in cardiomyocytes and thus works as a central regulatory protein for contraction and relaxation of the heart.

The present work aimed to characterize the force development of papillary muscles in left ventricles of the heart based on transgenic mouse models with the PLNR9C mutation, mice with and without the ability to form PLN pentamers as well as mice without PLN (PLNKO) compared with wildtype mice with unmodified PLN (WT). For the experiments the posterior papillary muscle was isolated, and the force development was measured in an organ bath. The muscles were electrically stimulated (1 Hz) and experiments got carried out with changes to the tension load as well as beta-adrenergic stimulation with Isoprenaline. To normalize the determined values to the thickness of the papillary muscles, measurements of the diameter and cross section were performed for each muscle.

Stimulation with Isoprenaline resulted in a significant increase in the maximum force generation, contraction as well as relaxation velocity in all groups except PLNR9C and PLNKO. The half-maximal effective concentration (EC_{50}) of the relaxation velocity showed a trend to increase in the R9C group compared to WT mice and mice without pentameric PLN (mPLNR9C). Without the PLNR9C mutation, isoprenaline-mediated increases in force, contraction and relaxation velocity were higher in muscles with PLN pentamers than in the mouse lines with only monomeric or no PLN, in some cases even significantly so. Especially under low isoprenaline contractions the dose effect curves were shifted to the right. Groups with pentameric PLN needed higher concentrations to reach the same relative relaxation velocity. A gradual increase in tension load as a surrogate for the cardial preload showed no significant differences in force development between the different groups. All groups developed maximal twitch force at a preload of 1 mN. Comparisons of the one- and two-dimensional normalization showed a lower percentual variance and, on average, approximately three times higher values for the cross-section measurements.

The data suggests that PLN pentamerization increases the range in which beta-adrenergic stimulation can influence the force development of the cardiac muscle. Cardiomyocytes with only monomeric PLN seem to react faster when exposed to low concentrations of Isoprenaline. The PLNR9C point mutation, which leads to DCM, tends to show a rightward shifted dose effect curve, especially for the relaxation velocity. The loss of pentamerization in mice with this genetic disorder (mPLNR9C) completely cancels this trend, suggesting a pathogenetic relevance for pentameric PLN. Contrary to the isoprenaline response, there was no evidence for an influence of the PLN variants on the generated twitch force.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

А	Alanin
α	Alpha
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
A-Domäne	Aktuator-Domäne
AFA	Austausch von Cystein gegen Alanin und Phenylalanin im PLN-Gen
	(C38A, C41F, C46A)
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
BCA	Bicinchoninsäure, engl.: bicinchoninic acid
bp	Basenpaare
Ċ	Cystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca^{2+}	Kalziumionen
Δ	Delta
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
ECL	Engl.: Enhanced chemiluminescence
EC_{50}	Effektive Konzentration, bei der 50 % der Kraft erreicht sind
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
F	Kraft
v	Gamma
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
Hz	Herz
Kan	Kapitel
kDa	Kilodalton
K1	Konformationszustand 1 der SERCA2a
K1P	Phosphorylierter Konformationszustand 1 der SERCA2a
K2	Konformationszustand 2 der SERCA2a
K2P	Phosphorylierter Konformationszustand 2 der SERCA2a
1	Liter
LOD	Engl · Logarithm of the odds
log	Logarithmus
LW	Leerwert
M	Molar
M-Domäne	Membran-Domäne
	Mikrogramm
μs	Mikroliter
μn um	Mikrometer
μM	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mm^2	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
M DI N	Monomeres DI N
mDI NDOC	Tiere mit transgenem monomeren DI NDOC
M "DI M	Manamanaa mhaamhamiliantaa DI N
wi-prlin	wonomeres phosphoryhettes PLN

Myh6	Engl.: Myosin heavy chain 6
N-Domäne	Nukleotid-bindende-Domäne
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Р	Phosphatrest
P ₁₋₄	Papillarmuskel 1-4
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Domäne	Phosphorylierungsdomäne
РКА	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PLNKO	Tiere ohne PLN, engl.: knockout
PLNR9C	Austausch von Arginin gegen Cystein an Position 9 im Phospholamban
P-PLN	Pentameres PLN
P-pPLN	Phosphoryliertes pentameres PLN
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
SDS	Natriumaurylsulfat
Ser ¹⁶	Serin16
SEM	Standardfehler, engl.: standard error of mean
SERCA2a	Kalzium-ATPase 2a des sarko- und endoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
t	Zeit
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TG	Transgen
tgmPLN (A)	Tiere mit ausschließlich transgen monomerem PLN
tgPLN	Tiere mit ausschließlich transgenem WT-PLN
Thr ¹⁷	Threonin17
Troponin I	Inhibitiorische Domäne von Troponin
Troponin C	Kalzium-bindende Domäne von Troponin
Troponin T	Tropomyosin-bindende Domäne von Troponin
V ₁₋₄	Ventrikel 1-4
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius
%	Prozent

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammen	fassung I
Summary .	
Abkürzung	gsverzeichnisIII
1 Einle	itung1
1.1	Physiologische Kontrolle der kardiomyozytären Kontraktion1
1.2	Einfluss beta-adrenerger Signale auf Kardiomyozyten3
1.2.1	Aufbau und Funktion der SERCA2a5
1.2.2	Dysfunktion der SERCA2a
1.3	Einfluss von Phospholamban auf die SERCA2a8
1.3.1	Aufbau von Phospholamban
1.3.2	Interaktion von Phospholamban und der SERCA2a9
1.4	Isoprenalin10
1.5	Mutationen im Phospholamban-Gen10
1.5.1	PLNR9C
1.5.2	Die monomere Mutation AFA12
1.5.3	Verwendete Mauslinien
1.6	Das Organbad14
1.7	Ziele der Arbeit
2 Mate	rial und Methoden16
2.1	Material16
2.1.1	Chemikalien16
2.1.2	Verbrauchsmaterialen17
2.1.3	Laborgeräte17
2.1.4	Lösungen
2.1.5	Antikörper21
2.1.6	Primer für Genotypisierung der Mäuse
2.2	Methoden
2.2.1	Züchtung und Haltung von transgenen Mäusen

4	2.2.2	Untersuchte Mauslinien	22
4	2.2.3	Organbadversuche	23
	2.2.4	Bestimmung des Muskelquerschnittes	27
-	2.2.5	Auswertung der Organdbadversuche	28
	2.2.6	Detektion von Phospholamban mittels Western-Blot-Analyse	29
-	2.2.7	Statistische Auswertung	30
3	Ergel	onisse	31
3.	1	Western-Blot-Analyse an Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur	31
3.2	2	Analyse der Normalisierung von Papillarmuskeln	32
3.3	3	Untersuchung der Stimulierbarkeit der einzelnen Mauslinien im Organbad	36
3.4	4	Charakterisierung von PLNR9C-Mäusen mit Hilfe des Organbads	38
-	3.4.1	Untersuchung der Vorspannung bei der Mutation PLNR9C	38
	3.4.2	Untersuchung der Isoprenalin-Stimulation bei der Mutation PLNR9C	43
	3.4.3	Auswertung der EC ₅₀ bei der Mutation PLNR9C	48
3.5	5	Charakterisierung von tgPLN-Mäusen mit Hilfe des Organbads	50
-	3.5.1	Untersuchung der Vorspannung bei der Mauslinie tgPLN	50
-	3.5.2	Untersuchung der Isoprenalin-Stimulation bei der Mauslinie tgPLN	55
	3.5.3	Auswertung der EC50 bei der Mauslinie tgPLN	60
4	Disku	ussion	63
4.	1	Einfluss der Phospholamban-Pentamere auf die Kraftentwicklung	63
4	4.1.1	Vorspannungsmessungen	67
4.2	2	Einfluss der R9C-Mutation auf die Kraftentwicklung	68
4.3	3	Nachweis von Phospholamban in Papillarmuskulatur und Ventrikelmuskulatur	69
4.4	4	Evaluation der Versuchsdurchführung und Normalisierung der Papillarmuskeln	70
4.5	5	Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln im Organbad	71
4.6	5	Limitationen der Arbeit	73
4.	7	Schlussfolgerungen	74
4.8	8	Ausblick	75
5	Litera	atur- und Quellenverzeichnis	76
6	Dank	sagung	80

1 EINLEITUNG

1.1 PHYSIOLOGISCHE KONTROLLE DER KARDIOMYOZYTÄREN KONTRAKTION

Das Herz ist ein zentrales Organ im menschlichen Körper. Die kontinuierliche Pumpfunktion hält den Blutkreislauf aufrecht und versorgt alle Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen. Für die Pumpfunktion spielen die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) eine vorrangige Rolle. Obwohl diese zahlenmäßig mit 31 % nur die zweitgrößte Zellpopulation im Herzen darstellen [1], machen sie aufgrund ihrer Größe bis zu 80 % des Zellvolumens des Herzens aus. Neben den Kardiomyozyten finden sich endotheliale Zellen, Leukozyten und Fibroblasten, wobei die endothelialen Zellen die zahlenmäßig größte Population darstellen [1]. Aufgrund der funktionellen Bedeutung der Kardiomyozyten im Rahmen der Herzfunktion wurden diese bzw. deren Funktionsweise in der vorliegenden Arbeit näher analysiert.

Die Kontraktion läuft im Einzelnen wie folgt ab: Zu Beginn wird über das Reizleitungssystem des Herzens vom Sinusknoten ein elektrischer Impuls zu den Kardiomyozyten weitergeleitet. Dieser führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, den Dihydropyridinrezeptoren (DHPR). Diese liegen im transversalen tubulären System, welches aus Einstülpungen der Kardiomyozytenmembran besteht (T-Tubuli). Dadurch liegen die DHPR in räumlicher Nähe zu den Ryanodinrezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Der elektrische Impuls des Reizleitungssystems führt zu einer Öffnung der DHPR und damit zu einem Kalziumeinstrom ins Zytosol. Aufgrund der beschriebenen räumlichen Nähe zu den RyR können diese das Kalzium direkt binden. Hierdurch wird zusätzlich ein Kalziumeinstrom aus dem SR in das Zytosol ermöglicht. Der Kalziumeinstrom über die DHPR macht im Gegensatz zu den RyR einen wesentlich kleineren Anteil an der Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Zelle aus. Die DHPR erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf 10-20 µM, während der Einstrom über die RyR die Kalziumkonzentration auf 200-400 µM erhöht [2].

Das in das Zytosol freigesetzte Kalzium vermittelt die kardiale Kontraktion. Diese wird unter Verbrauch des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) über die sogenannten Sarkomere ermöglicht. Sarkomere stellen die kleinste kontraktile Einheit einer Muskelfaser dar und geben der Muskulatur die bekannte Querstreifung. Der Aufbau und die Funktionsweise der Sarkomere sind schematisch in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt.



Abb. 1: Aufbau und Funktionsweise der Sarkomere

Regulation der Sarkomer- und damit der Muskellänge über die Breite der I-Bande, Bindung des Myosinköpfchens bei Kalziumeinstrom an Aktin realisiert die Kontraktion und damit die Verkürzung der Sarkomere; mittig ist die Sarkomereinheit in Kontraktion und unten in Relaxation dargestellt; Abkürzungen: Ca²⁺ = Kalziumionen (Erstellt mit [3] in Anlehnung an [4]).

Sarkomere sind aus zwei verschiedenen Komponenten aufgebaut, dem dünneren Aktin- und dem dickeren Myosinfilament. Der Name der Filamente ist durch das jeweils wichtigste Protein bestimmt. Das Myosinfilament ist an den Z-Scheiben durch das Protein Titin elastisch verankert. In der M-Linie sind die Myosinfilamente durch Strukturproteine verbunden. Die Aktinfilamente sind nur einseitig an der Z-Scheibe durch das alpha (α) - Aktinin verankert. Das Aktinfilament enthält die Bindungsstelle für das Myosinköpfchen, welches zu einer Verkürzung in der Lage ist und damit die Kontraktion realisiert.

Die hochaffine Bindungsstelle von Myosin an Aktin wird ohne Kalzium von einem Komplex aus Troponin I (inhibitorische Untereinheit), Troponin C (Kalzium-bindende Untereinheit), Troponin T (Tropomyosin-assoziierte Untereinheit) und Tropomyosin verdeckt. Bindet nun Kalzium an das kardiale Troponin C, verschiebt sich dieser Komplex und gibt die hochaffine Myosin-Bindungsstelle an Aktin frei. Die Verbindung zwischen Myosin und Aktin löst eine Konformationsänderung des Myosins aus, wodurch es zu einer Verschiebung der Filamente gegeneinander kommt. Dies führt additiv über alle in Reihe geschalteten Sarkomere zu der sichtbaren Verkürzung der gesamten Muskelzelle. Die einzelnen Muskelzellen sind als Muskelfasern (Myofibrillen) organisiert und ermöglichen dadurch die konzentrische Kontraktion des Herzmuskels. Im Umkehrschluss führt eine Verringerung der Konzentration an Kalzium zu einem Verdecken der hochaffinen Myosin-Bindungsstelle und der Muskel relaxiert. Diese zyklische Steuerung der Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels über Kalzium wird als kardiomyozytärer Kalziumkreislauf (engl.: *calcium cycling*) bezeichnet.

Die Kalziumregulation hat auch klinisch eine wichtige Rolle. Einige Medikamente, welche eine Veränderung der kardialen Kontraktilität vermitteln, wirken auf den intrazellulären Kalziumhaushalt. Dabei werden Medikamente zur Beeinflussung sowohl der Kontraktion als auch der Relaxation genutzt. Kalzium-Antagonisten wie Verapamil führen zu geringeren intrazellulären Kalziumspiegeln und damit zu einer geringeren Kraftentwicklung und reduziertem Energieverbrauch [5]. Herzglykoside wie Digitoxin führen hingegen zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel und verbessern die Kontraktilität [6].

1.2 EINFLUSS BETA-ADRENERGER SIGNALE AUF KARDIOMYOZYTEN

Die Regulation des Herzens erfolgt über das autonome Nervensystem. Dabei ist vor allem der Sympathikus entscheidend, da dieser über die beta (β)-Rezeptoren die Kraftsteigerung (positive Inotropie), Verbesserung der Relaxation (positive Lusitropie) und Erhöhung der Schlagfrequenz (positive Chronotropie) des Herzens erwirkt. Hierdurch kann das Herzzeitvolumen, sprich die Menge Blut, die pro Minute durch den Organismus gepumpt wird, den aktuellen Anforderungen z. B. bei körperlicher Belastung angepasst werden. Eine derartige Leistungssteigerung des Herzens ist insbesondere in Stresssituationen wichtig und ermöglicht dem Körper eine Reaktion auf Bedrohungen. Diese Reaktion wird auch Kampf oder Flucht (*fight or flight*) Reaktion genannt.

Eine Steigerung des Herzminutenvolumens durch Vergrößerung des intrakardialen Volumens oder durch Steigerung des prozentualen Anteils des ausgeworfenen Blutvolumens am gesamten intrakardialen Blutvolumen ist aufgrund anatomischer Grenzen nur bedingt möglich. Die weitaus größte Anpassungsfähigkeit besteht bei der Herzfrequenz. Um ein höheres Herzminutenvolumen zu generieren ist dabei einerseits wichtig, dass die Kontraktilität zunimmt, also das Herz durch eine verstärkte Kraftentwicklung das Volumen in der Systole, der Auswurfphase des Herzens, schneller auswirft. Andererseits muss der Muskel schnell genug relaxieren, um eine ausreichend lange Diastole, die Füllungsphase des Herzens, zu ermöglichen. Letztere ist der limitierende Faktor bei der Steigerung der Herzfrequenz.

Die Transmitter des Sympathikus sind Adrenalin und Noradrenalin. Diese wirken am Herzen auf die G-Protein gekoppelten β -Rezeptoren. Dieser G_s-Protein-gekoppelte Rezeptor vermittelt seine Wirkung über die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem sekundären Signalprotein. Bei Aktivierung des Rezeptors wird an der assoziierten a-Untereinheit das gebundene Guanidindiphosphat gegen Guanidintriphosphat ausgetauscht. In weiterer Folge dissoziieren die Untereinheiten in die aktivierten Untereinheiten G α und G $\beta\gamma$ (gamma). Die G α -Untereinheit führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) und damit zu einer vermehrten Bildung von cAMP. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Im Folgenden phosphoryliert die PKA im Sinne einer Signalkaskade verschiedene Zielproteine. Kardiomyozytäre Ziele sind dabei z. B. Phospholamban (PLN), der DHPR oder das kardiale Troponin I. Durch die Phosphorylierung von Troponin I wird die Dissoziation von Kalzium an Troponin C beschleunigt und so die Relaxation verbessert. Die Phosphorylierung des DHPR erhöht dessen Offenwahrscheinlichkeit. Der intrazelluläre Kalziumgehalt steigt und die Kontraktion wird verstärkt. Die Phosphorylierung von PLN wiederum hat eine Enthemmung der Kalzium-ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) zur Folge. Diese fördert Kalzium aus dem Zytosol zurück in das SR. Dies führt einerseits zu einer verbesserten Relaxation durch schneller abfallende intrazelluläre Kalziumspiegel, andererseits wird das SR vermehrt mit Kalzium gefüllt und es wird im nächsten Zyklus mehr Kalzium ausgeschüttet und damit die Kontraktilität verbessert. Eine schematische Darstellung der Wirkung von Kalzium und βadrenerger Stimulation im Herzmuskel zeigt Abb. 2.



Abb. 2: Wirkung von Kalzium und β-adrenerger Stimulation im Herzmuskel

Kalzium wird über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle in die Zelle transportiert; Kalzium initiiert in der Herzmuskelzelle eine muskuläre Kontraktion; zur Relaxation wird Kalzium in das SR transportiert; dies gelingt mithilfe der SERCA2a sowie PLN; eine Phosphorylierung von PLN wie beispielsweise durch Isoprenalin erhöht die Aktivität der SERCA2a und beschleunigt so den Kalzium-Rücktransport in das SR; Abkürzungen: Iso = Isoprenalin; Na⁺ = Natriumionen; NCX = Natrium-Kalzium-Austauscher; P = Phosphoryliert; (erstellt mit [3] in Anlehnung an [7]).

1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION DER SERCA2A

Bei der Kontrolle der Kalziumkonzentration in der Herzmuskelzelle im Rahmen von Kontraktion und Relaxation des Herzens spielen Kalzium-ATPasen eine große Rolle. Diese pumpen unter Verbrauch von ATP, dem Energielieferanten der Zellen, das Kalzium aus dem Intrazellulärraum heraus. Beim Ausschütten des Kalziums wird wie bereits beschrieben der Großteil des Kalziums aus dem SR freigesetzt. In Analogie hierzu wird auch der Großteil des Kalziums, etwa 90 %, bei der Relaxation wieder in das SR zurückgepumpt [8]. Dieser aktive Transport von Kalzium aus dem Zytosol in das SR wird im Herzen durch die Kalzium-ATPase SERCA2a realisiert.

Die SERCA2a gehört zur Gruppe der Phosphat-Typ ATPasen. Diese transportieren unter Verbrauch der Energie aus der ATP-Hydrolyse Ionen über eine Zellmembran entgegen dem Konzentrationsgradienten. Dabei ist bei allen Phosphat-Typ ATPasen der grundsätzliche Aufbau einheitlich. Die Grundeinheit bilden vier in der Tierwelt hoch konservierte Proteindomänen. Diese sind die Phosphorylierungs-Domäne (P-Domäne), die Nukleotid-bindende-Domäne (N-Domäne), die Aktuator-Domäne (A-Domäne) und die Membran-Domäne (M-Domäne) [9]. Die P-Domäne hat den katalytischen Kern, in welchem an einen Aspartat-Rest die Pyrophosphat-Gruppe gebunden wird. Dieser Teil ist die am meisten konservierte Domäne und namensgebend für diese Gruppe der ATPasen. Die N-Domäne beinhaltet die Nukleotid-bindende-Tasche, wobei nur das Adenosin in die Tasche passt und die Triphosphat-Gruppe in das Zytosol reicht. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Übertragung der Phosphat-Gruppe an die P-Domäne. Die Funktion der A-Domäne ist noch nicht abschließend geklärt, die aktuelle Hypothese beinhaltet jedoch zwei Aufgaben. Zum einen schützt die A-Domäne in der einen Konformation die Phosphat-Gruppe, zum anderen verschließt diese möglicherweise in einer anderen Konformation mittels einer Scherenbewegung den Zugang von Ionen zum Ionenkanal [9]. Die M-Domäne schließlich beinhaltet die zehn Transmembranhelices mit den beiden Ionenbindungsstellen. Die M-Domäne unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Phosphat-Typ ATPasen am meisten.

Die SERCA2a hat unterschiedliche Konformationszustände (K), welche die Affinität des Enzyms zu Kalzium bestimmt. Abb. 3 zeigt den Ablauf dieses Konformationszyklus der SERCA2a.



Abb. 3: Konformationszyklus der SERCA2a

Es werden verschiedene Konformationszustände der SERCA2a unterschieden; SERCA1 (K1-Zustand) nimmt 2 Kalziumionen auf (SERCA1-Ca2); diese nimmt wiederum einen Phosphat-Rest aus ATP auf (SERCA1-P(Ca2), K1P-Zustand); die Bindung von Kalzium und ATP induziert eine Konformationsänderung (SERCA2-PCa2, K2P-Zustand); dadurch wird zunächst Kalzium (SERCA2-P) und anschließend Phosphat abgegeben (SERCA2, K2-Zustand); danach ist das Enzym wieder bereit Kalziumionen aufzunehmen (SERCA1, K1-Zustand) (in Anlehnung an [10]).

Die SERCA2a hat zwei hauptsächliche Konformationszustände, K1 und K2. Dazu kommen die beiden intermediären Zustände K1P (K1 phosphoryliert) und K2P (K2 phosphoryliert). Im K1-Zustand besitzt die SERCA2a eine hohe Affinität zu Kalzium. Nach Bindung von zwei Kalziumionen an der M-Domäne bindet die N-Domäne ein Molekül ATP, wodurch das Enzym in den K1P-Zustand übergeht. Durch die Übertragung der Phosphat-Gruppe an den Aspartat-Rest wechselt das Enzym vom K1P- in den K2P-Zustand. Durch die Konformationsänderungen sinkt die Affinität zu den Kalziumionen und diese werden freigesetzt. Die Freigabe der Kalziumionen löst subsequent die Hydrolyse der Phosphat-Gruppe aus, woraufhin das Enzym über den K2-Zustand wieder in den K1-Zustand konvertiert und ein neuer Zyklus beginnen kann [11].

1.2.2 DYSFUNKTION DER SERCA2A

Eine Dysfunktion der SERCA2a führt nach heutigem Verständnis zu mehreren Problemen. Auf der einen Seite kommt es in der Diastole zu einer unzureichenden Elimination des zytoplasmatischen Kalziums in das SR, wodurch die Relaxation des Herzens gestört wird. Auf der anderen Seite kommt es in der Systole zu einer geringen Ausschüttung von Kalzium aus dem SR, da dieses in der Diastole nicht ausreichend gefüllt wurde [12]. Dieser geringere Anstieg der Kalziumkonzentration wiederum bedingt eine unzureichende Kontraktion und damit Auswurfleistung des Herzens. Jegliche Veränderung der Aktivität der SERCA2a bedingt somit durch die entsprechende Kalziumkinetik eine veränderte Inotropie und Lusitropie. Um die Aktivität der SERCA2a den Anforderungen der Herzleistung immer anpassen zu können, wird diese auf verschiedenen Ebenen reguliert. Hierzu gehören verschiedene Faktoren wie transmembranöse Peptide und Proteinkinasen [13]. Der Hauptregulator der SERCA2a ist PLN [13].

1.3 EINFLUSS VON PHOSPHOLAMBAN AUF DIE SERCA2A

1.3.1 AUFBAU VON PHOSPHOLAMBAN

PLN ist ein aus 52 Aminosäuren bestehendes transmembranöses Protein des SR und ist physiologisch für die Inhibition der Funktion der SERCA2a verantwortlich. Es wird hauptsächlich in Kardiomyozyten gebildet und prägt dort seine Wirkung aus, kommt in geringerem Umfang jedoch auch in Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur vor [8]. In der Membran des SR liegt PLN als Monomer und Pentamer vor [14, 15]. Die Funktion der Pentamere ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Lange Zeit wurde von einer Speicherfunktion für Monomere ausgegangen. Neuere Erkenntnisse belegen einen Einfluss von PLN-Pentameren auf den Phosphorylierungszustand der PLN-Monomere, worüber PLN-Pentamere eine regulatorische Wirkung auf die SERCA2a ausüben [16]. Die inhibierende Funktion von PLN auf die SERCA2a wird über die Monomere vermittelt [14].

Zusätzlich ist das inhibierende Potenzial von PLN auf die SERCA2a abhängig von dem Phosphorylierungsgrad des Proteins. PLN kann an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, an der Position 10 und 16 an einem Serin-Rest und an Position 17 an einem Threonin-Rest. Die Phosphorylierung an Position 10 wird in dieser Arbeit vernachlässigt, da diese unter β-adrenerger Stimulation nicht phosphoryliert wird [17]. Auch ist nicht bekannt, dass die Phosphorylierung des Serins an Position 10 die Aktivität der SERCA2a beeinflusst. Eine funktionelle Konsequenz für die Kalziumregulation und kontraktile Funktion des Herzens erscheint somit unwahrscheinlich. Das Serin an Position 16 (Ser¹⁶) wird von der PKA phosphoryliert und das Threonin an Position 17 (Thr¹⁷) durch die Kalzium-Calmodulin-abhängige-Kinase II. Durch β-adrenerge Stimulation wird das intrazelluläre cAMP erhöht und die PKA wird aktiviert. Wie bereits in Kapitel (Kap.) 1.2 beschrieben, phosphoryliert die PKA neben PLN noch weitere Proteine. Hierzu gehört der herzspezifische Kalziumkanal RyR 2 [18]. Die Phosphorylierung dieses Kalziumkanals führt zu einem erhöhten Kalziumausstrom aus dem SR und damit einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel. Dieser wiederum aktiviert die Kalzium-Calmodulin-abhängige-Kinase II. Hierdurch wird Thr¹⁷ phosphoryliert. Es ist noch Gegenstand

aktueller Forschungen, inwieweit diese beiden Wege der Phosphorylierung getrennt betrachtet werden sollten oder *in vivo* immer gemeinsam aktiviert werden [17].

1.3.2 INTERAKTION VON PHOSPHOLAMBAN UND DER SERCA2A

PLN ist in unphosphoryliertem Zustand ein Inhibitor der SERCA2a. Dieser Effekt kommt durch die Stabilisierung des K2-Zustandes der SERCA2a durch PLN zustande. In der K2-Konformation kann die SERCA2a kein neues Kalzium binden. Eine höhere Stabilität der SERCA2a im K2-Zustand führt daher zu einer Inhibition des Ionen-Transports. Diese Affinität gilt sowohl für unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes PLN, wobei die Affinität von phosphoryliertem PLN an die SERCA2a deutlich geringer ist [19]. Zudem hat eine Phosphorylierung von PLN eine Hyperextension der zytosolischen Domäne von PLN zur Folge, durch welche die Bindung zwischen der SERCA2a und PLN nicht mehr inhibierend wirkt [20]. Eine schematische Darstellung der Wirkung von PLN an der SERCA2a zeigt Abb. 4.





In unphosphorylierter Form inhibieren PLN-Monomere die SERCA2a, liegt PLN dagegen phosphoryliert vor, transportiert das Enzym ungehemmt Kalzium über das SR (erstellt mit [3] in Anlehnung an [18]).

Bisherige Arbeiten haben bereits gezeigt, dass PLN als Monomer und als Pentamer vorliegt, wobei die vorherrschende Meinung die Pentamer-Fraktion vor allem als Speicher für die PLN-Monomere ansieht [21]. Jüngere Ergebnisse zeigen jedoch, dass PLN nicht nur in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand die SERCA2a unterschiedlich stark inhibiert, sondern auch PLN-Pentamere für die inhibierende Funktion von PLN und damit für die Aktivität der SERCA2a relevant sind [16, 22].

1.4 ISOPRENALIN

In der vorliegenden Arbeit wurde Isoprenalin als Transmitter genutzt. Dieses künstliche Derivat des Adrenalins wurde bereits seit den späten 1930er Jahren untersucht [23]. Seitdem wurde es zur Therapie von kardialen Notfallerkankungen wie dem Herzstillstand und dem kardialen Schock genutzt. Isoprenalin aktiviert unter anderem die β_1 -Rezeptoren des sympathischen Nervensystems, welche eine sympathische Stimulation am Herzen bewirken. Die Phosphorylierung von PLN an Position 16 durch β -adrenerge Stimulation über die PKA führt zu einer maximalen kardialen Stimulation [24]. Die Phosphorylierung von PLN wird dabei insbesondere durch β_1 -Rezeptoren realisiert und weniger durch β_2 -Rezeptoren [25]. Isoprenalin ist gerade daher besonders als β_1 -Agonist zur Untersuchung von PLN im Herzen geeignet.

1.5 MUTATIONEN IM PHOSPHOLAMBAN-GEN

1.5.1 PLNR9C

PLNR9C beschreibt einen Aminosäuretausch aufgrund einer missense-Mutation an Nukleotid 25 des PLN-Gens. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Abfolge der Aminosäuren von PLN, an Position 9 wird Arginin (R) durch Cystein (C) ersetzt (R9C). Der Gendefekt PLNR9C wurde bereits 2003 das erste Mal in einer Familie aus 13 betroffenen Individuen mit hereditärer dilatativer Kardiomyopathie (DCM) beschrieben [26]. Die Patienten entwickelten im Alter zwischen 20 und 30 Jahren eine DCM mit Erweiterung der Ventrikel und Abnahme der Kontraktionsfähigkeit. Nach Symptombeginn entwickelten die betroffenen Personen innerhalb von 5-10 Jahren eine terminale Herzinsuffizienz [26]. Die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten lag ohne Herztransplantation bei 25 Jahren [26]. Im Rahmen der genetischen Untersuchungen errechnete sich bei gleichzeitiger Abwesenheit der Mutation in allen untersuchten nicht betroffenen Familienmitgliedern sowie in über 100 nicht verwandten Chromosomen der *LOD-Score* (*logarithm of the odds*) mit 4,04. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Genvariante rein zufällig gemeinsam mit dem DCM-Phänotyp auftritt, ist daraus folgend nicht einmal 1:10000 [26]. Im Mausmodell konnte speziesübergreifend die PLNR9C- Mutation dieselbe Symptomatik auslösen. Dieses beweist die Kausalität zwischen der PLNR9C-Mutation und der DCM [26, 27].

Die DCM ist eine Erkrankung mit Dilatation des linken Ventrikels und systolischer Dysfunktion ohne Erkrankung der Herzkranzgefäße oder abnormaler Füllung des Ventrikels [28]. Sie geht häufig mit einer Herzinsuffizienz einher, betrifft vermehrt junge Menschen und ist der häufigste Grund für eine Herztransplantation [28]. Je nach Studie wird die Prävalenz mit gut 1/2500 angegeben [29]. Die Mechanismen, welche zu einer DCM führen, sind vielfältig. Ein wesentlicher Bestandteil sind genetische Erkrankungen, insbesondere Mutationen in kardialen Proteinen wie z.B. PLN. Die Vergrößerung der Ventrikel führt zu einer Reduktion der Breite der Muskulatur, welche wiederum die Kontraktilität vermindert. Zusätzlich kann es durch eine Zugkraft auf die Herzklappenebene zu einer Herzklappeninsuffizienz und damit einer Rezirkulation von Blutvolumen kommen. Schließlich führt diese vermehrte Belastung der Herzmuskulatur zu einer Fibrose und damit über eine verminderte Dehnbarkeit des Herzens zu einer weiteren Abnahme der Kontraktilität. Die genauen Ursachen einer DCM sind jedoch im Einzelfall nicht zu bestimmen. Auch entzündliche Prozesse spielen im Rahmen des Krankheitsprogress unter anderem eine bedeutende Rolle.

Im Folgenden wurde der Gendefekt PLNR9C mehrfach innerhalb einer Familie in einer weiteren Studie an 315 südafrikanischen Patienten mit Kardiomyopathie gefunden [27]. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass diese Mutation eine vollständige Penetration mit Entwicklung von Symptomen in der dritten Lebensdekade aufweist und innerhalb von 5-10 Jahren zur manifesten DCM führt [30]. Die Familie aus der zweiten Studie hat keine Verwandtschaft zu den Patienten aus 2003 [26], sodass diese Mutation mindestens zweimal neu entstanden ist. Wie häufig diese Mutation in der Bevölkerung auftritt, ist noch ungeklärt. Die häufigsten Mutationen, die eine DCM auslösen, betreffen die Sarkomere oder das Zytoskelett und somit Strukturen, die direkt für die Kraftgenerierung oder Übertragung verantwortlich sind [31].

In biochemischen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass der Gendefekt PLNR9C die intrazelluläre Kalziumrezirkulation in Herzmuskelzellen verändert [26, 32, 33]. Durch die Bildung von genetisch verändertem PLNR9C wird Wildtyp (WT) - PLN weniger phosphoryliert [26]. Daraus folgt eine verstärkte Inhibition der SERCA2a durch das WT-PLN und ein verlangsamter Rücktransport von Kalzium in das SR.

1.5.2 DIE MONOMERE MUTATION AFA

In verschiedenen Arbeiten wurde bereits mit einer PLN-Mutation gearbeitet, bei welcher an drei Positionen im genetischen Code Cystein (C) gegen Alanin (A) und Phenylalanin (F) ausgetauscht ist (C36A, C41F, C46A; AFA-Mutation). Hierdurch ist PLN nicht mehr in der Lage, Oligomere bzw. Pentamere zu bilden, sondern kommt ausschließlich als Monomer vor [34]. Diese Mutation wurde bisher vor allem genutzt, um die Funktion von PLN-Monomeren zu analysieren und zu verstehen.

Umgekehrt ist aber auch ein Rückschluss auf die Funktion von Pentameren zu ziehen. Für die Hemmung der SERCA2a-Aktivität spielen Pentamere eine indirekte Rolle, indem sie als bevorzugtes PKA-Substrat die Phosphorylierung der PLN-Monomere, der inhibitorischen PLN-Spezies, verringern. Auf diese Weise führen Pentamere zu einer verstärkten SERCA2a-Inhibition und einem verlangsamten Kalziumtransport [16]. Im Rahmen des monomeren AFA-PLNR9C Gendefektes (mPLNR9C) fehlen Pentamere. In Mäusen, die ein mPLNR9C-Transgen exprimieren, entwickelt sich die DCM und die terminale Herzinsuffizienz erst deutlich später. Die Pentamerbildung des PLN scheint daher in der Pathogenese der PLNR9C-induzierten DCM eine wichtige Rolle zu spielen.

1.5.3 VERWENDETE MAUSLINIEN

In der vorliegenden Arbeit wurde als Vergleichsgruppe für die PLNR9C-Mauslinie eine Mauslinie mit transgenem WT-PLN (tgPLN) genutzt. Diese exprimiert wie die PLNR9C-Mauslinie PLN über den transgenen Promotor *Myh6 (myosin heavy chain* 6), kann jedoch kein endogenes PLN mehr bilden (PLN *knockout*). Die PLN-Expression über den *Myh6*-Promotor liegt dabei sowohl von Monomeren als auch von Pentameren auf ähnlichem Niveau mit dem WT. Entsprechend dazu wird für die Mutante mPLNR9C die monomere AFA-PLN-Mutante mit transgenem PLN (tgmPLN A) verglichen, wobei die Gesamtexpression von PLN mit der tgPLN-Mutante vergleichbar ist [16]. In den monomeren Mutanten liegen zwar mehr Monomere vor, wenn jedoch die Pentamere der Gruppe tgPLN in Monomere gespalten werden und die gesamte Expression der PLN-Protomere verglichen wird, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen [16]. Als letzte Vergleichsgruppe kommt darüber hinaus die Gruppe PLNKO (*PLN knockout*) mit vollständiger PLN-Defizienz hinzu, welche die Anpassungsfähigkeit des Papillarmuskels ohne PLN als regulatorisches Protein zeigt. Eine Übersicht, über die verschiedenen Mauslinien und ihre genetischen Merkmale ist in Abb. 5 dargestellt.



Abb. 5: Schematische Darstellung der genetischen Charakteristika der verwendeten Mauslinien

In grau ist das endogene PLN-Allel dargestellt. Orange, violett und blau stellen jeweils die genetisch veränderten PLN-Allele dar. Jedes Allel ist mit dem zugehörigen Promotor dargestellt. Schwarz entspricht dem endogenen Promotor. *Myh6* (rot) führt als transgener Promotor dazu, dass das transgene PLN abgelesen und exprimiert wird.

1.6 DAS ORGANBAD

Das Organbad ist eine gut etablierte Methode, um Gewebe *ex vivo* unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Bereits 1921 wurde das Organbad genutzt. Otto Loewi gelang damit der Nachweis eines Transmitterstoffes des Vagusnervs [35]. Durch spezifische Stimulation des Vagus konnte er den Transmitter freisetzen, der bei Zugabe zu einem denervierten Herzen dieselbe Veränderung wie an einem nerval versorgten Herzen verursachte. Der Transmitter ist heute als Acetylcholin bekannt. Die Vorteile des Organbads sind vielfältig. Zum einen ist die Untersuchung an isoliertem Gewebe möglich. Ein Einfluss des Gefäßtonus oder neurohumoraler Erregung ist dadurch auszuschließen [36]. Zum anderen kann das Gewebe im Anschluss bewusst verschiedenen Bedingungen isoliert ausgesetzt und so physiologische oder pathophysiologische Bedingungen untersucht werden.

Das Organbad stellt einen Zwischenschritt zwischen den Untersuchungen an Zellkulturen (*in vitro*) und dem vollständigen Organismus (*in vivo*) dar. Besonders Muskulatur ist hierbei interessant, da die elektrische Stimulation die Untersuchung ganzer motorischer Einheiten gegenüber einzelnen Zellen ermöglicht. Am Herzen nimmt dies durch die besondere elektromechanische Kopplung der einzelnen Zellen eine besondere Rolle ein. Auch im klinischen Kontext wird das Organbad aktiv genutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde getrennt voneinander sowohl die Vorspannung als auch die Stimulation mit Isoprenalin untersucht. Die elektrische Stimulationsfrequenz wurde in den folgenden Untersuchungen konstant belassen, ist prinzipiell jedoch frei wählbar.

1.7 ZIELE DER ARBEIT

Vorangegangene Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (AG) haben gezeigt, dass neben den PLN-Monomeren auch die PLN-Pentamere für die Aktivität der SERCA2a bedeutsam sind [16]. Zusätzlich wurde für die Mauslinie mPLNR9C ein längeres Überleben nachgewiesen verglichen mit PLNR9Ctransgenen Mäusen, welche Pentamere bilden konnten.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun elektromotorische Charakteristika von Papillarmuskeln der verschiedenen Mauslinien anhand von Messungen im Organbad vergleichend untersucht werden. Ziel ist es, die von den Muskeln unter elektrischer Stimulation entwickelte Kraft in Abhängigkeit von der Vorspannung der Muskeln sowie unter β-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin zu erheben. Hierbei gilt es insbesondere, die Folgen des Gendefektes PLNR9C vor dem Einsetzen struktureller kardialer Veränderungen im Vergleich zu WT-Herzen muriner Tiere zu untersuchen. Zusätzlich soll untersucht werden, welche Rolle pentameres PLN für die Kraftentwicklung hat. Folgende Fragestellungen sind im Speziellen untersucht worden:

1. Inwieweit wirkt sich die *in vitro* gemessene Veränderung im Kalziumkreislauf bei Mäusen mit dem Gendefekt PLNR9C auf die Kontraktion und Relaxation der Papillarmuskulatur aus?

2. Wie unterscheidet sich die generierte Kraft bei Stimulation mit Isoprenalin in Tieren mit pentamerem, monomerem oder ohne PLN?

3. Wie unterscheidet sich die generierte Kraft bei Stimulation mit Isoprenalin in Tieren mit der DCMverursachenden PLNR9C-Mutation mit und ohne die Fähigkeit zur Pentamerbildung?

4. Unterscheidet sich die Reaktion auf die Erhöhung der Vorlast zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen?

5. Welche Vor- und Nachteile bietet das Organbad als Methodik und welche Verbesserungsmöglichkeiten gibt es hinsichtlich der Normalisierung der Muskelpräparate?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG	2267.4
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA	1.02382.0250
CryoCompound	ImmunoLogic a WellMed Company	VWRK1620-C
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG	X997.1
ECL-Reagenz, Luminata Forte (Enhanced chemiluminescence)	Merck KGaA	
Isopentan	Carl Roth GmbH + Co. KG	3927.1
Isoproterenol hydrochlorid	Sigma-Aldrich	16504
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	1.04873.0250
Kaliumchlorid	Merck KGaA	1.04936.0250
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN93.1
Kapa <i>HotStart</i> Maus Genotypisierungs-Kit	Roche Holding AG	KK7352 07961804001
Magnesiumchlorid Hexahydrat	AppliChem GmbH	A3618
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	T888.1
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG	T145.3
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	9265.1
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA	1.06329.1000
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG	6771.1
Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Bicinchoninsäure)	Thermo Fisher Scientific	23225
<i>Quick-load 100 bp DNA Loader</i> (bp = Basenpaare; DNA = Desoxyribon	BioLabs ukleinsäure)	NO467s

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
RedSafe TM Nucleic Acid Staining Solution	iNtRon Biotechnology	21141
Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	A124.2
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG	0183.3
Trizma-Base	Sigma-Aldrich	T1503-1

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALEN

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Histoacryl-Gewebekleber	B. Braun SE	1050052
Immobilon [®] -P PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid)	Merck KGaA	
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH	03-0060

2.1.3 LABORGERÄTE

Gerät	Hersteller	Gerätenummer
Automatic Organ Bath	Panlab	
Dispergierwerkzeug Ultra-Turrax®	Ika®-Werke GmbH & Co. KG	T 10 basic; S 10 N-5 G
Feinwaage	Sartorius AG	2001 MP2
Force Transducer	ADInstruments	MLT0420
Histologiemikroskop Seriennr. 3525000712	Carl Zeiss AG	Imager.M2, Axio
ZEN 2 pro	Carl Zeiss AG	
Power Supply 232	Carl Zeiss AG	
AxioCam HRc		426510-9901-000
ImageJ		2.1.0/1.53c

Gerät	Hersteller	Gerätenummer
Kryostat	Leica	CM1850
Präpariermikroskop	Leica	M50
PCR-Cycler (Polymerasekettenreaktion)	Peqlab Biotechnologie GmbH	
Powerlab	Panlab	4/35
Quantity1 Analysesoftware		
Quantum [®] EX Hochreinigungssäule	Merck KGaA	QTUM000EX
Stimulator	Panlab	LE 12406 TC
Stromquelle	Biometra GmbH	68650
Thermostat	Panlab	LE 13206
UV-Kamerasystem (Gel Doc Imager)	Bio-Rad Laboratories, Inc.	universal hood II

2.1.4 LÖSUNGEN

Kardioplege Lösung [37]

Reinstwasser	11
Natriumchlorid	0,12 M
Natriumhydrogencarbonat	10,00 mM
Kaliumchlorid	15,96 mM
Magnesiumchlorid Hexahydrat	15,99 mM
Kalziumchlorid	1,17 mM

Primer Mix

Kapa Enzym	7,5 µl
113_Forward Primer	0,75 µl
113_Reverse Primer	0,75 µl
PscTG_Forward Primer	0,75 µl
PscTG_Reverse Primer	0,75 µl
H ₂ O (Wasser)	3,5 µl

Tyrode-Nährlösung

Natriumchlorid	0,12 M
Kaliumchlorid	4,7 mM
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0,81 mM
Natriumhydrogencarbonat	24,88 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,18 mMl
D(+)-Glucose	9,99 mM

2.1.4.1 PUFFER

Blottingpuffer

Tris	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol (v/v)	20 %

Lämmli-Puffer

SDS (w/v)	6 %
Glycerol (v/v)	30 %
Bromphenolblau	0,015 %
Tris, pH-Wert 6,8	19,5 mM

Protease- und Phosphataseinhibitor

Imidazol	2 mM
Natriumfluorid	5 mM
Kalium/Natrium-Tartrat	4 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid	100 µM
Benzamidin	10 µM

RIPA	(Radio	oimmunprä	äzipitatior	ns-Assay)	- Ly	/sepuffer
------	--------	-----------	-------------	-----------	------	-----------

Tris/Chlorwasserstoff pH-Wert 8,0	10 mM
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N'; N'-tetr	raessigsäure) 0,5 mM
TritonTM X-100 (v/v)	0,5 %
Desoxycholsäure (w/v)	0,1 %
SDS (w/v)	0,1 %
Natriumchlorid	140 mM

SDS	13,88 mM
Tris pH-Wert 6,8	500 mM

Trisgepufferte	Salzlösung	mit Tween	20 (TBS-T)
----------------	------------	-----------	------------

Tris	10 mM
Natriumchlorid	150 mM
Tween [®] 20	0,1 %
pH-Wert 7,6	

Trenngelpuffer

SDS	13,87 mmol
Tris pH-Wert 8,8	1,5 M

50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Tris Base	2 M
Eisessig (5,71 %)	1 M
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	5 mM

2.1.4.2 Gelelektrophorese-Gele

Sammelgel

H ₂ O	8,5 ml
Sammelgelpuffer	3,3 ml
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	1,65 ml
Tetramethylethylendiamin	0,0132 ml
Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)	0,132 ml

Trenngel (15 %)	
H ₂ O	8,5 ml
Trenngelpuffer	7,87 ml
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	15,14 ml
Tetramethylethylendiamin	0,01571 ml
Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)	0,20475 ml

2.1.5 ANTIKÖRPER

2.1.5.1 PRIMÄR-ANTIKÖRPER

Verdünnung
1:5000
1:5000
1:5000

2.1.5.2 SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER

Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti rabbit, goat anti mouse)

2.1	6	Primer	FÜR	GENOTY	PISIERU	NG DI	er M	[ÄUSE

C

Gen	Sequenz
<i>113_</i> F	5' - GCTGGGACAAAGGAATGGAGGTA - 3'
113_R	5' - CTGATGGTCTGAGTGGGTAGGTGAG - 3'
<i>PscTG</i> _F	5' – AGAAGCCTAGCCCACACCAGAAA – 3'
<i>PscTG_</i> R	5' - CCACCCATCAAGCTTAGTCAGAGA - 3'

2.2 Methoden

 \sim

2.2.1 ZÜCHTUNG UND HALTUNG VON TRANSGENEN MÄUSEN

Alle verwendeten transgenen Mauslinien wurden von Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schmitt generiert und in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität nach den Vorgaben des Landes NRW gezüchtet und gehalten. Es wurden keine Tierversuche, aber Organentnahmen nach Tötung an Mäusen durchgeführt. Die zugehörige Organisationsnummer der zentralen Einrichtung für Tierschutz und Tierforschung der Heinrich-Heine-Universität lautet O95/13.

2.2.2 UNTERSUCHTE MAUSLINIEN

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs verschiedene genetisch veränderte Mauslinien untersucht. Die verwendeten Mauslinien wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und jeweils mit dem WT verglichen. Jede Gruppe umfasste somit vier Mauslinien. In der ersten Gruppe wurden Mäuse mit der Mutation PLNR9C gegen den WT, gegen Mäuse mit der Mutation AFA (Mauslinie tgmPLN) sowie gegen Mäuse mit einer Kombination der Mutationen PLNR9C und AFA (Mauslinie mPLNR9C) miteinander verglichen. In der zweiten Gruppe wurde die Mauslinie tgPLN gegen den WT, gegen Mäuse mit der Mutation AFA sowie transgenem PLN (Mauslinie tgmPLN A) und gegen Mäuse ganz ohne PLN (Mauslinie PLNKO) verglichen. Jede gentechnische Veränderung betraf das PLN-Gen. Die Mutation AFA verhinderte die Bildung von PLN-Pentameren, während die Mutation PLNKO zu einer vollständigen PLN-Defizienz führte.

2.2.3 Organbadversuche

2.2.3.1 AUFBAU DES ORGANBADS

Das Organbad dient der Untersuchung von Muskelpräparaten unter kontrollierten Bedingungen. Es besteht aus einem wassergefüllten Tank, welcher als Wärmekammer dient und über eine Heizspirale temperierbar ist. Über eine Umwälzpumpe und einen Temperaturfühler ist eine konstante Temperaturregulierung möglich. An den zwei Versuchskammern des Organbads sind jeweils ein Flüssigkeitszulauf und -ablauf sowie ein Gasanschluss vorhanden, sodass auch der Inhalt der Versuchskammern individuell gesteuert werden kann. Der Zulauf verläuft in einer Spirale durch die Wärmekammer, sodass auch die im Versuch verwendeten Flüssigkeiten immer temperiert werden. Der Aufbau des Organbads ist in Abb. 6 dargestellt. Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde stets nur eine Versuchskammer gleichzeitig verwendet. In die Versuchskammer wurde der Papillarmuskel eingehängt, indem von oben eine Halterung für den Papillarmuskel eingeführt wurde. Diese hatte am kaudalen Ende einen Haken für die Halteschlaufe des Papillarmuskels sowie eine integrierte Anode und Kathode. Zwischen der Anode und der Kathode kam der Papillarmuskel während der Versuche zu liegen, was eine elektrische Stimulation ermöglichte. Die Kraftmessung erfolgte über einen Kraftmesser, welcher oberhalb des Organbads stand. An diesem hing ein Draht, der bis in die Kammer des Organbads reichte. An den Draht wurde für den Versuch der Haltefaden, der am Sehnenansatz des Papillarmuskels befestigt war, mittels Histoacryl-Gewebekleber festgeklebt. Per Knopfdruck konnte im Organbad der Puffer ausgetauscht werden (Spülen), um im Rahmen der Versuche die Nährstoffversorgung des Muskels konstant zu gewährleisten sowie das Isoprenalin auszuwaschen. Zeitgleich wurde der Sauerstoffbedarf durch konstante Begasung der Organbadkammer gedeckt.



Abb. 6: Aufbau des Organbads

Das Organbad beinhaltet ein temperierbares Wasserbad mit 10 ml fassenden Glaszylindern, die über Schlauchsysteme gefüllt und entleert werden können. Im linken Zylinder (Ausschnittsvergrößerungen im mittleren und rechten Bild) ist in der Abb. ein Papillarmuskel an einer Halterung zwischen zwei Ringelektroden befestigt, wodurch die elektrische Stimulation möglich ist. Dazu wurde der Papillarmuskel an beiden Enden mittels Fäden angeschlungen. Der Faden am unteren Ende ist an der Halterung und der obere Faden über einen Draht an einem Kraftaufnehmer fixiert.

2.2.3.2 VERSUCHSVORBEREITUNG

Für die Organbadversuche wurde täglich eine Tyrode-Nährlösung frisch angesetzt. Etwa 1,51 der Nährlösung wurden in den Speicher des Organbads gegeben, von der übrigen Lösung wurden zwei Petrischalen gefüllt und im Anschluss auf Eis gekühlt. Die Petrischalen dienten der Präparation des Papillarmuskels, wobei eine Petrischale einen Silikonboden aufwies. Für die Präparation und die Fixierung des Papillarmuskels im Organbad wurden vor Beginn der Präparation zwei Fäden vorbereitet, an deren Enden Knotenschlingen für die spätere Fixierung am Papillarmuskel vorgelegt wurden.

Herstellung der Tyrode-Nährlösung:

- 1. Solubilisierung oben genannter Chemikalien in Reinstwasser
- 2. 10 min rühren
- 3. pH-Wert kontrollieren (8)
- 4. 20 min oxygenieren
- 5. pH-Wert kontrollieren (7,35 7,45)
- 6. 0,74 g Kalziumchlorid-Dihydrat dazugeben

2.2.3.3 ORGANPRÄPARATION

Die Präparation des Papillarmuskels ist schematisch in Abb. 7 dargestellt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Papillarmuskel innerhalb von 10 min präpariert, um eine Revitalisierung und Stimulation des Muskels im Organbad zu ermöglichen. Zuerst wurde das Abdomen unterhalb des Zwerchfells durch eine Querinzision eröffnet, danach wurde der Thorax beidseits lateral durch das Zwerchfell eröffnet und das Zwerchfell den Rippenbögen folgend geöffnet. Anschließend wurden die Mäuse an der oberen Extremität und dem knorpeligen Fortsatz des Apex des Sternums durch feine Kanülen fixiert. Das schlagende Herz wurde oberhalb der Vorhöfe abgesetzt und in die Petrischale mit kalter Tyrode-Nährlösung überführt (Abb. 7, Bild 1 und 2). Durch die Abkühlung des Herzmuskels kam es zum Herzstillstand und einer Verlangsamung des Stoffwechsels. Die Vorhöfe wurden auf Höhe der Herzklappen abgesetzt und die Ventrikel in die Schale mit Silikonboden und kalter Tyrode-Nährlösung überführt. Die weitere Präparation des Papillarmuskels wurde unter einer Stereolupe mit 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Der rechte Ventrikel wurde mittig durchtrennt und beidseits mit feinen Kanülen fixiert. Nun wurde der Zugang zum linken Ventrikel über das Septum gewählt, um das Verletzungsrisiko der Papillarmuskeln zu minimieren. Anschließend wurden die Kanülen in die Schnittränder des Septums umgesetzt, um eine möglichst gute Fixation zu erhalten (Abb. 7, Bild 3). Die Präparation des hinteren Papillarmuskels erfolgte von der Mitralkappe aus mit der Schnittführung nahe des Papillarmuskels. Nachdem der Papillarmuskel zur Hälfte von der Herzwand frei präpariert war, wurde die Sehne des Muskels mit der vorgelegten Knotenschlinge fixiert. Anschließend wurde der Muskel vollständig von der Herzwand gelöst und die Basis mit dem zweiten Faden angebunden (Abb. 7,

Bild 4). Der Papillarmuskel wurde mit der Knotenschlinge des einen Fadens in das Organbad eingehängt. Der andere Faden wurde mit Histoacryl-Gewebekleber an einem Draht festgeklebt, über welchen der Kontakt zum Kraftmesser realisiert wurde.

Die in dieser Arbeit optimierte Versuchsdurchführung und Auswertung wurde bereits im Rahmen einer Publikation der eigenen AG veröffentlicht. Die Translation auf ein Mausmodell für Diabetes mellitus zeigt die breiten Anwendungsmöglichkeiten derartiger Organbadversuche, denn sie erlauben auch die Analyse metabolischer Einflüsse auf die kontraktile Funktion des Myokards [38].



Abb. 7: Präparation des Papillarmuskels im murinen Herzen

Die Präparation des murinen Papillarmuskels erfolgte in einem Zeitintervall von maximal 10 min. Zunächst wurde der Thorax der Maus eröffnet und das Herz entnommen (Bild 1 und 2). Der linke Ventrikel wurde lichtmikroskopisch präpariert und durch das *Septum interventriculare* eröffnet (Bild 3). Anschließend erfolgte die Präparation des hinteren Papillarmuskels und die Befestigung dessen am Sehnenfaden sowie an der Basis (Bild 4), bevor der Papillarmuskel im Organbad eingehängt wurde.

2.2.3.4 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Vor der Versuchsdurchführung wurde eine Eichung des Kraftaufnehmers mit Hilfe des Drahtes und im Anschluss ein Nullabgleich des Kraftaufnehmers mit dem eingehängten Draht durchgeführt. Nachdem der Papillarmuskel in das Organbad eingehängt worden war, startete der Versuch. Den schematischen Ablauf der Versuchsdurchführung zeigt Abb. 8. Die Vorspannung wurde auf 1 mN erhöht und der elektrische Stimulator eingeschaltet, sodass der Papillarmuskel im Organbad mit einer Frequenz von 1 Hz kontrahierte. Zunächst wurde der Muskel unter diesen Bedingungen 20 min stimuliert (Äquilibrierung). Nach 8 min wurde der Papillarmuskel im Organbad erstmals gespült, indem die den Muskel umgebende Flüssigkeitssäule gewechselt wurde. Im Anschluss wurde die Vorspannung erneut auf 1 mN korrigiert. Nach weiteren zehn Minuten Äquilibrierung wurde ein weiteres Mal gespült. Nach weiteren zwei Minuten Äquilibrierung begannen die Messungen mit Isoprenalin. In Abständen von zwei Minuten wurde die Konzentration von Isoprenalin in der bestehenden Wassersäule von 10 ml sukzessive auf 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM erhöht. Anschließend wurde viermal hintereinander gespült und der Papillarmuskel für 8 min äquilibriert, um die Wirkung des Isoprenalins auszuwaschen. Im Anschluss wurde ein letztes Mal gespült und nach weiteren 2 min Äquilibrierung wurde die Vorspannungsmessung aufsteigend mit 1 mN, 2 mN, 3 mN, 4 mN und 5 mN durchgeführt.



Abb. 8: Versuchsdurchführung

Die Durchführung der Versuche mit den Papillarmuskeln gliederte sich in vier Phasen. Auf eine initiale Äquilibrierungsphase folgte die Messung der Kraftentwicklung unter Isoprenalin-Stimulation. Nach einer weiteren Äquilibrierungs- und Regenerationsphase für den Papillarmuskel erfolgte in einem zweiten Teil die Messung der Kraftentwicklung des Muskels unter zunehmender Vorspannung.

2.2.3.5 GENOTYPISIERUNG

Von jeder Maus wurde die Schwanzspitze zur Genotypisierung konserviert. Für die Gewinnung der DNA wurde zu jeder Schwanzspitze 100 µl Natriumhydroxid (50 mM) gegeben und für 15 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden 16 µl 1 M Tris mit 10 mM EDTA hinzugegeben. Jede Probe wurde im Anschluss mit einem Vortexmischer durchmischt. Danach wurde 1 µl der Probe zum *Primer* Mix hinzugegeben und die enthaltene DNA in der Probe durch PCR in 30 Zyklen amplifiziert. Im Anschluss wurden je 10 µl der Amplifikate mit zuvor amplifizierter DNA in die Taschen der Agarose-Gele gegeben und mit Hilfe von Kontrollproben die Genotypen der Mausproben kontrolliert (Abb. 9). Im
Primer Mix befanden sich dabei 2 *Primer*-Paare. Das erste Paar amplifiziert ein Referenzgen im Mausgenom (ca. 400 bp, obere Bande) und dient somit als Kontrolle der PCR. Das zweite *Primer*-Paar amplifiziert das PLN-Transgen (ca. 250 bp, untere Bande). Zusätzlich wurde eine Leerwert-Probe pipettiert, um eine Kontamination der Proben auszuschließen.

Herstellung des Agarose-Gels (2,5 %):

- 1. 60 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer + 2,5 g Agarose
- 2. Kochen für 2-3 min
- 3. 3 min rühren
- 4. 3 µl RedSafe hinzugeben
- 5. In die Gelkammer gießen und aushärten lassen



Abb. 9: Agarose-Gel zur Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Überprüfung der Genotypen wurde für jede Maus eine Genotypisierung aus der Schwanzspitze mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde auf das Ausbilden einer Bande für das Referenzgen sowie das Transgen geachtet. Beispielhaft ist die Auswertung der Mäuse 1-7 dargestellt. Abkürzungen: LW = Leerwert; TG = Transgen.

2.2.4 BESTIMMUNG DES MUSKELQUERSCHNITTES

2.2.4.1 Optische Messung

Nach Beendigung des Versuchs wurde der Papillarmuskel aus dem Organbad entnommen und unter der Stereolupe mit 40-facher Vergrößerung feinpräpariert. Die Fäden wurden abgeschnitten und der Papillarmuskel von allen Herzwandresten sowie Sehnenfäden befreit, sodass nur der reine Papillarmuskel übrigblieb. Mit Hilfe eines skalierten Objektträgers wurde unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung der dünnste Durchmesser des Muskels zwischen muskulärer Basis und apikalem Sehnenansatz bestimmt. Anschließend wurde mit der Annahme eines zirkulären Muskels der Querschnitt des Papillarmuskels nach der Formel $y = \pi * r^2$ berechnet.

2.2.4.2 HISTOLOGISCHE MESSUNG

Nach der lichtmikroskopischen Messung wurde der Papillarmuskel für eine Minute in eine kardioplege Lösung überführt, um eine vollständige Relaxation zu erreichen. Danach wurde der Papillarmuskel in einer kleinen Kassette in immer der gleichen Ausrichtung zur Kryokonservierung eingebettet und auf Trockeneis in Isopentan eingefroren. Durch Markierung der Muskelausrichtung an der Form wurden die Papillarmuskeln gleichermaßen im Kryostat eingespannt und 8 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei der Abstand zwischen den Schnitten 200 µm betrug. Die fertigen Schnitte wurden mit einem hochauflösenden Lichtmikroskop unter 400-facher Vergrößerung mit einer Kameraschnittstelle fotografiert. Alle Schnitte mit eindeutiger muskulärer Struktur wurden anschließend mit einem automatischen Bildauswertungsprogramm (ImageJ) analysiert. Hierfür wurde eine Folge von Auswertungsschritten für die einzelnen Bilder formuliert, welche anschließend automatisiert durch das Programm durchgeführt wurden (Stapelverarbeitung, *Batch*-Auswertung). Von den ausgemessenen Muskelflächen wurde der Mittelwert der Muskelflächen für jede Maus berechnet.

Makro für die automatische Batch-Auswertung:

run("Set Scale...", "distance=390 known=0.2 unit=mm"); run("8-bit"); setOption("BlackBackground", false); run("Convert to Mask"); run("Mean...", "radius=20"); run("Auto Threshold", "method=Mean white"); run("Analyze Particles...", "size=0.1-Infinity show=Outlines display include");

2.2.5 AUSWERTUNG DER ORGANDBADVERSUCHE

Die Auswertung der Organbadmessungen erfolgte mit Hilfe der Software LabChart (Version 8.1.17) von ADInstruments. Zu jedem Messzeitpunkt wurde der Mittelwert aus den Einzelmesswerten von 10 Muskelkontraktionen gebildet. Die Ausgangswerte wurden 15 s vor der ersten Isoprenalin-Stimulation gemessen. Die Messpunkte unter Isoprenalin-Stimulation wurden 15 s vor der nächsten Stimulation gewählt. Die Messpunkte der Vorspannungsmessung wurden direkt nach Erhöhung der

Vorspannung gewählt. Anhand der ausgewerteten Messpunkte wurden die durchschnittliche Krafterhöhung sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls durch das Programm errechnet.

Für die Organbadversuche wurde ein Ziel von zehn Tieren pro Mauslinie festgesetzt. Ausschlusskriterien für die Auswertung stellten Muskelflimmern bzw. keine Muskelaktivität unter Stimulation dar. Kam es nach der Präparation zu einem Muskelflimmern, wurden die Messwerte jener Papillarmuskeln der entsprechenden Maus bis zum Auftreten des Muskelflimmerns in die Messung eingeschlossen.

2.2.6 DETEKTION VON PHOSPHOLAMBAN MITTELS WESTERN-BLOT-ANALYSE

2.2.6.1 PRÄPARATION VON PAPILLARMUSKEL- UND HERZMUSKELGEWEBE ZUR PROTEINANALYSE

Zur Analyse der basalen Phosphorylierung von PLN wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurde der Papillarmuskel nach einer Äquilibrierungsphase von 20 min umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Vergleich wurde das Gewebe eines gesamten Herzventrikels, welches umgehend nach der Tötung der Tiere eingefroren wurde, herangezogen. Die Untersuchung erfolgte an jeweils vier Replikaten aus der Mauslinie WT. Zu Beginn wurde das Gewebe mittels Ultra-Turrax[®] in modifiziertem RIPA-Lysepuffer (800 µl für die Ventrikel, 200 µl für die Papillarmuskeln) auf Eis dreimal für 7 s homogenisiert. Zusätzlich wurden Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugegeben, um die Phosphorylierungszustände zu konservieren. Zwischen jedem Schritt wurde das Gewebe auf Eis gestellt, um die Proteine zu schützen. Es erfolgte die Zentrifugation mit 10.000 x g für 15 min. Der Überstand stellte das Proteinlysat dar. 600 µl des Lysates wurden mit 300 µl Lämmli-Puffer versehen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ein Teil des Überstandes wurde 1:10 mit doppelt destilliertem H₂O zur Analyse der Proteinkonzentration verdünnt.

2.2.6.2 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Mit Hilfe der BCA-Methode wurde die Proteinkonzentration in den Proteinlysaten ermittelt. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Für die Bestimmung wurde eine Standardreihe in Doppelbestimmung und eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben in Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei der verwendeten Methode wird die zu untersuchende Probe in ein alkalisches System gebracht, welches zweiwertige Kupferionen enthält. Die Kupferionen bilden einen Komplex mit den Peptid-Bindungen der Proteine und werden in weiterer Folge zu einwertigen Kupferionen reduziert. Zwei Moleküle BCA bilden dann einen Komplex mit einem einwertigen Kupferion, welcher stabil ist

und Licht bei 562 nm stark absorbiert. Die Absorption verhält sich dabei weitgehend linear zur Proteinkonzentration, sodass auch eine quantitative Aussage möglich ist [39].

2.2.6.3 DETEKTION VON PROTEINEN MIT HILFE VON WESTERN-BLOT-ANALYSE

Zur Detektion der Proteine in den Lysaten wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Lysate in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und im Anschluss die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach dem Western-Blot wurde die Membran mit 0,5 % Milchpulver in TBS-T blockiert. Zur Detektion von PLN wurden die Primärantikörper (Anti-PLN, Anti-phospho-PLN Ser¹⁶, Anti-phospho-PLN Thr¹⁷) 1:5000 in 0,5 % Milchpulver in TBS-T gelöst und die Membran mit dem Antikörper bei 4 °C über die Nacht schwenkend inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran viermal mit je 30 ml TBS-T gespült und im Anschluss für 10 min mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (*goat anti rabbit, goat anti mouse*) inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschritt mit viermalig 30 ml TBS-T. Durch Zugabe von ECL-Reagenz auf die Membran wurde die Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt. Anschließend wurden die chemilumineszenten Signale mit einem Kamerasystem (ChemStudio, Analytik Jena) digital erfasst quantifiziert (Vision Works Software, Analytik Jena).

2.2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Rohdaten wurden zunächst in Excel-Tabellen übertragen. Hier erfolgte die Normalisierung der Werte auf die gemessenen Muskeldurchmesser beziehungsweise die histologisch ermittelten Muskelquerschnitte. Die statistische Auswertung aller Messwerte erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware *GraphPad Prism* Version 9.1.0. Vergleiche zwischen den Mauslinien sowie innerhalb der Mauslinien erfolgten als zweifaktorielle Varianzanalyse (*2-way* ANOVA) mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test.* Für die Berechnungen der effektiven Konzentration, bei der 50 % der Kraft erreicht sind (EC₅₀), wurde diese für jeden Muskel einzeln bestimmt und von allen Muskeln einer Gruppe der Mittelwert +/- Standardfehler der EC₅₀ bestimmt. Die Darstellung der Daten erfolgte in der Form Mittelwert ± Standardfehler, ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 WESTERN-BLOT-ANALYSE AN PAPILLARMUSKELN UND VENTRIKELMUSKULATUR

In dieser Arbeit wurde an isolierten Papillarmuskeln die Kraftentwicklung verschiedener PLN-Mutanten miteinander verglichen. Zur Beurteilung, inwieweit diese Messergebnisse auch das übrige Gewebe der linken Herzkammer repräsentieren können, wurde zunächst die PLN-Expression in Papillarmuskeln und in Ventrikelmuskulatur des linken Herzens mittels Western-Blot-Analysen ermittelt und verglichen. Die Papillarmuskeln wurden für diese Versuche vor ihrer Lyse in gleicher Weise wie für die Kraftmessungen präpariert, mit dem Kraftaufnehmer des Organbads verbunden, vorgespannt und für 20 min in Tyrode-Nährlösung äquilibriert.

Wie in Abb. 10 dargestellt, trennen sich in der SDS-Gelelektrophorese der Gewebslysate zwei PLN-Banden auf, nämlich die Monomere (ca. 6 kDa) und die Pentamere (ca. 25 kDa) des PLN. Der Vergleich von Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur aus vier Mäuseherzen zeigt einen höheren Monomer/Pentamer-Quotienten in den Papillarmuskellysaten. Die Expression der PLN-Monomere - der Form, in der PLN die Kalzium-ATPase inhibiert - ist allerdings bei Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur ähnlich.



Abb. 10: Nachweis von PLN in Lysaten aus Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur

Western-Blot-Analysen von PLN in Lysaten aus Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur von je vier Mäusen unter Verwendung von anti-PLN-Antikörpern. In jeder Gelspur wurden identische Mengen Gesamtprotein aufgetragen. Abkürzungen: kDa = Kilodalton; M-PLN = Monomeres PLN; P-PLN = Pentameres PLN; $P_{1.4}$ = Papillarmuskel 1-4; $V_{1.4}$ = Ventrikel 1-4.

Neben der Expressionsstärke ist der Phosphorylierungszustand des PLN für dessen inhibierende Wirkung entscheidend. Deshalb wurden auch Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes PLN (Ser¹⁶) durchgeführt. Diese zeigen in der Ventrikelmuskulatur phosphorylierte Monomere und Pentamere, jedoch nicht in den Papillarmuskel-Lysaten (Abb. 11). Offenbar besteht in Mäuseherzen eine deutliche basale Phosphorylierung, während zu Beginn der Organbadversuche (nach der Äquilibrierung, ohne Stimulation) PLN ganz überwiegend unphosphoryliert vorliegt, sodass von einer starken inhibitorischen Wirkung des PLN auszugehen ist.



Abb. 11: Untersuchung der Phosphorylierung von PLN in Lysaten aus Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur

Western-Blot-Analysen von pPLN in Lysaten aus Papillarmuskeln und Ventrikelmuskulatur von je vier Mäusen unter Verwendung von anti-phospho-PLN-Antikörpern (Ser¹⁶). In jeder Gelspur wurden identische Mengen Gesamtprotein aufgetragen. Abkürzungen: M-pPLN = Phosphoryliertes monomeres PLN; P-pPLN = Phosphoryliertes pentameres PLN.

3.2 ANALYSE DER NORMALISIERUNG VON PAPILLARMUSKELN

Je dicker eine Muskelfaser ist, desto höher ist ihre generierte Kraft, weil mehr kontraktile Einheiten parallel zusammenarbeiten. Um die in den Sarkomeren jeder Mauslinie generierte Kraft beurteilen zu können, wurden die Messwerte aus den Organbadversuchen auf die Dicke der Papillarmuskeln normalisiert. Letztere wurde mithilfe verschiedener Methoden bestimmt, nämlich durch 1. Wiegen des Gewebes, 2. Messen des Durchmessers an der dünnsten Stelle des Muskels und 3. Bestimmung des Muskelquerschnitts (siehe Kap. 2.2.4). Die Normalisierung über das Gewicht wurde schließlich verworfen, da auch das Wiegen mit einer Feinwaage bis 0,1 µg nur die Ergebnisse 0 µg und 0,1 µg ergeben hat. Daraus folgte ein Vergleich der Methodik über Messen des Durchmessers gegenüber der Bestimmung des histologischen Muskelquerschnittes.



Abb. 12: Vergleich der histologisch ermittelten und der über den Durchmesser errechneten Papillarmuskel-Querschnittsflächen an einem histologischen Schnitt

Zur Normalisierung der Messwerte der Organbadversuche wurden zwei Methoden zur Querschnittsbestimmung verglichen. Weiß markiert ist die optische Querschnittsbestimmung mithilfe des Durchmessers durch ein Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung mit anschließender Extrapolation auf die Fläche. Rot markiert ist die automatische Flächenbestimmung mithilfe der Software *ImageJ*.

Exemplarisch ist ein histologischer Schnitt abgebildet (Abb. 12), in welchen die Ergebnisse der jeweiligen Normalisierungsmethode eingezeichnet wurden. Die weiße Markierung entspricht der Messung des Durchmessers für diesen Muskel mit Extrapolation der Fläche, während die rote Markierung die automatisierte Flächenbestimmung des histologischen Schnittes abbildet. Es ist ersichtlich, dass die rote Markierung exakt der Muskelkontur anliegt, während die weiße Markierung den tatsächlichen Muskelquerschnitt nur annähernd trifft. Für die statistische Auswertung wurden jeweils die Muskelquerschnitte einer Mauslinie zusammengefasst und der Mittelwert sowie der Standardfehler für jede Mauslinie errechnet (Abb. 13, Abb. 14).



Abb. 13: Vergleich der histologisch ermittelten und der über den Durchmesser errechneten Papillarmuskel-Querschnittsflächen für die Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN

Zur Normalisierung der Messwerte der Organbadversuche wurden zwei Methoden zur Querschnittsbestimmung durchgeführt und einander gegenübergestellt; *Mann-Whitney test* bzw. *Kruskal-Wallis test* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons test*; * p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; Abkürzungen: mm² = Quadratmillimeter.

_	Histo	ologisch	Durchmesser		
	Mittelwert [mm ²]	SEM [mm ²]	p-Wert	Mittelwert [mm ²]	SEM [mm ²]
WT	0,3985	0,0349	< 0,0001	0,1070	0,0102
PLNR9C	0,3349	0,0667	0,0286	0,0571	0,0110
mPLNR9C	0,3018	0,0378	0,0006	0,1027	0,0250
tgmPLN	0,3431	0,0251	< 0,0001	0,0914	0,0105

Tabelle 1: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte der histologisch ermittelten und der über den Durchmesser errechneten Papillarmuskel-Querschnittsflächen für die Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Vergleich zwischen histologischem Querschnitt und Querschnitt anhand des Durchmessers; Mann-Whitney test bzw. Kruskal-Wallis test mit anschließendem Dunn's multiple comparisons test; Abkürzungen: SEM = Standardfehler, engl.: *standard error of mean*.



Abb. 14: Vergleich der histologisch ermittelten und der über den Durchmesser errechneten Papillarmuskel-Querschnittsflächen für die Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

Zur Normalisierung der Messwerte der Organbadversuche wurden zwei Methoden zur Querschnittsbestimmung durchgeführt und einander gegenübergestellt; *Mann-Whitney test* bzw. *Kruskal-Wallis test* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons test*; ** p < 0.01; **** p < 0.001.

_	Hist	ologisch	Durchmesser		
	Mittelwert [mm ²]	SEM [mm ²]	p-Wert	Mittelwert [mm ²]	SEM [mm ²]
WT	0,3985	0,0349	< 0,0001	0,1070	0,0102
tgPLN	0,3517	0,0270	< 0,0001	0,1225	0,0112
tgmPLN A	0,4210	0,0297	< 0,0001	0,1192	0,0143
PLNKO	0,3865	0,0403	0,0079	0,1248	0,0151

Tabelle 2: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte der histologisch ermittelten und der über den Durchmesser errechneten Papillarmuskel-Querschnittsflächen für die Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Vergleich zwischen histologischem Querschnitt und Querschnitt anhand des Durchmessers; *Mann-Whitney test* bzw. *Kruskal-Wallis test* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons test*.

Für jede Mauslinie liegt der histologisch bestimmte Querschnitt signifikant über jenem, welcher anhand des Durchmessers bestimmt wurde. Innerhalb einer Methodik unterscheiden sich die Mauslinien somit nicht signifikant hinsichtlich des Durchmessers. Demnach wird in der Errechnung des Querschnittes über den Durchmesser die Größe des Muskels tendenziell unterschätzt. Der Standardfehler der Einzelwerte bei der Bestimmung der Querschnittsfläche beträgt bei der histologischen Messung 28 %,

bei der optischen Messung 48 %. Zur Bestimmung des Standardfehlers wurden alle Muskelquerschnitte der Tiere einer Versuchsgruppe als Datenpunkt und deren Abweichung voneinander betrachtet. Die histologische Methode ist damit deutlich genauer und trotz des Mehraufwands zu bevorzugen. Die zugehörigen Messwerte mit Mittelwert, Standardfehler und p-Wert zeigen Tabelle 1 und Tabelle 2.

3.3 UNTERSUCHUNG DER STIMULIERBARKEIT DER EINZELNEN MAUSLINIEN IM ORGANBAD

Einige der untersuchten Mauslinien (PLNR9C, mPLNR9c) führen durch einen Gendefekt von PLN über eine Destruktion des Herzmuskels langfristig zu einer myokardialen Schädigung [26]. Bereits während der Organbadversuche fiel auf, dass sich jeder Muskel im Organbad unterschiedlich verhielt. Um eine Quantifizierung dieser Beobachtung zu ermöglichen, wurde jeder präparierte Papillarmuskel in eine der drei Kategorien "Stimulierbar", "Nicht Stimulierbar" oder "Flimmern" eingeteilt. Stimulierbare Papillarmuskeln haben dabei das gesamte Versuchsschema durchlaufen, nicht stimulierbare Papillarmuskeln zeigten am Ende der Eingewöhnungszeit keine Reaktion bei elektrischer Stimulation und Muskeln der Gruppe "Flimmern" fingen im Verlauf des Stimulationsversuches unkontrolliert an zu flimmern. In Abb. 15 ist die Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln nach der entsprechenden Mauslinie aufgegliedert.



Abb. 15: Häufigkeit des Auftretens stimulierbarer, nicht-stimulierbarer und flimmernder Papillarmuskeln in den untersuchten Mauslinien im Organbad

Evaluierung der Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln im Organbad in drei Kategorien.

Die Mauslinie WT zeigt eine recht gleichmäßige Verteilung über die drei Kategorien. Die Mauslinie PLNR9C weist hingegen einen etwa gleich großen Anteil an stimulierbaren und flimmernden Papillarmuskeln auf und einen sehr geringen Anteil an nicht stimulierbaren Muskeln. Ähnliches gilt für die Mauslinie tgmPLN. Von den anderen monomeren Mauslinien tgmPLN A und mPLNR9C ist demgegenüber wie auch bei der Mauslinie tgPLN der Anteil an stimulierbaren Papillarmuskeln am größten, während die Kategorien "Nicht Stimulierbar" und "Flimmern" eine untergeordnete Rolle spielen. Die Mauslinie PLNKO weist im Kontrast zu den restlichen Mauslinien einen sehr hohen Anteil an nicht stimulierbaren Muskeln auf, während sowohl stimulierbare als auch flimmernde Muskeln in dieser Mauslinie einen sehr geringen Anteil ausmachen. Die zugehörigen Messwerte zur Häufigkeitsverteilung der Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln zeigt Tabelle 3.

	WT	PLNR9C	mPLNR9C	tgmPLN	tgPLN	tgmPLN A	PLNKO
Stimulierbar	37,50%	40,00%	72,22%	53,33%	57,14%	62,50%	16,00%
Nicht Stimulierbar	33,33%	13,33%	23,53%	6,67%	14,29%	20,83%	80,00%
Flimmern	25,00%	46,67%	5,88%	40,00%	28,57%	16,67%	4,00%

Tabelle 3: Häufigkeit des Auftretens stimulierbarer, nicht-stimulierbarer und flimmernderPapillarmuskeln in den untersuchten Mauslinien im Organbad

Prozentuale Anteile der Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln in den Organbadversuchen.

Nach der Auswertung der Stimulierbarkeit der einzelnen Muskeln für jede Gruppe ergab sich das folgende Bild: Für die Mauslinie WT wurden zehn Tiere eingeschlossen, bei sechs Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, acht Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie PLNR9C wurden sechs Tiere eingeschlossen, bei sieben Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, zwei Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie mPLNR9C wurden 13 Tiere eingeschlossen, bei einem der Tiere kam es zu einem Muskelflimmern, vier Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie tgmPLN wurden acht Tiere eingeschlossen, bei sechs Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, ein Tier musste aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie tgmPLN wurden acht Tiere kam es zu einem Muskelflimmern, zwei Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, zwei Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, ein Tier musste aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie tgPLN wurden acht Tiere eingeschlossen, bei vier Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, zwei Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen, bei vier Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, zwei Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen, bei vier Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, für die Mauslinie tgPLN A wurden 15 Tiere eingeschlossen, bei vier Tieren kam es zu einem Muskelflimmern, fünf Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen werden. Für die Mauslinie PLNKO wurden vier Tiere eingeschlossen, bei einem Tier kam es zu einem Muskelflimmern, 20 Tiere mussten aus der Wertung ausgeschlossen werden.

3.4 CHARAKTERISIERUNG VON PLNR9C-MÄUSEN MIT HILFE DES ORGANBADS

Die Stärke der Kraftentwicklung in einem Muskel hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Dazu gehört unter anderem die Fähigkeit eines Muskels, Kalzium innerhalb der Muskelzelle während einer Kontraktion freizusetzen und wieder zu speichern. Eine Verringerung dieser Fähigkeit stört die Kraftentwicklung der Sarkomere [40]. Hier spielt PLN eine wesentliche Rolle. Die untersuchten Mauslinien haben verschiedene Mutationen im PLN-Gen (siehe Kap. 1.5). Die Mutationen unterscheiden sich alle dadurch vom WT, dass die Erbinformation für PLN an einem anderen Genlokus abgelesen wird. Zusätzlich ist bei einigen Mutationen eine Base vertauscht (PLNR9C, mPLNR9C), oder das gebildete PLN kann keine pentameren Strukturen ausbilden (mPLNR9C, tgmPLN). Im Folgenden wurde der Einfluss dieser genetischen Veränderungen auf die elektrophysiologische Funktion der Herzmuskulatur näher untersucht. Hierfür wurde für die Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN die Kraftentwicklung der präparierten Papillarmuskeln mittels Kraftabnehmer im Organbad unter einer Stimulation von 1 Hz gemessen und die Kraft von zehn aufeinanderfolgenden Schlägen gemittelt. Unter Einfluss die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls ermittelt (siehe Kap. 2.2.3.4).

3.4.1 UNTERSUCHUNG DER VORSPANNUNG BEI DER MUTATION PLNR9C

Die Vorspannung entspricht der Vordehnung eines Muskels und beeinflusst in diesem Rahmen die Kraftentwicklung [4]. Der Einfluss der Vorspannung wurde zunächst an den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN untersucht (Abb. 16) Hierfür wurde nach einer Äquilibrierungsphase von 10 min die Vorspannung im Organbad kontinuierlich um 1 mN bis zu einer maximalen Vorspannung von 5 mN oder bis zum Versagen des Muskels erhöht. Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten sind in Tabelle 4-6 dargestellt. Wie in Abb. 16 ersichtlich, liegt das Maximum für die absolute Kraft bei 1 mN für alle Mauslinien. Bei weiterer Erhöhung der Vorspannung verzeichnet die Mauslinie mit der Mutation tgmPLN einen signifikanten Abfall der absoluten Kraft bei einer Vorspannung von 5 mN, während sich alle weiteren Mauslinien in Bezug auf die absolute Kraft nicht signifikant vom Maximum bei 1 mN unterscheiden. Dennoch zeigt der graphische Verlauf in Abb. 16 A einen ähnlichen Abfall für die Mauslinie mit der Mutation PLNR9C, dieser ist jedoch mit einem p-Wert von 0,2066 nicht signifikant. Darüber hinaus fällt auf, dass die absolute Kraft aller vier Mauslinien am Ende der Messreihe bei einer Vorspannung von 5 mN nahezu identisch ist, dabei ist jedoch zu bedenken, dass zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Mauslinien bestehen.



Abb. 16: Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

Kraftentwicklung für die Parameter absolute Kraft (A), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) bei steigender Vorspannung in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*; $\ddagger p \le 0,05$ gegenüber 1 mN für mPLNR9C; \$ p < 0,05; \$ p < 0,01 gegenüber 1 mN für tgmPLN; Abkürzungen: F = Kraft; t = Zeit.

Vorspannung [mN]	V	VT		PLNR9C			
	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	
0	1,742	0,280	0,5912	1,832	0,559	0,1913	
1	1,931	0,331		2,638	0,681		
2	1,598	0,216	0,6151	2,423	0,702	0,8640	
3	1,622	0,186	0,8964	1,823	0,748	0,4535	
4	1,451	0,211	0,8425	1,501	0,675	0,2664	
5	1,228	0,281	0,7919	1,319	0,593	0,2066	
Vorspannung [mN]	tgn	nPLN		mPLNR9C			
	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	
0	1,637	0,234	0,1910	1,163	0,199	0,4133	
1	2,373	0,260		1,802	0,442		
2	2,277	0,366	0,9971	1,544	0,263	0,9343	
3		0.244	0 2462	1 7/0	0 227	0 1 8 0 /	
	1,890	0,344	0,2462	1,240	0,237	0,1004	
4	1,890 1,789	0,344 0,333	0,2462 0,2885	1,248	0,237 0,265	0,1804	

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der absoluten Kraft unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Bei der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei der absoluten Kraft. Auch hier liegt das Maximum der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs für alle Mauslinien bei einer Vorspannung von 1 mN. Eine darüberhinausgehende Steigerung der Vorspannung führt insbesondere für die Mauslinien mPLNR9C und tgmPLN zu einer signifikanten Abnahme der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Für den WT und die Mauslinie mit der Mutation PLNR9C zeigen sich hingegen keine signifikanten Änderungen unter Veränderung der Vorspannung. Ebenso wie bei der maximalen Kraft ist auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs am Ende der Messreihe in allen Mauslinien nahezu identisch. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien bestehen jedoch auch hier zu keinem Zeitpunkt.

Vorspannung [mN]	١	NT		PLNR9C			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	34,940	5,833	0,1242	36,970	11,390	0,1371	
1	42,470	7,316		58,450	15,480		
2	33,540	4,839	0,3894	47,660	13,750	0,4651	
3	30,210	3,201	0,4918	32,910	15,020	0,2469	
4	23,600	3,920	0,3676	22,470	10,950	0,0895	
5	15,310	4,389	0,3799	17,530	8,777	0,1693	
Vorspannung [mN]	tgr	nPLN		mPLNR9C			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	32,670	4,854	0,0961	25,330	4,671	0,3382	
1	52,900	5,798		45,550	12,350		
2	10 150	7 0 2 2	0 0000	34 950	6 507	0,8068	
	40,130	7,052	0,5000	54,550	0,507	s ,	
3	35,380	7,832	0,0578	25,650	5,296	0,0322	
3	35,380 27,980	7,832 7,248 6,393	0,0578 0,0078	25,650 21,870	5,296 5,116	0,0322 0,0670	

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls verhält sich konform zur absoluten Kraft sowie zur Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Auch Erstgenannte zeigt bei 1 mN ihr Maximum in allen Mauslinien. Bei weiterer Erhöhung der Vorspannung kommt es zu einem signifikanten Abfall der Geschwindigkeit des Kraftabfalls in den Mauslinien mPLNR9C und tgmPLN, während die graphisch angedeutete Abnahme der Mittelwerte in den beiden anderen Mauslinien nicht signifikant ist. Ebenso wie zuvor beschrieben ist auch die Geschwindigkeit des Kraftabfalls am Ende der Messreihe in allen Mauslinien nahezu identisch. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien bestehen jedoch auch hier zu keinem Zeitpunkt.

Vorspannung [mN]	١	NT		PLNR9C			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	-30,860	5,315	0,1450	-31,410	9,370	0,1676	
1	-37,290	6,378		-50,020	12,480		
2	-27,220	3,280	0,2685	-37,430	10,260	0,2998	
3	-23,530	2,137	0,3518	-24,250	10,150	0,1528	
4	-18,710	2,841	0,3011	-18,740	8,775	0,0920	
5	-11,870	3,052	0,3416	-12,510	5,521	0,1806	
Vorspannung [mN]	tgr	nPLN		mPLNR9C			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	-29,930	4,168	0,1562	-21,850	4,062	0,3934	
1	-47,480	5,591		-39,980	10,770		
2	-40,420	7,133	0,5904	-29,970	5,630	0,7763	
3	-29,370	6,493	0,0521	-21,660	4,441	0,0326	
4	_21.820	5 222	0.0050	-18 370	4 178	0 0508	
	-21,820	5,222	0,0050	10,570	7,1/0	0,0500	

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Zusammenfassend zeigen sich in keinem Parameter signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Jedoch fällt insbesondere für die Mauslinien mPLNR9C und tgmPLN eine stärkere Dynamik mit signifikanter Verminderung der Kraftentwicklung in den drei Parametern absolute Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls unter Erhöhung der Vorspannung auf. Möglicherweise reagieren also die Mauslinien mit ausschließlich monomerem PLN sensibler auf eine Veränderung der Vorspannung. Diese Vermutung erhärtet sich insbesondere vor dem Hintergrund, dass der WT sowie die Mauslinie PLNR9C keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Vorspannungen aufweisen.

3.4.2 UNTERSUCHUNG DER ISOPRENALIN-STIMULATION BEI DER MUTATION PLNR9C

Neben der Messung unter Veränderung der Vorspannung wurden darüber hinaus elektrophysiologische Messungen an den Papillarmuskeln im Organbad unter steigender Isoprenalin-Konzentration durchgeführt. Isoprenalin steigert als Sympathomimetikum die Herzaktivität und führt somit zu steigender Kontraktilität [23]. Hierfür wurden die Papillarmuskeln im Organbad zunächst 20 min in Tyrode-Nährlösung äquilibriert. Im Anschluss wurden die Muskeln mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert und die Isoprenalin-Konzentration zugleich alle zwei Minuten schrittweise bis auf 1000 nM gesteigert. Die Kraftentwicklung wurde während der Versuche mit dem Kraftaufnehmer aufgezeichnet. Inwiefern die Mutationen PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN Einfluss auf diese Kraftentwicklung im Verhältnis zum WT haben, wurde in diesem Abschnitt ebenfalls anhand der Parameter absolute Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls untersucht (Abb. 17). Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten sind in Tabelle 7-9 dargestellt.

In den Papillarmuskeln aus Mäusen der Linien WT, mPLNR9C sowie tgmPLN zeigt Abb. 17 für die absolute Kraft einen progredienten Anstieg unter steigenden Isoprenalin-Konzentrationen. Die Mauslinie mit der Mutation PLNR9C zeigt bei hohem Standardfehler trotz starkem Anstieg der Mittelwerte keinen signifikanten Anstieg der absoluten Kraft unter steigenden Isoprenalin-Konzentrationen. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien bestehen bezüglich der absoluten Kraft zu keinem Zeitpunkt.



Abb. 17: Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

Kraftentwicklung für die Parameter absolute Kraft (A), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) unter Stimulation mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN; *2way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für WT; $\ddagger p < 0,05$ gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für tgmPLN; Abkürzungen: Δ = Delta; log = Logarithmus.

Konzentration [nM]	١	NT		PLNR9C			
	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	
1	0,023	0,043	0,9990	0,004	0,102	0,9999	
3	0,160	0,106	0,7850	0,273	0,122	0,4539	
10	0,440	0,111	0,0418	0,580	0,186	0,2002	
30	0,679	0,149	0,0193	1,001	0,302	0,1650	
100	0,926	0,195	0,0146	1,601	0,416	0,1012	
300	1,129	0,201	0,0048	1,842	0,474	0,0978	
1000	1 087	0 153	0.0009	2 067	0 506	0 0814	
1000	1,001	0)100	0,0005	2,007	0,500	0,0011	
Konzentration [nM]	tgr	nPLN	0,0003	mPl	LNR9C	0,0011	
Konzentration [nM]	tgr Mittelwert [mN]	nPLN SEM [mN]	p-Wert	mPl Mittelwert [mN]	LNR9C SEM [mN]	p-Wert	
Konzentration [nM]	tgr Mittelwert [mN] 0,083	nPLN SEM [mN] 0,104	p-Wert 0,9873	mPl Mittelwert [mN] 0,109	LNR9C SEM [mN] 0,034	p-Wert 0,0958	
Konzentration [nM]	tgr Mittelwert [mN] 0,083 0,200	0,133 nPLN SEM [mN] 0,104 0,128	p-Wert 0,9873 0,7542	0,109 0,217	.NR9C SEM [mN] 0,034 0,095	p-Wert 0,0958 0,3745	
Konzentration [nM]	tgr Mittelwert [mN] 0,083 0,200 0,483	0,133 nPLN SEM [mN] 0,104 0,128 0,128	p-Wert 0,9873 0,7542 0,0746	mPl Mittelwert [mN] 0,109 0,217 0,605	NR9C SEM [mN] 0,034 0,095 0,271	p-Wert 0,0958 0,3745 0,3982	
Konzentration [nM] 1 3 10 30	tgr Mittelwert [mN] 0,083 0,200 0,483 0,914	0,133 nPLN SEM [mN] 0,104 0,128 0,128 0,217	p-Wert 0,9873 0,7542 0,0746 0,0450	mPl Mittelwert [mN] 0,109 0,217 0,605 0,789	NR9C SEM [mN] 0,034 0,095 0,271 0,231	p-Wert 0,0958 0,3745 0,3982 0,0687	
Konzentration [nM] 1 3 10 30 100	tgr Mittelwert [mN] 0,083 0,200 0,483 0,914 1,436	0,133 nPLN SEM [mN] 0,104 0,128 0,128 0,217 0,317	p-Wert 0,9873 0,7542 0,0746 0,0450 0,0312	2,007 mPl Mittelwert [mN] 0,109 0,217 0,605 0,789 1,105	NR9C SEM [mN] 0,034 0,095 0,271 0,231 0,309	p-Wert 0,0958 0,3745 0,3982 0,0687 0,0537	
Konzentration [nM] 1 3 10 30 100 30 100 300	tgr Mittelwert [mN] 0,083 0,200 0,483 0,914 1,436 1,663	0,133 nPLN SEM [mN] 0,104 0,128 0,217 0,317 0,390	p-Wert 0,9873 0,7542 0,0746 0,0450 0,0312 0,0418	2,007 mP Mittelwert [mN] 0,109 0,217 0,605 0,789 1,105 1,309	NR9C SEM [mN] 0,034 0,095 0,271 0,231 0,309 0,346	p-Wert 0,0958 0,3745 0,3982 0,0687 0,0537 0,0381	

Tabelle 7: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der absoluten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Bei der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei der absoluten Kraft. Mit zunehmender Isoprenalin-Stimulation zeigt sich eine signifikante Zunahme der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs in allen Mauslinien ausgenommen der Mauslinie PLNR9C. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Mauslinien bestehen auch hier zu keinem Zeitpunkt.

Konzentration [nM]	,	WT		PLNR9C		
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert
1	0,968	0,861	0,9351	1,554	2,129	0,9910
3	4,057	2,228	0,6237	8,021	2,743	0,2398
10	10,500	2,652	0,0426	15,990	4,433	0,1259
30	15,760	3,413	0,0175	26,920	7,528	0,1297
100	23,440	4,793	0,0122	45,140	10,760	0,0743
300	28,940	5,433	0,0070	53,490	12,250	0,0639
1000	20 820	4 617	0 0018	60 540	13 620	0 0507
1000	25,820	4,017	0,0010	00,540	15,020	0,0397
Konzentration [nM]	tgi	mPLN	0,0018	mP	LNR9C	0,0397
Konzentration [nM]	tgr Mittelwert [mN/s]	mPLN SEM [mN/s]	p-Wert	mP Mittelwert [mN/s]	LNR9C SEM [mN/s]	p-Wert
Konzentration [nM]	tgi Mittelwert [mN/s] 2,120	mPLN SEM [mN/s] 2,132	p-Wert 0,9612	mP Mittelwert [mN/s] 2,116	LNR9C SEM [mN/s] 0,509	p-Wert 0,0207
Konzentration [nM]	123,020 tgr Mittelwert [mN/s] 2,120 5,506	mPLN SEM [mN/s] 2,132 2,663	p-Wert 0,9612 0,5048	Mittelwert [mN/s] 2,116 5,980	LNR9C SEM [mN/s] 0,509 2,485	p-Wert 0,0207 0,3179
Konzentration [nM]	Mittelwert [mN/s] 2,120 5,506 12,790	4,017 mPLN SEM [mN/s] 2,132 2,663 3,165	p-Wert 0,9612 0,5048 0,0542	Mittelwert [mN/s] 2,116 5,980 16,460	LNR9C SEM [mN/s] 0,509 2,485 6,773	p-Wert 0,0207 0,3179 0,3080
Konzentration [nM] 1 3 100 30	tgi Mittelwert [mN/s] 2,120 5,506 12,790 24,830	nPLN SEM [mN/s] 2,132 2,663 3,165 5,075	p-Wert 0,9612 0,5048 0,0542 0,0211	mP Mittelwert [mN/s] 2,116 5,980 16,460 21,780	LNR9C SEM [mN/s] 0,509 2,485 6,773 6,024	p-Wert 0,0207 0,3179 0,3080 0,0503
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100	tgi Mittelwert [mN/s] 2,120 5,506 12,790 24,830 40,380	nPLN SEM [mN/s] 2,132 2,663 3,165 5,075 7,772	p-Wert 0,9612 0,5048 0,0542 0,0211 0,0153	Mittelwert [mN/s] 2,116 5,980 16,460 21,780 31,040	LNR9C SEM [mN/s] 0,509 2,485 6,773 6,024 8,057	p-Wert 0,0207 0,3179 0,3080 0,0503 0,0341
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100 300	Image: milling Mittelwert [mN/s] 2,120 5,506 12,790 24,830 40,380 47,700	nPLN SEM [mN/s] 2,132 2,663 3,165 5,075 7,772 9,607	p-Wert 0,9612 0,5048 0,0542 0,0211 0,0153 0,0195	Mittelwert [mN/s] 2,116 5,980 16,460 21,780 31,040 37,750	LNR9C SEM [mN/s] 0,509 2,485 6,773 6,024 8,057 9,134	p-Wert 0,0207 0,3179 0,3080 0,0503 0,0341 0,0215

Tabelle 8: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls verhält sich konform zur absoluten Kraft sowie zur Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Auch Erstgenannte zeigt eine signifikante Zunahme in allen Mauslinien außer der Mauslinie PLNR9C unter steigenden Isoprenalin-Konzentrationen. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien bestehen auch hier zu keinem Zeitpunkt.

Konzentration [nM]	,	WT		PLNR9C			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
1	-1,528	0,803	0,5794	-1,764	2,363	0,9898	
3	-5,573	2,263	0,3160	-7,775	2,876	0,2952	
10	-12,700	2,786	0,0189	-16,200	4,430	0,1203	
30	-18,950	3,576	0,0072	-26,500	7,422	0,1304	
100	-26,960	4,712	0,0043	-43,660	10,520	0,0770	
300	-33,760	5,052	0,0014	-51,130	12,160	0,0735	
1000	-34 110	1 162	0 0003	-59.020	12 210	0 0603	
1000	-34,110	4,102	0,0003	-39,020	13,510	0,0003	
Konzentration [nM]	-54,110 tgi	4,102 mPLN	0,0003	-59,020 mPl	LNR9C	0,0003	
Konzentration [nM]	tgi Mittelwert [mN/s]	mPLN SEM [mN/s]	p-Wert	mP Mittelwert [mN/s]	LNR9C SEM [mN/s]	p-Wert	
Konzentration [nM]	Mittelwert [mN/s] -2,617	mPLN SEM [mN/s] 2,288	p-Wert 0,9259	mP Mittelwert [mN/s] -3,450	LNR9C SEM [mN/s] 1,419	p-Wert 0,3078	
Konzentration [nM]	-34,110 tgr Mittelwert [mN/s] -2,617 -5,535	4,102 mPLN SEM [mN/s] 2,288 3,193	p-Wert 0,9259 0,6730	mP Mittelwert [mN/s] -3,450 -5,789	LNR9C SEM [mN/s] 1,419 2,653	p-Wert 0,3078 0,4220	
Konzentration [nM]	-34,110 tgr Mittelwert [mN/s] -2,617 -5,535 -12,950	4,102 mPLN SEM [mN/s] 2,288 3,193 3,248	p-Wert 0,9259 0,6730 0,0576	-59,020 mP Mittelwert [mN/s] -3,450 -5,789 -15,130	LNR9C SEM [mN/s] 1,419 2,653 6,426	p-Wert 0,3078 0,4220 0,3402	
Konzentration [nM] 1 3 100 30	-34,110 tgi Mittelwert [mN/s] -2,617 -5,535 -12,950 -23,990	4,102 mPLN SEM [mN/s] 2,288 3,193 3,248 5,558	p-Wert 0,9259 0,6730 0,0576 0,0397	mP Mittelwert [mN/s] -3,450 -5,789 -15,130 -19,880	LNR9C SEM [mN/s] 1,419 2,653 6,426 5,758	p-Wert 0,3078 0,4220 0,3402 0,0657	
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100	-34,110 tgr Mittelwert [mN/s] -2,617 -5,535 -12,950 -23,990 -39,100	4,102 mPLN SEM [mN/s] 2,288 3,193 3,248 5,558 8,251	p-Wert 0,9259 0,6730 0,0576 0,0397 0,0249	-33,020 mP Mittelwert [mN/s] -3,450 -5,789 -15,130 -19,880 -28,930	LNR9C SEM [mN/s] 1,419 2,653 6,426 5,758 7,467	p-Wert 0,3078 0,4220 0,3402 0,0657 0,0329	
Konzentration [nM] 1 3 10 30 100 300	-34,110 tgr Mittelwert [mN/s] -2,617 -5,535 -12,950 -23,990 -39,100 -46,450	4,102 nPLN SEM [mN/s] 2,288 3,193 3,248 5,558 8,251 10,310	p-Wert 0,9259 0,6730 0,0576 0,0397 0,0249 0,0320	mP Mittelwert [mN/s] -3,450 -5,789 -15,130 -19,880 -28,930 -35,970	LNR9C SEM [mN/s] 1,419 2,653 6,426 5,758 7,467 9,019	p-Wert 0,3078 0,4220 0,3402 0,0657 0,0329 0,0273	

Tabelle 9: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Zusammenfassend kann parameterübergreifend eine Wirkung Isoprenalins im Sinne einer gesteigerten Kraftentwicklung in den Mauslinien WT, mPLNR9C sowie tgmPLN nachgewiesen werden, während sich für PLNR9C keine signifikanten Unterschiede in der Kraftentwicklung unter verschiedenen Isoprenalin-Konzentrationen zeigen. Die Kraftentwicklung könnte demnach in der Mauslinie mit der Mutation PLNR9C eingeschränkt sein, auch wenn sich die Änderung der maximal entwickelten Kraft in dieser Mauslinie nicht signifikant von den anderen Mauslinien unterscheidet. Bei sehr hohem Standardfehler könnte es aber auch ein Problem der Rekrutierung sein. Die Mauslinie PLNR9C hat die geringste Gruppengröße mit lediglich sechs Tieren. Durch den hohen Standardfehler zwischen diesen Tieren und damit einer heterogenen Gruppe könnte dies die Ursache für die nicht signifikante Kraftsteigerung unter Isoprenalin-Stimulation sein.

3.4.3 AUSWERTUNG DER EC₅₀ BEI DER MUTATION PLNR9C

Anhand der ermittelten Werte im Rahmen der Kraftentwicklung unter Isoprenalin-Stimulation wurde für die Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN die EC_{50} errechnet. Anhand der Dosis-Wirkungskurve und der EC_{50} kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie viel Isoprenalin benötigt wird, um 50 % der Kraft zu erreichen. Um die Dosis-Wirkungskurve und anhand derer die EC_{50} zu berechnen, wurden die Papillarmuskeln mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert und die Isoprenalin-Konzentration zugleich alle zwei Minuten schrittweise bis auf 1000 nM gesteigert. Nach Abschluss der Messungen wurde der Ausgangswert (*Baseline*) als Minimum und die höchste Kraftentwicklung als Maximum festgelegt. Danach wurde für jede Maus die EC_{50} und für die jeweilige Mauslinie der Mittelwert sowie der Standardfehler bestimmt. Die Dosis-Wirkungskurven und Auswertung der EC_{50} für die Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN sind für die Parameter absolute Kraft sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls dargestellt (Abb. 18). Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten zeigt Tabelle 10.

Insgesamt zeigt Abb. 18 einen ähnlichen Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurven für alle untersuchten Mauslinien. Dies gilt sowohl für die absolute Kraft wie auch für die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls. Für die EC_{50} der Kraftentwicklung von absoluter Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Der Mittelwert der EC_{50} der absoluten Kraft liegt bei etwa 33 nM Isoprenalin für alle Mauslinien. Der Mittelwert der EC_{50} für die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ist etwas weiter gefächert zwischen 35 und 51 nM Isoprenalin. Bei der Geschwindigkeit des Kraftabfalls besteht der größte Unterschied zwischen den Mittelwerten der EC_{50} zwischen den verschiedenen Mauslinien von 28 bis 55 nM Isoprenalin. Hier ist davon auszugehen, dass jeder Muskel in etwa dieselbe Menge an Isoprenalin benötigt, um 50 % seines Kraftmaximums zu generieren. Die Ergebnisse lassen demnach keine elektrophysiologischen Unterschiede zwischen den Mauslinien vermuten.





Dosis-Wirkungskurven (A, B, C) und ermittelte EC_{50} (A', B', C') der Kraftentwicklung in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN unter Stimulation mit Isoprenalin für die Parameter absolute Kraft (A/A'), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B/B') sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C/C').

	Maximale Kraft Geschwindigkeit des Kraftanstiegs				es	Geschwindigkeit des Kraftabfalls			
	Mittelwert [nM]	SEM [nM]	p-Wert	Mittelwert [nM]	SEM [nM]	p-Wert	Mittelwert [nM]	SEM [nM]	p-Wert
WT	33,000	14,120		39,530	15,130		34,190	9,564	
PLNR9C	33,390	13,640	0,9999	51,090	15,100	0,9999	55,160	18,470	0,9999
mPLNR9C	31,960	7,656	0,9999	46,790	11,020	0,9999	39,850	5,519	0,9999
tgmPLN	35,000	9,937	0,9999	34,660	9,033	0,9999	27,850	5,838	0,9999

Tabelle 10: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte der EC₅₀ für die Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, PLNR9C, mPLNR9C und tgPLN

P-Werte beziehen sich auf den Vergleich zum WT; Kruskal-Wallis test mit anschließendem Dunn's multiple comparisons test.

3.5 CHARAKTERISIERUNG VON TGPLN-MÄUSEN MIT HILFE DES ORGANBADS

Im Folgenden wurde der Einfluss der genetischen Veränderungen in den Mauslinien tgPLN, tgmPLN A und PLNKO auf die elektrophysiologische Funktion der Herzmuskulatur näher untersucht. Diese unterscheiden sich in der Fähigkeit pentameres PLN zu bilden (tgPLN), nur monomeres PLN zu bilden (tgmPLN A) und kein PLN zu bilden (PLNKO). Hieran soll erforscht werden, inwieweit sich die *in vitro* bereits nachgewiesene Veränderung des Kalziumkreislaufes auf die Funktion der Muskulatur auswirkt. Hierfür wurde analog zu oben beschriebenen Untersuchungen die Kraftentwicklung der präparierten Papillarmuskeln mittels Kraftaufnehmer im Organbad unter einer Stimulation von 1 Hz gemessen und die Kraft von zehn aufeinanderfolgenden Schlägen gemittelt. Unter Einfluss der Vorspannung sowie einer Stimulation mit Isoprenalin wurde jeweils die absolute Kraft sowie die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls ermittelt (siehe Kap. 2.2.3.4). Die elektrophysiologische Funktion wurde anhand dieser Parameter charakterisiert und mit dem WT verglichen.

3.5.1 UNTERSUCHUNG DER VORSPANNUNG BEI DER MAUSLINIE TGPLN

Die Untersuchung der Vorspannung erfolgte analog zu den Mauslinien PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN an den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO (Abb. 19). Hierfür wurde nach einer Äquilibrierungsphase von 10 min die Vorspannung im Organbad kontinuierlich um 1 mN bis zu einer maximalen Vorspannung von 5 mN oder bis zum Versagen des Muskels erhöht. Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten sind in Tabelle 11-13 dargestellt.

Wie in Abb. 19 ersichtlich, ist die absolute Kraft für alle Mauslinien unter Veränderung der Vorspannung nahezu konstant. Es zeigen sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Messpunkten innerhalb einer Mauslinie noch zwischen den verschiedenen Mauslinien.



Abb. 19: Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

Kraftentwicklung für die Parameter absolute Kraft (A), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) bei steigender Vorspannung in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*; $\pm p < 0.05$ gegenüber 1 mN für tgmPLN A; $\pm p < 0.01$ gegenüber der *Baseline* für tgmPLN A.

Vorspannung [mN]	V	VT		tgPLN			
	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	
0	1,742	0,280	0,5912	1,112	0,324	0,3722	
1	1,931	0,331		1,732	0,427		
2	1,598	0,216	0,6151	1,960	0,291	0,7638	
3	1,622	0,186	0,8964	1,870	0,274	0,9974	
4	1,451	0,211	0,8425	1,510	0,272	0,9781	
5	1,228	0,281	0,7919	1,100	0,228	0,5937	
	tgmPLN A			PLNKO			
vorspannung [miN]	tgm	PLN A		PL	NKO		
	tgm Mittelwert [mN]	PLN A SEM [mN]	p-Wert	PL Mittelwert [mN]	NKO SEM [mN]	p-Wert	
	tgm Mittelwert [mN] 1,021	PLN A SEM [mN] 0,238	p-Wert 0,0756	PL Mittelwert [mN] 1,046	NKO SEM [mN] 0,585	p-Wert 0,5905	
0	tgm Mittelwert [mN] 1,021 1,418	PLN A SEM [mN] 0,238 0,201	p-Wert 0,0756	PL Mittelwert [mN] 1,046 1,365	NKO SEM [mN] 0,585 0,768	p-Wert 0,5905	
0 1 2	tgm Mittelwert [mN] 1,021 1,418 1,195	PLN A SEM [mN] 0,238 0,201 0,172	p-Wert 0,0756 0,3579	Mittelwert [mN] 1,046 1,365 1,223	NKO SEM [mN] 0,585 0,768 0,609	p-Wert 0,5905 0,9381	
0 0 1 2 3	tgm Mittelwert [mN] 1,021 1,418 1,195 1,007	PLN A SEM [mN] 0,238 0,201 0,172 0,153	p-Wert 0,0756 0,3579 0,1243	Mittelwert [mN] 1,046 1,365 1,223 1,076	NKO SEM [mN] 0,585 0,768 0,609 0,490	p-Wert 0,5905 0,9381 0,8944	
0 0 1 2 3 4	tgm Mittelwert [mN] 1,021 1,418 1,195 1,007 0,962	PLN A SEM [mN] 0,238 0,201 0,172 0,153 0,153	p-Wert 0,0756 0,3579 0,1243 0,1015	Mittelwert [mN] 1,046 1,365 1,223 1,076 0,906	NKO SEM [mN] 0,585 0,768 0,609 0,490 0,367	p-Wert 0,5905 0,9381 0,8944 0,8483	

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test.*

Bei der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zeigt sich gegenüber der absoluten Kraft ein Maximum bei einer Vorspannung von 1 mN. Dies gilt jedoch ausschließlich für die Mauslinie tgmPLN A, für welche die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs bei 1 mN signifikant über jener des Ausgangswertes (*Baseline*) liegt. Für diese Mauslinie zeigt sich darüber hinaus unter weiterer Erhöhung der Vorspannung (ab 3 mN) ein signifikanter Abfall der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Alle weiteren Mauslinien zeigen hingegen analog zur absoluten Kraft keine signifikanten Unterschiede unter Veränderung der Vorspannung. Auch signifikante Unterschiede zwischen den Mauslinien bestehen trotz des differierenden Verhaltens auf die Veränderung der Vorspannung nicht.

Vorspannung [mN]	١	NT		tgPLN			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	34,940	5,833	0,1242	19,130	5,546	0,1849	
1	42,470	7,316		36,200	9,351		
2	33,540	4,839	0,3894	39,660	6,099	0,9407	
3	30,210	3,201	0,4918	33,630	5,480	0,9987	
4	23,600	3,920	0,3676	21,280	4,433	0,4682	
5	15,310	4,389	0,3799	14,110	3,242	0,2091	
Vorspannung [mN]	tgm	PLN A		PLNKO			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	20,170	4,973	0,0030	23,030	12,420	0,4747	
1	31,270	4,632		30,790	16,210		
2	25,220	3,961	0,1066	25,350	12,960	0,6449	
3	17,510	3,292	0,0164	19,770	9,603	0,6270	
4	14,210	2,729	0,0214	13,150	5,778	0,6129	
5	11,720	1,886	0,0170	7,615	2,939	0,5866	

Tabelle 12: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls verhält sich konform zur Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Es zeigt sich ein Maximum bei einer Vorspannung von 1 mN für die Mauslinie tgmPLN A, wobei der beschriebene Anstieg sowohl gegenüber dem Ausgangswert (*Baseline*) als auch gegenüber einer weiteren Erhöhung der Vorspannung auf 3, 4 und 5 mN signifikant ist. Alle weiteren Mauslinien zeigen analog zu der absoluten Kraft sowie der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Mauslinie. Ebenso zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien.

Vorspannung [mN]	١	NT	tgPLN				
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	-30,860	5,315	0,1450	-15,890	4,624	0,1791	
1	-37,290	6,378		-31,790	8,430		
2	-27,220	3,280	0,2685	-31,130	5,632	0,9999	
3	-23,530	2,137	0,3518	-25,960	4,568	0,9482	
4	-18,710	2,841	0,3011	-16,340	3,571	0,3410	
5	-11,870	3,052	0,3416	-10,380	2,396	0,1667	
Vorspannung [mN]	tgmPLN A			PLNKO			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
0	-17,810	4,261	0,0015	-20,320	10,620	0,3164	
1	-27,870	4,125		-26,650	12,980		
2	-22,190	3,342	0,0872	-20,540	8,992	0,7178	
3	-15,070	2,634	0,0105	-15,670	5,863	0,7307	
4	-11,850	2,132	0,0158	-10,880	3,696	0,6331	
5	-9,988	1,671	0,0117	-6,593	1,921	0,5688	

Tabelle 13: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Erhöhung der Vorspannung isolierter Papillarmuskeln in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf eine Vorspannung von 1 mN; *Mixed-effects analysis* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Zusammenfassend zeigen sich in keinem Parameter signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Jedoch fällt insbesondere für die Mauslinie tgmPLN A eine stärkere Dynamik mit einem Maximum bei 1 mN und signifikanter Verminderung der Kraftentwicklung in den Parametern Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls unter Erhöhung der Vorspannung auf. Die Kraftentwicklung für die Mauslinien WT, tgPLN und PLNKO verhält sich hingegen unter Veränderung der Vorspannung in allen drei untersuchten Parametern nahezu konstant. Analog zu den Ergebnissen aus Kap. 3.4.1 scheint auch hier die Mauslinie mit ausschließlich monomerem PLN sensibler auf eine Veränderung der Vorspannung zu reagieren als die übrigen Mauslinien.

3.5.2 UNTERSUCHUNG DER ISOPRENALIN-STIMULATION BEI DER MAUSLINIE TGPLN

Neben der Messung unter Veränderung der Vorspannung wurden darüber hinaus analog zu den Mauslinien PLNR9C, mPLNR9C und tgmPLN elektrophysiologische Messungen an den Papillarmuskeln im Organbad unter steigender Isoprenalin-Konzentration durchgeführt. Diese wurden analog zu den Versuchen mit der Mutation R9C durchgeführt. Inwiefern die Mauslinien tgPLN, tgmPLN A und PLNKO Einfluss auf die Kraftentwicklung haben und wie diese im Verhältnis zueinander und zum WT steht, wurde in diesem Abschnitt ebenfalls anhand der Parameter absolute Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls untersucht (Abb. 20). Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten sind in Tabelle 14-16 dargestellt.

In den Papillarmuskeln aus Mäusen der Linie WT, tgPLN sowie tgmPLN A zeigt Abb. 20A für die absolute Kraft einen progredienten Anstieg unter steigenden Isoprenalin-Konzentrationen. Für die Mauslinie PLNKO, also jene ganz ohne PLN, führt eine steigende Konzentration an Isoprenalin im Organbad nicht zu einem signifikanten Anstieg der maximalen Kraft. Die Mauslinien reagieren demnach zum Teil sehr unterschiedlich auf einen Stimulus mit Isoprenalin. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien bestehen bezüglich der absoluten Kraft zu keinem Zeitpunkt.



Abb. 20: Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

Kraftentwicklung für die Parameter absolute Kraft (A), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) unter Stimulation mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO; *2way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*; * p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001 gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für WT; † p < 0,05; †† p < 0,01 gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für tgPLN; ‡ p < 0,05; ‡‡ p < 0,01 gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für tgPLN; ‡ p < 0,05; ‡‡ p < 0,01 gegenüber dem Ausgangswert ohne Isoprenalin für tgPLN A; # p < 0,05 für tgPLN gegen tgmPLN A bei einer Stimulation von 1000 nM Isopreanlin.

Konzentration [nM]	N	NT		tgPLN			
	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	Mittelwert [mN]	SEM [mN]	p-Wert	
1	0,023	0,043	0,9990	0,140	0,067	0,4960	
3	0,160	0,106	0,7850	0,330	0,116	0,2156	
10	0,440	0,111	0,0418	0,568	0,154	0,0810	
30	0,679	0,149	0,0193	0,919	0,181	0,0175	
100	0,926	0,195	0,0146	1,515	0,275	0,0111	
300	1,129	0,201	0,0048	1,888	0,332	0,0094	
1000	1 087	0 153	0 0009	2 160	0 276	0 0088	
1000	1,007	0,155	0,0005	2,100	0,370	0,0088	
Konzentration [nM]	tgm	PLN A	0,0005		0,370 NKO	0,0088	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN]	PLN A SEM [mN]	p-Wert	PL Mittelwert [mN]	NKO SEM [mN]	p-Wert	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN] 0,108	PLN A SEM [mN] 0,046	p-Wert 0,3477	PL Mittelwert [mN] -0,010	NKO SEM [mN] 0,048	p-Wert 0,9999	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN] 0,108 0,164	0,133 PLN A SEM [mN] 0,046 0,039	p-Wert 0,3477 0,0154	PL Mittelwert [mN] -0,010 0,080	0,370 NKO SEM [mN] 0,048 0,049	p-Wert 0,9999 0,7191	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN] 0,108 0,164 0,332	0,133 PLN A SEM [mN] 0,046 0,039 0,066	p-Wert 0,3477 0,0154 0,0032	PL Mittelwert [mN] -0,010 0,080 0,228	0,370 NKO SEM [mN] 0,048 0,049 0,109	p-Wert 0,9999 0,7191 0,5497	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN] 0,108 0,164 0,332 0,504	PLN A SEM [mN] 0,046 0,039 0,066 0,090	p-Wert 0,3477 0,0154 0,0032 0,0012	PL Mittelwert [mN] -0,010 0,080 0,228 0,347	NKO SEM [mN] 0,048 0,049 0,109 0,216	p-Wert 0,99999 0,7191 0,5497 0,7372	
Konzentration [nM] 1 3 10 30 100	tgm Mittelwert [mN] 0,108 0,164 0,332 0,504 0,695	0,133 PLN A SEM [mN] 0,046 0,039 0,066 0,090 0,120	p-Wert 0,3477 0,0154 0,0032 0,0012 0,0009	PL Mittelwert [mN] -0,010 0,080 0,228 0,347 0,518	0,370 NKO SEM [mN] 0,048 0,049 0,109 0,216 0,274	p-Wert 0,9999 0,7191 0,5497 0,7372 0,6242	
Konzentration [nM] 1 3 10 30 100 30 100 300	tgm Mittelwert [mN] 0,108 0,164 0,332 0,504 0,695 0,788	PLN A SEM [mN] 0,046 0,039 0,066 0,090 0,120 0,136	p-Wert 0,3477 0,0154 0,0032 0,0012 0,0009 0,0009	PL Mittelwert [mN] -0,010 0,080 0,228 0,347 0,518 0,643	NKO SEM [mN] 0,048 0,049 0,109 0,216 0,274 0,350	p-Wert 0,9999 0,7191 0,5497 0,7372 0,6242 0,6446	

Tabelle 14: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der absoluten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Bei der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei der absoluten Kraft. Mit zunehmender Isoprenalin-Stimulation zeigt sich eine signifikante Zunahme der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs in allen Mauslinien ausgenommen der Mauslinie ganz ohne PLN (PLNKO). Darüber hinaus liegt die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs für die Mauslinie tgPLN bei einer Stimulation von 1000 nM Isoprenalin signifikant über jener der Mauslinie tgmPLN A (p = 0,0477). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Mauslinien bestehen zu keinem Zeitpunkt.

Konzentration [nM]	,	WT	tgPLN			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert
1	0,968	0,861	0,9351	3,018	1,426	0,4818
3	4,057	2,228	0,6237	7,360	2,302	0,1454
10	10,500	2,652	0,0426	13,360	3,781	0,0979
30	15,760	3,413	0,0175	21,850	4,109	0,0135
100	23,440	4,793	0,0122	37,420	6,356	0,0076
300	28,940	5,433	0,0070	48,140	8,031	0,0069
1000	20 820	4 6 1 7	0.0019	E6 900	0 120	0.0056
1000	29,820	4,017	0,0018	30,800	9,130	0,0050
Konzentration [nM]	29,820 tgm	1,017 PLN A	0,0018	90,800 PL	9,130 NKO	0,0030
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN/s]	PLN A SEM [mN/s]	p-Wert	Pl Mittelwert [mN/s]	9,130 .NKO SEM [mN/s]	p-Wert
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN/s] 2,904	PLN A SEM [mN/s] 1,134	p-Wert 0,2475	PL Mittelwert [mN/s] 0,202	NKO SEM [mN/s] 1,306	p-Wert 0,9999
Konzentration [nM]	Z9,820 tgm Mittelwert [mN/s] 2,904 4,013	1PLN A SEM [mN/s] 1,134 0,908	p-Wert 0,2475 0,0101	Pl Mittelwert [mN/s] 0,202 1,935	NKO SEM [mN/s] 1,306 1,181	p-Wert 0,9999 0,7252
Konzentration [nM]	23,820 tgm Mittelwert [mN/s] 2,904 4,013 8,171	4,017 PLN A SEM [mN/s] 1,134 0,908 1,486	p-Wert 0,2475 0,0101 0,0015	Pl Mittelwert [mN/s] 0,202 1,935 5,981	NKO SEM [mN/s] 1,306 1,181 2,803	p-Wert 0,9999 0,7252 0,5327
Konzentration [nM] 1 3 100 30	tgm Mittelwert [mN/s] 2,904 4,013 8,171 12,530	4,017 PLN A SEM [mN/s] 1,134 0,908 1,486 2,113	p-Wert 0,2475 0,0101 0,0015 0,0007	Pl Mittelwert [mN/s] 0,202 1,935 5,981 8,938	NKO SEM [mN/s] 1,306 1,181 2,803 5,440	p-Wert 0,9999 0,7252 0,5327 0,7232
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100	tgm Mittelwert [mN/s] 2,904 4,013 8,171 12,530 18,110	4,017 PLN A SEM [mN/s] 1,134 0,908 1,486 2,113 2,963	p-Wert 0,2475 0,0101 0,0015 0,0007 0,0005	Pl Mittelwert [mN/s] 0,202 1,935 5,981 8,938 14,620	NKO SEM [mN/s] 1,306 1,181 2,803 5,440 7,334	p-Wert 0,9999 0,7252 0,5327 0,7232 0,5839
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100 300	L3,820 tgm Mittelwert [mN/s] 2,904 4,013 8,171 12,530 18,110 21,380	4,017 PLN A SEM [mN/s] 1,134 0,908 1,486 2,113 2,963 3,389	p-Wert 0,2475 0,0101 0,0015 0,0007 0,0005 0,0004	Pl Mittelwert [mN/s] 0,202 1,935 5,981 8,938 14,620 18,360	NKO SEM [mN/s] 1,306 1,181 2,803 5,440 7,334 9,633	p-Wert 0,99999 0,7252 0,5327 0,7232 0,5839 0,6176

Tabelle 15: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls verhält sich konform zur Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und großteils konform zur absoluten Kraft. Eine Stimulation der Papillarmuskeln mit Isoprenalin führt in analoger Weise zu einem beschleunigten Kraftabfall in den Mauslinien WT, tgPLN und tgmPLN A. Demgegenüber zeigt sich in der Mauslinie PLNKO kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert ohne Isoprenalin unter steigenden Stimulationsdosen mit Isoprenalin. Des Weiteren führt eine Isoprenalin-Stimulation von 1000 nM zu einer signifikant höheren Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Mauslinie tgPLN als in der Mauslinie tgmPLN A (p = 0,0461). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Mauslinien sind nicht zu beobachten.

Konzentration [nM]	,	WТ		tgPLN			
	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	Mittelwert [mN/s]	SEM [mN/s]	p-Wert	
1	-1,528	0,803	0,5794	-2,470	1,499	0,7162	
3	-5,573	2,263	0,3160	-6,217	2,123	0,1991	
10	-12,700	2,786	0,0189	-11,880	3,147	0,0739	
30	-18,950	3,576	0,0072	-19,330	3,810	0,0174	
100	-26,960	4,712	0,0043	-34,610	6,077	0,0092	
300	-33,760	5,052	0,0014	-46,470	7,900	0,0077	
1000	24 110	4 162	0 0003		0.027		
1000	-34,110	4,102	0,0003	-33,800	9,037	0,0058	
Konzentration [nM]	-54,110 tgm	4,102 PLN A	0,0003	-55,800 PL	9,037 NKO	0,0058	
Konzentration [nM]	tgm Mittelwert [mN/s]	PLN A SEM [mN/s]	p-Wert	PL Mittelwert [mN/s]	NKO SEM [mN/s]	p-Wert	
Konzentration [nM]	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726	4,102 PLN A SEM [mN/s] 1,067	p-Wert 0,2492	PL Mittelwert [mN/s] -0,749	NKO SEM [mN/s] 1,318	p-Wert 0,9968	
Konzentration [nM]	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726 -4,048	4,102 IPLN A SEM [mN/s] 1,067 0,842	p-Wert 0,2492 0,0051	PL Mittelwert [mN/s] -0,749 -2,388	9,057 NKO SEM [mN/s] 1,318 1,410	p-Wert 0,9968 0,7024	
Konzentration [nM]	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726 -4,048 -7,905	4,102 IPLN A SEM [mN/s] 1,067 0,842 1,570	p-Wert 0,2492 0,0051 0,0034	PL Mittelwert [mN/s] -0,749 -2,388 -6,014	NKO SEM [mN/s] 1,318 1,410 2,810	p-Wert 0,9968 0,7024 0,5305	
Konzentration [nM] 1 3 100 30	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726 -4,048 -7,905 -12,260	4,102 IPLN A SEM [mN/s] 1,067 0,842 1,570 2,321	p-Wert 0,2492 0,0051 0,0034 0,0022	PL Mittelwert [mN/s] -0,749 -2,388 -6,014 -9,166	NKO SEM [mN/s] 1,318 1,410 2,810 5,459	p-Wert 0,9968 0,7024 0,5305 0,7085	
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726 -4,048 -7,905 -12,260 -16,970	4,102 PLN A SEM [mN/s] 1,067 0,842 1,570 2,321 3,000	p-Wert 0,2492 0,0051 0,0034 0,0022 0,0011	PL Mittelwert [mN/s] -0,749 -2,388 -6,014 -9,166 -14,190	NKO SEM [mN/s] 1,318 1,410 2,810 5,459 7,269	p-Wert 0,9968 0,7024 0,5305 0,7085 0,5996	
Konzentration [nM] 1 3 100 30 100 300	-34,110 tgm Mittelwert [mN/s] -2,726 -4,048 -7,905 -12,260 -16,970 -20,400	4,102 PLN A SEM [mN/s] 1,067 0,842 1,570 2,321 3,000 3,386	p-Wert 0,2492 0,0051 0,0034 0,0022 0,0011 0,0006	PL Mittelwert [mN/s] -0,749 -2,388 -6,014 -9,166 -14,190 -18,250	NKO SEM [mN/s] 1,318 1,410 2,810 5,459 7,269 9,745	p-Wert 0,9968 0,7024 0,5305 0,7085 0,5996 0,6306	

Tabelle 16: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte für die Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich innerhalb der gleichen Mauslinie auf den Ausgangswert ohne Isoprenalin; 2way ANOVA mit anschließendem Tukey's multiple comparisons test. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind fett gedruckt.

Zusammenfassend kann parameterübergreifend eine Wirkung Isoprenalins im Sinne einer gesteigerten Kraftentwicklung in den Mauslinien WT, tgPLN sowie tgmPLN A nachgewiesen werden, während sich für PLNKO keine signifikanten Unterschiede in der Kraftentwicklung unter verschiedenen Isoprenalin-Konzentrationen zeigen. Die Kraftentwicklung scheint demnach in der Mauslinie PLNKO eingeschränkt zu sein. Allerdings besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Mauslinie PLNKO und den übrigen Mauslinien. Demgegenüber ist die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls unter Isoprenalin-Stimulation bei ausschließlich monomerem PLN (tgmPLN A) eingeschränkt gegenüber der Mauslinie tgPLN, bei welcher monomeres und pentameres PLN gebildet werden kann. Inwiefern dieser detektierte Unterschied auch bei der Untersuchung der Dosis-Wirkungskurven sowie der EC₅₀ in Erscheinung tritt, wurde im Folgenden näher untersucht.

3.5.3 AUSWERTUNG DER EC₅₀ BEI DER MAUSLINIE TGPLN

Anhand der ermittelten Werte im Rahmen der Kraftentwicklung unter Isoprenalin-Stimulation wurde in Analogie zu Kap. 3.4.3 für die Mauslinien tgPLN, tgmPLN A und PLNKO jeweils die Dosis-Wirkungskurve und die EC₅₀ berechnet und für die Parameter absolute Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls gegenüber dem WT dargestellt (Abb. 21). Die statistische Auswertung mit den zugehörigen Messwerten zeigt Tabelle 17.

Insgesamt zeigt Abb. 21 einen ähnlichen Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurven für alle untersuchten Mauslinien. Dies gilt sowohl für die absolute Kraft wie auch für die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls. Für die EC₅₀ der Kraftentwicklung von absoluter Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Gegenteilig zu den Untersuchungen zum direkten Einfluss von Isoprenalin auf die Kraftentwicklung zeigt die Dosis-Wirkungskurve zur Geschwindigkeit des Kraftabfalls für die Mauslinie tgPLN erst bei höherer Isoprenalin-Konzentration eine Veränderung. Der Kurvenverlauf indiziert, dass Muskeln der Mauslinie tgPLN mehr Isoprenalin benötigen, um die gleiche Geschwindigkeit im Kraftabfall zu erzeugen wie die Vergleichstiere. Dennoch ist dieses Ergebnis bei fehlender Signifikanz kritisch zu hinterfragen (p = 0,0935 für WT gegen tgPLN). Der Mittelwert der EC₅₀ für die absolute Kraft liegt zwischen 39 und 68 nM Isoprenalin für die verschiedenen Mauslinien. Der Mittelwert der EC₅₀ für die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs befindet sich zwischen 30 und 52 nM Isoprenalin. Analog zu den Mauslinien mit der PLNR9C-Mutation bestand der größte Unterschied zwischen den Mittelwerten der EC_{50} bei der Geschwindigkeit des Kraftabfalls, diese reichten von 34 bis 86 nM Isoprenalin. Auch hier ist analog zu den Mauslinien mit einer R9C-Mutation davon auszugehen, dass jeder Muskel in etwa dieselbe Menge an Isoprenalin benötigt, um 50 % seines Kraftmaximums zu generieren.



Abb. 21: Dosis-Wirkungskurven und Ermittlung der EC₅₀ für die Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

Dosis-Wirkungskurven (A, B, C) und ermittelte EC_{50} (A', B', C') der Kraftentwicklung in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO wurden unter Stimulation mit Isoprenalin für die Parameter absolute Kraft (A/A'), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B/B') sowie Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C/C') ermittelt.

	Maximale Kraft			Geschwindigkeit des Kraftanstiegs			Geschwindigkeit des Kraftabfalls		
	Mittelwert [nM] SEM [nM] p-Wert			Mittelwert [nM]	SEM [nM]	p-Wert	Mittelwert [nM]	SEM [nM]	p-Wert
WT	33,000	14,120		39,530	15,130		34,190	9,564	
tgPLN	41,020	8,767	0,9774	52,080	7,045	0,4209	86,760	16,770	0,0935
tgmPLN A	39,560	16,290	0,9999	48,000	17,510	0,9999	61,540	20,890	0,9999
PLNKO	67,340	42,660	0,9999	30,130	4,315	0,9999	72,070	29,440	0,9999

Tabelle 17: Mittelwerte, Standardfehler und p-Werte der EC₅₀ für die Änderung der maximal entwickelten Kraft unter Stimulation der isolierten Papillarmuskeln mit Isoprenalin in den Mauslinien WT, tgPLN, tgmPLN A und PLNKO

P-Werte beziehen sich auf den Vergleich zum WT; Kruskal-Wallis test mit anschließendem Dunn's multiple comparisons test.
4 DISKUSSION

PLN spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Kalziumhaushalts von Herzmuskelzellen. PLN reduziert in monomerer Form durch direkte Interaktion die Aktivität der Kalzium-ATPase SERCA2a, sodass weniger Kalzium aus dem Zytosol in das SR zurücktransportiert wird. Damit einhergehend kann weniger Kalzium vor der nächsten Kontraktion freigesetzt werden.

Veränderungen in der Struktur von PLN, wie bei dem Gendefekt PLNR9C, in der Quantität von PLN sowie dem Verhältnis zwischen monomerem und pentamerem PLN beeinflussen die Funktion des Proteins und verändern damit den Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion [14].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kraftentwicklung von Papillarmuskeln transgener Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen und PLNKO-Mäusen im Organbad charakterisiert (siehe Kap. 2.2.3.4). Anhand dieser Versuche zur myokardialen Kraftentwicklung konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten ohne pentameres PLN sensibler auf eine β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin reagieren. Unter maximaler Stimulation zeigte sich in Papillarmuskeln von Mäusen mit einer AFA-Mutation jedoch eine geringere Geschwindigkeit des Kraftanstiegs sowie des Kraftabfalls als in Papillarmuskeln von Mäusen mit WT-PLN, welches zu großen Anteilen in pentamerer Form vorliegt.

Bei Tieren mit der PLN-Punktmutation R9C, welche zu einer DCM führt, zeigte sich überraschenderweise nur ein Trend hinsichtlich einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven mit Isoprenalin. Dieser Trend war bei der kombinierten Mutation AFA-PLNR9C, die kein pentameres PLN bilden kann, interessanterweise vollständig aufgehoben.

Eine schrittweise Steigerung der Vorspannung des Myokards konnte von allen PLN-Mutanten in vergleichbarer Weise kompensiert werden. Dies war zu erwarten, weil ein Einfluss von PLN auf die Sarkomerstruktur bisher nicht beschrieben ist.

4.1 EINFLUSS DER PHOSPHOLAMBAN-PENTAMERE AUF DIE Kraftentwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurden die monomeren Mauslinien (tgmPLN und tgmPLN A) den pentameren Mauslinien (tgPLN, WT) bezogen auf die Kraftentwicklung im Papillarmuskel vergleichend gegenübergestellt. Dabei wurde eine Erhöhung der Vorspannung sowie eine Stimulation mit Isoprenalin als Stimulus für Papillarmuskeln im Organbad genutzt.

Isoprenalin diente in den Versuchen der β -adrenergen Stimulation der Papillarmuskeln im Organbad. Über eine Phosphorylierung von PLN führt Isoprenalin dazu, dass das phosphorylierte monomere PLN die SERCA2a-Aktivität geringer hemmt und somit die SERCA2a-Aktivität gesteigert wird [41]. Durch eine gesteigerte Aktivität der SERCA2a kann mehr Kalzium über die Membran des SR transportiert werden, woraus eine erhöhte Kraftentwicklung resultiert [2, 42]. Im Rahmen der Kraftentwicklung zeigte sich, dass Isoprenalin einen unterschiedlichen Einfluss auf die Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der genetischen Differenzierung der Tiere nimmt. Die Mauslinien mit der Fähigkeit zur Pentamerisierung von PLN (tgPLN) zeigten die größte maximale Kraft sowie die größte Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und -abfalls unter maximaler Isoprenalin-Stimulation. Eine Unfähigkeit zur Bildung von PLN (PLNKO) resultierte hingegen in der geringstmöglichen Kraft. Ebenso führte auch der Verlust der Fähigkeit zur Bildung von PLN-Pentameren (tgmPLN) zu einer geringeren Kraft (maximale Kraft sowie Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und Geschwindigkeit des Kraftabfalls). Schon Funk et al. beschrieben eine verminderte Regulationsmöglichkeit der SERCA2a durch das Fehlen der PLN-Pentamere [16]. Als Folge kann die Muskulatur die Kraftentwicklung weniger steigern und zeigt eine geringere Differenz zwischen der basalen Kraftentwicklung und der maximalen Kraftentwicklung. Auch der geringe Unterschied zwischen den Gruppen tgmPLN und PLNKO lässt sich sehr gut erklären. Schon bei geringen Mengen Isoprenalin werden nahezu alle Monomere vollständig phosphoryliert, was eine vollständige Enthemmung der Aktivität der SERCA2a zur Folge hat. Eine weitere Steigerung der Kraft durch stärkere β -adrenerge Stimulation wird verhindert, da die PKA die PLN-Monomere bereits phosphoryliert hat. Jegliche weitere Erhöhung der Kraft kann also in beiden Gruppen (tgmPLN, PLNKO) nur über PLN unabhängige Mechanismen realisiert werden.

Die Unterschiede zwischen den Mauslinien tgmPLN A und tgPLN werden im Folgenden diskutiert. Die Mauslinie tgmPLN A entwickelte in jedem der drei Parameter absolute Kraft, Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Isoprenalin-Stimulation eine signifikant geringere Kraft als die Mauslinie tgPLN. Hierfür sind mehrere Erklärungsansätze möglich. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre der relative Anteil an monomerem PLN. Während in der monomeren Mutante bei gleicher PLN-Gesamtexpression [16] nur monomeres PLN exprimiert wird, teilt sich in der Vergleichsgruppe tgPLN die Gesamtexpression in die monomere und die pentamere Isoform auf. Die geringere Kraftentwicklung der monomeren Mutante könnte vor diesem Hintergrund dadurch erklärt werden, dass selbst unter maximaler Isoprenalin-Stimulation von 1000 nM unphosphorylierte PLN-Monomere verbleiben, welche eine Hemmung der SERCA2a-Aktivität realisieren. Dies steht jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen der AG Schmitt, welche an Western-Blot-Untersuchungen zeigen konnten, dass bei Mäusen der Gruppe tgmPLN die Monomere bereits in Ruhe weitestgehend phosphoryliert sind [16].

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine geringere Regulationsmöglichkeit der SERCA2a-Aktivität durch das Fehlen der pentameren PLN-Isoform in der Mauslinie tgmPLN A. Wie bereits durch Funk et al. beschrieben, kommt es durch das Fehlen der Pentamere schon bei geringer PKA-Aktivität zu einer weitgehenden Phosphorylierung der Monomere an der Position Ser¹⁶ von PLN [16]. Eine weitere Aktivierung der PKA bedingt so nur geringe Änderungen der prozentualen Phosphorylierung und der damit verbundenen Änderung der Kraftparameter.

Unklar bleibt, wie der Unterschied zwischen der transgenen Mauslinie tgPLN und dem WT zu erklären ist. Diese Mauslinien unterscheiden sich nur durch den genetischen Ort, an welchem PLN abgelesen wird. Somit wäre eine annähernd gleiche Kraftentwicklung über alle Parameter hinweg zu erwarten gewesen. Jedoch wurde von Funk et al. bereits beschrieben, dass die Mauslinie tgPLN etwa 1,2-mal so viel PLN exprimiert wie der WT [16]. Unter basalen Bedingungen liegt somit in der Mauslinie tgPLN mehr monomeres PLN vor, welches durch eine stärkere Hemmung der SERCA2a-Aktivität die geringere Kraftentwicklung der Mauslinie tgPLN unter basalen Bedingungen erklären könnte. Die Isoprenalin-Stimulation führt anschließend vermutlich zu einer ausreichend starken Phosphorylierung der PLN-Monomere und einer größeren Kraftentwicklung in Papillarmuskeln der Mauslinie tgPLN gegenüber dem WT. Unter maximaler Stimulation ist der initial bestehende Unterschied nivelliert, weil die PLN-Monomere in beiden Mauslinien möglicherweise nahezu vollständig phosphoryliert sind und die SERCA2a maximal enthemmt arbeiten kann. Insgesamt ist durch das Vorhandensein von mehr sowohl monomerem als auch pentamerem PLN die Aktivitätsbreite der SERCA2a vergrößert und die mögliche Hemmung verstärkt, bei maximaler Enthemmung sind jedoch dieselben Kraftparameter wie im WT erreichbar.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung ist, dass die Mauslinie tgPLN eine höhere Expression der SERCA2a ausbildet als der WT. Durch eine höhere Expression der SERCA2a kann mehr Kalzium zurück in das SR gefördert werden, woraus eine größere Kraftentwicklung resultiert. Um dies zu untersuchen, könnte die SERCA-Expression in Papillarmuskeln der verschiedenen Mauslinien untersucht werden. Ein Einfluss der SERCA2a-Expression auf die myokardiale Kraftentwicklung wurde am Mausmodell bereits belegt [43] und hat Einzug in klinische Studien zur Herzinsuffizienztherapie gefunden [12, 44]. Greenberg et al. (2016) untersuchten in einer humanen Studie den Einfluss einer Induktion der SERCA2a-Expression auf die kardiale Kraftentwicklung. Hierfür wurden Patienten Vektoren eingeimpft, welche eine Expression der SERCA induzieren sollten. Die Studie konnte jedoch die Erwartungen einer Herzinsuffizienztherapie nicht erfüllen. Es zeigte sich kein Vorteil durch die Gentherapie mittels SERCA2a-Kopien. Im Rahmen der Aufarbeitung wurde jedoch festgestellt, dass in untersuchtem Gewebe der Patienten die SERCA2a-Kopienanzahl an der unteren Messgrenze lag [44]. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Versagen der klinischen Anwendung sein.

Im Rahmen der Isoprenalin-Stimulation von Papillarmuskeln im Organbad wurde zur Evaluation der Sensitivität der einzelnen Mauslinien auf die Stimulation die Dosis-Wirkungskurve sowie die EC_{50} berechnet. Hierbei zeigte sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für die Mauslinie tgmPLN A in der Dosis-Wirkungskurve ein annähernd linearer Verlauf, während sich die gemessenen Kraftparameter unter Isoprenalin-Stimulation in der pentameren Vergleichsgruppe sigmoidal entwickelten (siehe Kapitel 3.5.3). Auch hier findet sich ein Erklärungsansatz in den Ergebnissen von Funk et al., wo eine basal fast maximale Stimulation der SERCA2a-Aktivität in Herzmuskeln aus AFAmutierten Mäusen beschrieben wird [16]. Wittmann et al. (2015) wiesen zusätzlich nach, dass eine β adrenerge Stimulation prozentual zu einer ähnlichen maximalen Phosphorylierung von PLN- Monomeren in Mäusen mit und ohne pentameres PLN führt. Jedoch zeigte sich in Mauslinien mit ausschließlich monomerem PLN deutlich früher eine höhere Phosphorylierung im Vergleich zu Tieren mit monomerem und pentamerem PLN [22]. Die maximale Aktivität der SERCA2a sollte demnach vergleichbar sein.

Die gegenüber der pentameren Mutante bereits früher erhöhte Phosphorylierung der PLN-Monomere, respektive die basal bereits weit enthemmte Aktivität der SERCA2a, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit am schneller eintretenden Kraftanstieg bei den monomeren Mutanten. Trotzdem zeigte sich in den vorliegenden Versuchen ein weiterer Kraftanstieg der monomeren Mutanten, welcher möglicherweise durch die Phosphorylierung der Position Thr¹⁷ von PLN bedingt ist. Diese Phosphorylierungsstelle an PLN wird zwar nachrangig gegenüber der Position Ser¹⁶, jedoch ebenfalls durch eine β-adrenerge Stimulation phosphoryliert [24]. In anderen monomeren Mauslinien konnte eine verstärkte Phosphorylierung von Thr¹⁷ bereits gezeigt werden [42]. Bei vollständiger Phosphorylierung der Position Ser¹⁶ und damit fehlender weiterer Regulation, könnte dies eine mögliche Kompensationsstrategie der Mauslinie tgmPLN sein. Ein Fehlen von PLN-Pentameren führt damit dazu, dass die Muskeln dieser Tiere sensibler auf eine β-adrenerge Stimulation z. B. mit Isoprenalin reagieren, insgesamt jedoch weniger Möglichkeit zur Regulation der SERCA2a-Aktivität aufweisen.

Insgesamt lässt sich durch die Kraftmessungen im Organbad von Papillarmuskeln transgener Mäuse schlussfolgern, dass monomere Mauslinien eine geringere basale Kraft generieren, welche jedoch auf eine β-adrenerge Stimulation nahezu linear ansteigt und unter maximaler Stimulation eine geringere Kraftentwicklung zeigt. Durch das Fehlen der PLN-Pentamere, in welchen PLN im WT und der Gruppe tgPLN zu großen Anteilen vorliegt, ist die Aktivitätsregulierung der SERCA2a in den monomeren Mutanten somit wahrscheinlich deutlich eingeschränkter als in den Kontrollgruppen. Dies unterstützt das aktuelle Verständnis von PLN, mit der Annahme, dass PLN-Monomere die aktive hemmende Komponente der SERCA2a-Aktivität sind und dass die Pentamere nicht nur eine Speicherfunktion, sondern durch eine höhere Affinität zur PKA eine regulatorische Funktion ausüben. Vorstellbar ist daher, dass sich das Myokard in Individuen mit einer AFA-Mutation schlechter an veränderte Druckund Volumenbelastungen anpassen könnte. Funk et al. (2023) konnten dies bereits in Versuchen mit Hilfe von *transverse aortic constriction* zeigen. Die Tiere der Gruppen tgmPLN und PLNKO zeigten ein signifikant schlechteres Überleben mit Dilatation des linken Ventrikels und verschlechterter Druckentwicklung im linken Ventrikel unter Dobutamin-Stimulation [16].

4.1.1 VORSPANNUNGSMESSUNGEN

Die monomeren Mauslinien zeigten unter Erhöhung der Vorspannung einen Anstieg der Kraftparameter (Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und Geschwindigkeit des Kraftabfalls). Bei Erhöhung der Vorspannung über 2 mN fielen die Kraftparameter jedoch wieder ab. Dieses Muster der Kraftentwicklung ähnelt dem Frank-Starling-Mechanismus. Dieser Mechanismus dient physiologischer Weise dazu, kurzfristige Veränderungen der Vorlast und/oder der Nachlast zu kompensieren, indem eine verbesserte Auswurfleistung erzeugt wird. Dies geschieht durch die Vordehnung der Myofibrillen, die beim Menschen bei 2 µm die effizienteste Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente einnehmen [4]. Dadurch kann der Muskel akut mehr Kraft generieren und sich den veränderten Druckbedingungen besser anpassen. Bei Überlastung dieses Mechanismus nimmt die erzeugte Kraft wieder ab. In Analogie dazu lag in den vorliegenden Versuchen die effizienteste Vorspannung zur Kraftgenerierung in murinen Papillarmuskeln der monomeren Mauslinien bei ca. 1 mN.

Für die pentamere Mauslinie tgPLN zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied unter Veränderung der Vorspannung, wobei der Trend den monomeren Tieren ähnelte. Darüber hinaus präsentierte sich der Kurvenverlauf bei allen Mauslinien sehr homogen. Dennoch fielen graphische Unterschiede in der absoluten Höhe der Kraftentwicklung zwischen den verschiedenen Mauslinien auf. Die pentameren Mauslinien tgPLN und WT lagen in allen drei Kraftparametern über der Mauslinie tgmPLN A. Hier greift möglicherweise die Wirkung von PLN als reversibler Inhibitor der SERCA2a [10]. PLN-Monomere hemmen die zytosolische Elimination von Kalzium und damit die Füllung des SR [19]. Die schlechtere Füllung des SR kann wiederum die geringere Kraftentwicklung in den monomeren Mutanten gegenüber den pentameren Mutanten erklären. In den monomeren Mutanten lag PLN in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der Vorspannungsmessungen maximal unphosphoryliert vor, da kein Isoprenalin in der Lösung vorhanden war. Somit wurde die SERCA2a maximal gehemmt. Der höhere relative Anteil an monomerem PLN in den AFA-mutierten Tieren könnte somit zu einer geringeren Kraftentwicklung in jenen Tieren gegenüber der pentameren Vergleichsgruppe führen. Die geringere Kraftentwicklung wirkt sich aber nicht auf die Form des Kurvenverlaufs, sondern auf die Höhe der grundsätzlichen Kraftentwicklung der Papillarmuskeln aus. Ähnlich beschreibt es die Gruppe um Slack et al. (2001) in Langendorff-Versuchen am ganzen Herzen in der entgegengesetzten Richtung. Diese konnten eine höhere Kraftentwicklung von PLN-defizienten Tieren gegenüber dem WT zeigen [45]. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit bereits veröffentlichten Daten. Funk et al. (2023) beschrieben unter Inhibierung der PKA eine äquivalente Hemmung der SERCA2a bei Tieren mit und ohne pentamerem PLN. Unter Ruhe Bedingungen war in monomeren Tieren die SERCA2a deutlich enthemmt [16]. Dies gilt ebenso in den Vorspannungsversuchen im Organbad, da ohne Zugabe von Isoprenalin die PKA gehemmt ist. Bei der Interpretation ist jedoch zu berücksichtigen, dass in der Vergleichsgruppe tgmPLN gegenüber dem WT kein Unterschied in der absoluten Höhe der Kraftentwicklung auffällt.

Insgesamt haben die Messungen an verschiedenen PLN-Mutanten gezeigt, dass weder die Anwesenheit noch die Funktion von PLN einen Einfluss auf die Veränderungen in der Kraftgenerierung bei steigender Vorspannung der Papillarmuskeln ausübt. Da PLN den myozytären Kalziumhaushalt ganz entscheidend reguliert, ist daher zu vermuten, dass Veränderungen der Vorspannung keinerlei Einfluss auf den intrazellulären Kalziumtransport nehmen und eine erhöhte Vorspannung des Muskels dessen Kraft vollständig Kalzium-unabhängig verändert.

4.2 EINFLUSS DER R9C-MUTATION AUF DIE KRAFTENTWICKLUNG

Schon vor einigen Jahren konnten Schmitt et al. (2003) eine Kausalität zwischen einer PLNR9C-Mutation im PLN-Gen und einer DCM nachweisen. Dabei wurde ein Defekt im Kalziumhaushalt beschrieben [26]. Inwiefern sich der bekannte Defekt im Kalziumhaushalt auf die Kraftgenerierung im Myokard in Abhängigkeit von β -adrenerger Stimulation und von der Vorspannung auswirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Die untersuchten Mutationen im PLN-Gen unterscheiden sich vom WT durch eine Punktmutation (R9C) oder/und durch die fehlende Ausbildung pentamerer Strukturen (mPLNR9C).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien. Auffallend war jedoch, dass in der Mauslinie PLNR9C die EC₅₀ der Geschwindigkeit des Kraftabfalls im Vergleich zum WT und den anderen Mauslinien tendenziell erhöht war. Demnach wird mehr Isoprenalin benötigt, um einen gleichwertigen Kraftabfall in der Mauslinie PLNR9C gegenüber dem WT zu generieren. Im Umkehrschluss benötigt ein Papillarmuskel der Linie R9C bei einer definierten Kraft länger, um die Relaxation der Muskulatur zur realisieren.

Auf biochemischer Ebene könnte die oben beschriebene Beobachtung mit dem bisherigen Wissensstand wie folgt erklärt werden: Die Genveränderung R9C führt dazu, dass die Phosphorylierung von koexprimiertem WT-PLN etwa um 30% abnimmt [46]. Diese Reduktion der Phosphorylierung der PLN-Monomere resultiert in einer verstärkten Hemmung der SERCA2a-Aktivität. Wie bereits beschrieben, ist bei verminderter SERCA2a-Aktivität die Kalziumelimination aus dem Zytosol verlangsamt. Der prolongierte Kalziumabfall aus dem Zytosol resultiert in einer verslagsamten Relaxation der Papillarmuskulatur, indem sich die Myosinköpfchen verspätet vom Aktinfilament lösen.

Eine Abhängigkeit der Muskelrelaxation vom Phosphorylierungszustand von PLN beschrieben Zhang et al. (2008) auch unabhängig von der R9C-Linie. NO-Synthase-defiziente Tiere wiesen durch eine geringere Phosphorylierung von PLN eine verschlechterte Relaxation auf. Durch Verhindern der Dephosphorylierung von PLN konnte wiederum die Relaxation normalisiert werden [47]. Im Rahmen von Untersuchungen zum Ventrikeldruck konnte gezeigt werden, dass in Mäusen der R9C-Linie der Ventrikeldruck langsamer abfiel als in der Vergleichsgruppe (WT) [46]. Auch dies deutet auf eine Relaxationsstörung hin, da durch Aufrechterhaltung der Muskelspannung der Druck im Ventrikel erhalten bleibt. Schmitt et al. (2003, 2009) untersuchten darüber hinaus an isolierten Kardiomyozyten die Relaxation von R9C-mutierten Zellen im Vergleich zum WT. Hier zeigte sich eine verminderte Relaxation ebenso wie eine verminderte Kalziumelimination aus dem Zytosol in R9C-mutierten Zellen, allerdings nur bei Koexpression von endogenem WT-PLN [26, 46]. Nach Kreuzung mit PLNKO-Tieren und alleiniger Expression der PLN-Mutante dagegen war der intrazelluläre Kalziumtransport und die Relaxation der Myozyten ähnlich schnell wie in reinen PLNKO-Tieren ohne R9C-Mutation. Da Tiere, die PLN allein mit der R9C-Mutation exprimierten ebenfalls eine DCM und terminale Herzinsuffizienz entwickelten, wenn auch deutlich später, vermittelt PLNR9C wahrscheinlich seine pathogene Wirkung nicht allein über die Störung der Phosphorylierung von WT-PLN.

Auf pathophysiologischer Ebene hätte dies folgende Bedeutung: Die verminderte Relaxation des Ventrikels mit heterozygoter PLNR9C-Mutation führt zu einer geringeren diastolischen Füllung. Diese geringere diastolische Füllung könnte wiederum auf lange Sicht zu einer Steigerung des venösen Druckes und Erhöhung der Vorlast führen. Der erhöhte Füllungsdruck erzeugt möglicherweise bei chronisch hohen Werten eine Dilatation der Ventrikelwand.

Weiterhin ist bekannt, dass PLNR9C in monomerer Form weitaus weniger pathologische Effekte ausübt als in pentamerer Form. In Analogie hierzu zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen dem WT und der Mauslinie mPLNR9C. Im Rahmen einer R9C-Mutation scheint damit für die Kraftentwicklung die Ausbildung von ausschließlich monomerem PLNR9C am besten zu sein.

4.3 NACHWEIS VON PHOSPHOLAMBAN IN PAPILLARMUSKULATUR UND VENTRIKELMUSKULATUR

Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression und die Phosphorylierung von PLN im Papillarmuskel nach der Präparation für die Organbadversuche untersucht. Dabei wurde überprüft, inwieweit Papillarmuskeln repräsentativ für die Herzmuskulatur als Muskelpräparat genutzt werden können. Hierfür wurden die Papillarmuskeln wie bei den elektrophysiologischen Messungen 20 min in Tyrode-Nährlösung äquilibriert und im Anschluss Lysate der Muskeln hergestellt. Anschließend wurde der PLN-Gehalt der Muskulatur untersucht.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sowohl die Papillarmuskulatur als auch die Ventrikelmuskulatur PLN in monomerer und in pentamerer Form. Hierbei war der Monomer/Pentamer-Quotient in Papillarmuskulatur zwar höher, aber die Bandenintensität der inhibitorischen PLN-Monomere war vergleichbar. Da die Aktivität von PLN von seinem Phosphorylierungsgrad abhängt, wurde die Phosphorylierung von PLN in isolierter Papillarmuskulatur mit jener in Ventrikelmuskulatur verglichen. Nach der Äquilibrierungszeit fand sich in der vorliegenden Arbeit keine messbare Phosphorylierung von PLN in Papillarmuskulatur, während sich in Ventrikelmuskulatur direkt nach der zervikalen Dislokation eine Phosphorylierung sowohl von monomerem als auch pentamerem PLN zeigte. Wittmann et al. beschrieben diese basale Phosphorylierung von PLN in Ventrikellysaten in analoger Weise [22]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die bisherige Annahme, dass die Phosphorylierung von PLN insbesondere durch sympathische Aktivität aufrechterhalten wird. Jedoch scheint es keinen Ausgangszustand von PLN zu geben, in welchem das Protein zu einem bestimmten Prozentsatz basal phosphoryliert ist. Vielmehr scheint die basal detektierte Phosphorylierung in Ventrikellysaten darin begründet, dass die Lysate direkt im Anschluss an die zervikale Dislokation, also das Ableben der Mäuse hergestellt wurden. Während der Äquilibrierungszeit ohne sympathische Stimulation hingegen wurde PLN in den Papillarmuskeln mutmaßlich durch Phosphatasen nahezu vollständig dephosphoryliert. Zur Erhaltung des *in-vivo*-Phosphorylierungszustandes wäre daher zu überlegen, in einem neuen Forschungsansatz Papillarmuskellysate direkt im Anschluss an die Präparation und unter Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren zu untersuchen.

Zu Beginn des Stimulationsversuches mit Isoprenalin lag in der vorliegenden Arbeit somit kein phosphoryliertes PLN vor. Vor dem Hintergrund, dass unphosphoryliertes PLN die Aktivität der SERCA2a maximal hemmt [48], ist zu Beginn der Organbadversuche von einer größtmöglichen Hemmung der SERCA2a-Aktivität auszugehen. Zur Beurteilung der Isoprenalin-Wirkung könnte dies auch als ein Vorteil betrachtet werden, weil so eine stärker ausgeprägte Steigerung der SERCA2a-Aktivität mit entsprechenden Folgen für die Kraftentwicklung ermöglicht wird als wenn unter Basalbedingungen durch Phosphorylierung die inhibitorische Wirkung der PLN-Monomere bereits vermindert ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die PLN-Expression in Papillarmuskulatur und Ventrikelmuskulatur vergleichbar ist. Im Gegensatz zu den Bedingungen *in vivo* liegt PLN in den hier durchgeführten Organbadversuchen basal nahezu vollständig unphosphoryliert vor.

4.4 EVALUATION DER VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND NORMALISIERUNG DER PAPILLARMUSKELN

Die generierte Kraft eines Muskels hängt von seiner Größe ab. Deshalb wurden in dieser Arbeit die ermittelten Parameter der Papillarmuskelkraft normalisiert auf 1. das Gewicht der Papillarmuskeln und 2. den Querschnitt der Papillarmuskeln.

Die Normalisierung über das Gewicht stellte sich als ungenau heraus, vermutlich weil der Feuchtigkeitsgehalt der Muskeln einen großen Einfluss auf das Gewicht nimmt und außerdem die Messgenauigkeit der zur Verfügung stehenden Feinwaage ($\pm 0,1 \mu g$) unzureichend war. Bei der Bestimmung des Muskelquerschnitts wurden zwei Verfahren einander gegenübergestellt. Das erste Verfahren (optische Messung) beruhte auf der Messung des Muskeldurchmessers unter einer Stereolupe. Das zweite Verfahren (histologische Messung) erfolgte über eine computergestützte und dadurch untersucherunabhängige Bestimmung und Mittelung der Querschnittsflächen

kryokonservierter Papillarmuskelschnitte. Bei der optischen Messung sind die Bestimmung des genauen Messpunktes, der Lage und Längsspannung des Muskels sowie das Ablesen der Messwerte untersucherabhängig. Außerdem trifft die Annahme einer perfekten Kreisform für die Berechnung des Muskelquerschnittes aus dem gemessenen Durchmesser nur näherungsweise zu. Grundlage der optischen Messung ist die Bestimmung bzw. Errechnung des Muskelquerschnittes ausschließlich am Übergang der Muskelfasern auf die Sehne. Diese Muskelstelle stellt den physiologisch relevanten Querschnitt des Muskels dar, da dort die minimale Fläche an Muskelfasern vor Beginn der Sehne vorzufinden ist. Unter der Annahme, dass jeder Muskel nur so stark ist wie seine schwächste Stelle, ist dies der relevante Querschnitt für die Normalisierung. In der histologischen Messung wurde jedoch der Querschnitt aller histologischen Schnitte eines Papillarmuskels gemittelt, sodass dieser physiologische Grundsatz dort vernachlässigt wurde.

Im direkten Vergleich der beiden Verfahren lag die Größe der optisch ermittelten Fläche stets signifikant unterhalb der histologisch ermittelten. Innerhalb eines Verfahrens zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Darüber hinaus zeigte die optische Normalisierung einen größeren Standardfehler. Dieser größere Standardfehler belegt die oben genannte Hypothese, dass der Einfluss des Untersuchers sowie die Berechnung über eine Kreisformel zu einer unpräzisen Normalisierung führen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die histologische Normalisierung zur absoluten sowie zur relativen Bestimmung des Papillarmuskelquerschnitts der optischen Normalisierung überlegen scheint. Demnach sollte jene, wann immer möglich, gegenüber der optischen Normalisierung bevorzugt werden. Dennoch stellt die histologische Normalisierung einen erheblichen zeitlichen wie auch materiellen und finanziellen Mehraufwand dar, sodass für jede Studie die Entscheidung individuell hinsichtlich der Kosten und Nutzen abgewogen werden sollte.

Weiterhin hat die Normalisierung gezeigt, dass die verschiedenen Mauslinien innerhalb einer Methode keine signifikanten Unterschiede im Muskelquerschnitt zeigen. Demnach nehmen die Mutationen im murinen PLN-Gen keinen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung der Papillarmuskulatur, sondern lediglich auf die Funktion.

4.5 STIMULIERBARKEIT DER PAPILLARMUSKELN IM ORGANBAD

Zur Evaluation des Einflusses der Mutationen in den verschiedenen Mauslinien auf die Stimulierbarkeit der Papillarmuskeln wurde am Ende der Versuche eine Kategorisierung der Papillarmuskeln in "Stimulierbar", "Nicht Stimulierbar" und "Flimmern" vorgenommen. Es wurde die Hypothese verfolgt, dass die DCM-verursachende PLNR9C-Mutation beziehungsweise das Fehlen von PLN-Pentameren in den AFA-Mutanten die Erregbarkeit des Myokards beeinflussen. So wurden in betroffenen Menschen mit unterschiedlichen PLN-Mutationen (R14del, R25C) ventrikuläre Arrhythmien beobachtet [49].

In der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse fiel eine deutlich unterschiedliche Verteilung in der Mauslinie PLNKO im Vergleich zu den übrigen Mauslinien auf, in dieser Mauslinie ganz ohne PLN waren 90 % der Mäuse "Nicht Stimulierbar". Die Ergebnisse werfen die Frage auf, ob PLN möglicherweise nicht nur ein Inhibitor der SERCA2a ist, sondern auch ein integrales Protein des SR für die Membranstabilität insbesondere unter oxidativem Stress sein kann. Membraninstabilität bezeichnet eine vermehrte Permeabilität der Zellmembran und stellt damit einen Indikator für einen Membranschaden dar. Umso instabiler die Zellmembran ist, umso mehr Kalzium strömt aus dem SR in die Zelle unkontrolliert zurück. Eine mögliche Erklärung dieses Zusammenhanges beschrieben Law et al. (2018) in einer Untersuchung zur Muskeldystrophie. Diese beschrieben in Dystrophin-defizienten Mäusen in Kombination mit einem PLNKO einen Einfluss der Mutationen auf die Stabilität der Membran des SR. In Dystrophin-defizienten Tieren trat eine Membraninstabilität nur unter Stimulation mit Isoprenalin auf, eine Kombination beider Knockouts führte hingegen bereits in Ruhe zu einer Membraninstabilität [50]. Valverde et al. konnten zudem eine Instabilität der SR-Membran bei PLN-Defizienz nach Herzinfarkten zeigen [51]. Somit könnte die PLN-Defizienz in den untersuchten Mäusen zu einer verminderten Membranstabilität und die unvermeidbare Hypoxie während der Präparation zu einem Untergang an Muskelzellen führen. Dies stände im Einklang mit Ergebnissen aus Operationen am offenen Herzen, wo eine Reperfusion nach Kardioplegie zu einer Schädigung von Myozyten führte [52]. Hier führte bereits in gesunden Zellen eine Kardioplegie zu einer Myozytenschädigung. Bei zusätzlicher Membraninstabilität zum Beispiel im Rahmen einer PLN-Defizienz könnte daher eine myozytäre Schädigung noch viel eher eintreten und zu einer fehlenden Stimulierbarkeit im Organbad beitragen.

Zusätzlich zeigten die vorliegenden Ergebnisse einen deutlichen Unterschied zwischen den Mauslinien PLNR9C und mPLNR9C hinsichtlich der Stimulierbarkeit. Die monomere Mutante wies im Vergleich zu der pentameren Mutante weniger Muskeln der Gruppe "Flimmern" auf. Die Hyperinhibition der SERCA2a in pentameren PLNR9C-Mäusen, wie sie bereits von Schmitt et al. beschrieben wurde [26, 46], könnte die zytosolische Kalziumkonzentration erhöhen und zu einer unkontrollierten Erregung führen. Diese Theorie ist auch für die anderen Mauslinien (tgmPLN, tgmPLN A) kongruent. Bereits unter geringer Isoprenalin-Stimulation ist die SERCA2a ist, desto weniger scheinen die Muskeln zu flimmern. Auch in der Literatur ist bereits ein erhöhtes Risiko für zusätzliche Depolarisationen bei erhöhtem intrazellulärem Kalzium beschrieben [38, 53]. Dies steht im Einklang mit der einschlägigen Therapie von Herzrhythmusstörungen. Kalziumkanalblocker inhibieren den Einstrom von Kalzium in die Herzmuskelzelle und reduzieren somit den intrazellulären Kalziumgehalt [6]. Statt jedoch den Kalziumeinstrom in die Zelle zu verhindern, induziert die SERCA2a in aktivierter Form eine bessere Füllung des SR und reduziert somit das zytosolische Kalzium. Jüngere Studien beschreiben ein

sogenanntes DWORF-Protein, das mit PLN um die Bindungsstelle der SERCA2a konkurriert, jedoch nicht hemmend auf das Enzym wirkt. Damit wird die Aktivität der SERCA2a gesteigert und das zytosolische Kalzium reduziert [32]. Möglicherweise bietet dies die Chance auf eine neue antiarrhythmische Medikation.

4.6 LIMITATIONEN DER ARBEIT

Das Organbad ist eine vielversprechende Methodik zur Untersuchung kardialer Muskulatur. Es bietet die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen durch eine fest definierte Stimulationsfrequenz, Vorlast und Zusammensetzung der Nährlösung Untersuchungen durchzuführen. Zusätzlich nehmen hämodynamische (z. B. Druck, Volumen etc.) oder metabolische Effekte (z.B. pH-Wert, Elektrolyte, Zucker) keinen Einfluss. In Papillarmuskeln lassen sich weiterhin physiologische Parameter wie die Vorspannung gezielt isoliert untersuchen, da ein Einfluss der übrigen Herzarchitektur und -funktion verhindert wird. Das Organbad ist sehr gut geeignet, um die direkte Einflussnahme spezifischer Medikamente oder der Schlagfrequenz auf elektrophysiologische Parameter in Herzmuskulatur ohne Einfluss externer Faktoren zu untersuchen. Insbesondere ist das Organbad auch geeignet, neben genetischen auch metabolische Veränderungen im Myokard hinsichtlich ihres Einflusses auf Kraftcharakteristika zu analysieren. Dies wurde bereits in Untersuchungen der eigenen AG an einem diabetischen Mausmodell gezeigt [38].

Dennoch gibt es einige ambivalente Punkte, auf die im Folgenden besonders eingegangen wird: Alle Versuche wurden im Organbad unter einer festgelegten Stimulationsfrequenz durchgeführt, da kein intrinsischer Stimulus vom Papillarmuskel allein mehr ausgeht. Die Stimulation mit 1 Hz wird auch in anderen Versuchen im Organbad gewählt, muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die natürliche Frequenz eines Mäuseherzens zwischen etwa 450 und 600 Schlägen/min liegt. Mit dieser artifiziell um das zehnfache verlangsamten Herzfrequenz sind kleinere kinetische Unterschiede in der Kalziumrezirkulation gegebenenfalls nicht mehr detektierbar, da die Zeit bis zum nächsten Schlag sehr groß ist. Die Muskulatur könnte so genug Zeit haben, eventuelle Unterschiede noch ausreichend auszugleichen, sodass sie in der Kraftgenerierung nicht mehr messbar wären.

Darüber hinaus muss der bereits diskutierte Vorteil des Organbads, Papillarmuskeln isoliert vom Organismus betrachten zu können, auch im Hinblick auf die Nachteile beleuchtet werden. Im humanen wie auch im murinen Organismus gibt es im Rahmen der Kraftentwicklung zahlreiche Parameter, welche gleichzeitig Einfluss auf die Kraftentwicklung nehmen. Hierzu gehört unter anderem eine Veränderung der Vorspannung und der enddiastolischen Füllung. Durch eine Konstanz dieser Parameter während der Isoprenalin-Versuche werden gegebenenfalls vorliegende Schwächen der Muskulatur kaschiert, da es nicht wie im Kreislauf zu veränderten Auswurfvolumina und/oder Füllungsvolumina kommt. Auch gibt es zahlreiche Effektoren wie beispielweise Hormone, welche *in vivo* Einfluss auf die

Herzfunktion nehmen [54]. Dies zeigt sich z. B. an der basalen Phosphorylierungsrate von PLN, welche *in vivo* besteht, im Organbad jedoch nicht. Durch die Untersuchung der Papillarmuskeln in einem artifiziell veränderbaren Modell ist die isolierte Betrachtung der β-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin auf die Papillarmuskeln ohne Störfaktoren interpretierbar. Somit ist das Modell für das reine Verständnis der Wirkung von Isoprenalin an Papillarmuskeln sehr hilfreich. Durch die Standardisierung von Herzfrequenz und Vorlast ist eine Übertragung auf den Organismus *in vivo* jedoch nur begrenzt möglich und zulässig. Zudem ist die Übertragbarkeit isolierter Papillarmuskeln auf das gesamte Herz, im welchem die Kardiomyozyten in einer funktionell spiralförmig angeordneten Formation sehr gut aufeinander abgestimmt sind, nur begrenzt möglich.

Ein weiterer Aspekt ist das Alter der Tiere. Die vorliegenden Ergebnisse wurden an Tieren erhoben, welche mit 8-12 Wochen noch recht jung waren. Somit wiesen sie auf der einen Seite noch keine durch die Ausbildung eines kardialen Phänotyps bedingten Effekte im Sinne einer verminderten kardialen Leistung auf, insbesondere im Kontext der PLNR9C-Mutation. Dies wurde bewusst so gewählt, um initiale Veränderungen an noch intakten Muskeln zu untersuchen und die Pathophysiologie der muskulären Schädigung auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. Auf der anderen Seite führt die Altersauswahl möglicherweise dazu, dass die Differenzen der Muskeln nur in einer größeren Stichprobengröße statistisch signifikante Unterschiede zeigen würden. Zusätzlich könnte eine Erhöhung der Stichprobengröße den Stardardfehler innerhalb der einzelnen Mauslinien reduzieren. Der Standardfehler war bei einer Gruppengröße von zehn Tieren auffallend groß. Ergänzend könnte eine durchgehende Sauerstoffzufuhr zur Präparierlösung mögliche Sauerstoffschwankungen reduzieren.

Zuletzt sollte bedacht werden, dass die vorliegenden Ergebnisse an murinen Organismen erhoben wurden. Eine Vergleichbarkeit mit dem humanen Organismus ist somit primär nicht zulässig. Nichtsdestotrotz ist unter anderem die PLNR9C-Mutation bereits am humanen Organismus untersucht worden. Um hier Einflüsse im Rahmen der Kraftentwicklung beim Menschen zu postulieren, sind jedoch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen nötig.

4.7 Schlussfolgerungen

Anhand der Versuche zur myokardialen Kraftentwicklung konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozten ohne pentameres PLN sensibler auf eine β-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin reagieren. Durch das Fehlen der Pentamere ist zusätzlich die Regulationsfähigkeit der SERCA2a eingeschränkt, sodass die Veränderung der Kraftentwicklung geringer ausfällt.

Tiere mit der Punktmutation PLNR9C, welche zu einer DCM führt, haben einen Trend hinsichtlich einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven besonders bei der Geschwindigkeit des Kraftabfalls, also der Geschwindigkeit der Relaxation der Muskulatur. Dieser Trend ist in den AFA-mutierten Tieren ohne die Fähigkeit, Pentamere zu bilden, vollständig aufgehoben.

Die Vorspannung wurde als Äquivalent für eine Veränderung der Vorlast am Herzen eingesetzt. In den vorliegenden Ergebnissen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien unter Veränderung der Vorspannung. Dies bestätigt die Hypothese, dass PLN keinen Einfluss auf die Funktionsweise, respektive die Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente, nimmt.

Zuletzt lässt die vorliegende Arbeit eine Schlussfolgerung zur Methodik des Organbads zu. Neben dem Vorteil isolierte Einflüsse auf die Muskulatur gezielt zu analysieren sind weitere Untersuchungen an intakten Herzen nötig, um mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der Herzarchitektur wie Größe, Form, zelluläre und extrazelluläre Zusammensetzung zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist im Rahmen der Organbadpräparation die Normalisierung über den histologischen Muskelquerschnitt als genaueste Variante hervorzuheben. In Hinblick auf das Verhältnis zwischen Aufwand und Nutzen sollte jedoch stets eine genaue Evaluation des Normalisierungsverfahrens erfolgen.

4.8 AUSBLICK

Die vorliegenden Ergebnisse werfen neben wichtigen Erkenntnissen einige Fragen für zukünftige Forschung auf: Zum einen könnte der Einfluss verschiedener Promotoren auf die Expression von PLN untersucht werden, um die Unterschiede in der Kraftentwicklung zwischen der Mauslinie tgPLN und dem WT besser zu verstehen.

Interessant wäre zum anderen ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit Messungen an Papillarmuskeln von PLNR9C-Mäusen mit manifester DCM. Besonders interessant ist hierbei zu untersuchen, inwieweit die DCM durch einen Schaden bzw. Umbau der extrazelluären Matrix oder einen kardiomozytären Schaden bedingt ist.

Zuletzt ist ein interessanter Forschungspunkt die Variation der Stimulationsfrequenz, da unter der Annahme, dass durch Veränderungen der PLN-Funktion besonders die Relaxation betroffen ist, der Effekt unter steigender Frequenz verstärkt werden könnte.

5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- 1. Pinto, A.R., et al., Revisiting Cardiac Cellular Composition. Circ Res, 2016. 118(3): p. 400-9.
- 2. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
- 3. Art, S.M. Servier Medical Art. Licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported license. 2022/10/09]; Available from: https://smart.servier.com.
- 4. Kraft, T. and B. Brenner, *Muskulatur*, in *Physiologie*, A. Kurtz, H.-C. Pape, and S. Silbernagel, Editors. 2014, Georg Thierme Verlag KG: Stuttgart. p. 132-169.
- 5. Li, W. and G. Shi, *How Ca(V)1.2-bound verapamil blocks Ca(2+) influx into cardiomyocyte: Atomic level views.* Pharmacol Res, 2019. **139**: p. 153-157.
- 6. Offermanns, S., *Digitalisglykoside*, in *Pharmakologie und Toxikologie*, M. Freissmuth, S. Offermanns, and S. Böhm, Editors. 2016, Springer-Verlag Berlin: Heidelberg. p. 366-371.
- 7. Papa, A., J. Kushner, and S.O. Marx, *Adrenergic Regulation of Calcium Channels in the Heart*. Annu Rev Physiol, 2022. **84**: p. 285-306.
- Frank, K. and E.G. Kranias, *Phospholamban and cardiac contractility*. Ann Med, 2000. 32(8): p. 572-8.
- 9. Kuhlbrandt, W., *Biology, structure and mechanism of P-type ATPases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 282-95.
- 10. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
- Sitsel, A., et al., *Structures of the heart specific SERCA2a Ca(2+)-ATPase*. EMBO J, 2019. 38(5).
- 12. Samuel, T.J., et al., *Correcting Calcium Dysregulation in Chronic Heart Failure Using SERCA2a Gene Therapy*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
- Zhihao, L., et al., SERCA2a: a key protein in the Ca(2+) cycle of the heart failure. Heart Fail Rev, 2020. 25(3): p. 523-535.
- 14. Kimura, Y., et al., *Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15061-4.
- 15. Reddy, L.G., L.R. Jones, and D.D. Thomas, *Depolymerization of phospholamban in the presence of calcium pump: a fluorescence energy transfer study*. Biochemistry, 1999. **38**(13): p. 3954-62.
- 16. Funk, F., et al., *Phospholamban pentamerization increases sensitivity and dynamic range of cardiac relaxation.* Cardiovasc Res, 2023.
- 17. Vittone, L., et al., *Immunodetection of phosphorylation sites of phospholamban in aortic smooth muscle. Effects of sodium nitroprusside.* Ann N Y Acad Sci, 1998. **853**: p. 292-5.
- 18. Funk, F., Mechanismen der Phospholamban-vermittelten Regulation von SERCA2a. 2018.

- 19. Chen, Z., B.L. Akin, and L.R. Jones, *Mechanism of reversal of phospholamban inhibition of the cardiac Ca2+-ATPase by protein kinase A and by anti-phospholamban monoclonal antibody 2D12*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20968-76.
- 20. Karim, C.B., et al., *Phosphorylation-dependent conformational switch in spin-labeled phospholamban bound to SERCA*. J Mol Biol, 2006. **358**(4): p. 1032-40.
- 21. Cornea, R.L., et al., *Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers*. Biochemistry, 1997. **36**(10): p. 2960-7.
- 22. Wittmann, T., M.J. Lohse, and J.P. Schmitt, *Phospholamban pentamers attenuate PKAdependent phosphorylation of monomers*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **80**: p. 90-7.
- 23. Ahlquist, R.P., Isoproterenol in cardiology. Am Heart J, 1973. 86(2): p. 149-51.
- 24. Mattiazzi, A., et al., *Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(3): p. 366-75.
- 25. Xiao, R.P., et al., *Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca2+ dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation.* J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 19151-6.
- 26. Schmitt, J.P., et al., *Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1410-3.
- Fish, M., et al., Mutation analysis of the phospholamban gene in 315 South Africans with dilated, hypertrophic, peripartum and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies. Sci Rep, 2016. 6: p. 22235.
- 28. Japp, A.G., et al., *The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(25): p. 2996-3010.
- 29. Seferovic, P.M., et al., *Heart failure in cardiomyopathies: a position paper from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.* Eur J Heart Fail, 2019. **21**(5): p. 553-576.
- 30. Fish, M., et al., *Corrigendum: Mutation analysis of the phospholamban gene in 315 South Africans with dilated, hypertrophic, peripartum and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 25863.
- 31. Burke, M.A., et al., *Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(25): p. 2871-2886.
- 32. Hamstra, S.I., et al., *The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2020. **319**(4): p. C694-C699.
- 33. Qin, J., et al., *Structures of PKA-phospholamban complexes reveal a mechanism of familial dilated cardiomyopathy.* Elife, 2022. **11**.
- 34. Abu-Baker, S. and G.A. Lorigan, *Phospholamban and its phosphorylated form interact differently with lipid bilayers: a 31P, 2H, and 13C solid-state NMR spectroscopic study.* Biochemistry, 2006. **45**(44): p. 13312-22.
- Upchurch, W.J. and P.A. Iaizzo, *In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart((R)) Laboratories*. Exp Biol Med (Maywood), 2022.
 247(7): p. 584-597.

- 36. Uhl, S., M. Freichel, and I. Mathar, *Contractility Measurements on Isolated Papillary Muscles* for the Investigation of Cardiac Inotropy in Mice. J Vis Exp, 2015(103).
- Whittington, H.J., et al., Protective Effect of Creatine Elevation against Ischaemia Reperfusion Injury Is Retained in the Presence of Co-Morbidities and during Cardioplegia. PLoS One, 2016. 11(1): p. e0146429.
- 38. Funk, F., et al., *Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2022. **173**: p. 47-60.
- 39. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
- 40. Kronenbitter, A., et al., *Impaired Ca(2+) cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2018. 119: p. 28-39.
- 41. Akin, B.L., et al., *The structural basis for phospholamban inhibition of the calcium pump in sarcoplasmic reticulum.* J Biol Chem, 2013. **288**(42): p. 30181-30191.
- 42. Zvaritch, E., et al., *The transgenic expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14985-91.
- 43. Kho, C., A. Lee, and R.J. Hajjar, *Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling--targets for heart failure therapy*. Nat Rev Cardiol, 2012. **9**(12): p. 717-33.
- 44. Greenberg, B., et al., *Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial.* Lancet, 2016. **387**(10024): p. 1178-86.
- 45. Slack, J.P., et al., *The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging.* J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 1031-40.
- 46. Schmitt, J.P., et al., *Alterations of phospholamban function can exhibit cardiotoxic effects independent of excessive sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase inhibition*. Circulation, 2009. **119**(3): p. 436-44.
- 47. Zhang, Y.H., et al., *Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice.* Circ Res, 2008. **102**(2): p. 242-9.
- 48. Simmerman, H.K. and L.R. Jones, *Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function.* Physiol Rev, 1998. **78**(4): p. 921-47.
- 49. Vafiadaki, E., et al., *Aberrant PLN-R14del Protein Interactions Intensify SERCA2a Inhibition, Driving Impaired Ca(2+) Handling and Arrhythmogenesis.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(13).
- 50. Law, M.L., et al., *Exacerbation of dystrophic cardiomyopathy by phospholamban deficiency mediated chronically increased cardiac Ca(2+) cycling in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **315**(6): p. H1544-H1552.
- 51. Valverde, C.A., et al., *Ablation of phospholamban rescues reperfusion arrhythmias but exacerbates myocardium infarction in hearts with Ca2+/calmodulin kinase II constitutive phosphorylation of ryanodine receptors.* Cardiovasc Res, 2019. **115**(3): p. 556-569.

- 52. Suleiman, M.S., et al., *Cardioprotection during Adult and Pediatric Open Heart Surgery*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 712721.
- 53. Santini, L., R. Coppini, and E. Cerbai, *Ion Channel Impairment and Myofilament Ca*(2+) *Sensitization: Two Parallel Mechanisms Underlying Arrhythmogenesis in Hypertrophic Cardiomyopathy.* Cells, 2021. **10**(10).
- 54. Paschke, R., *Endokrines System*, in *Physiologie*, A. Kurtz, H.-C. Pape, and S. Silbernagel, Editors. 2014, Georg Thierme Verlag KG: Stuttgart. p. 585-634.

6 DANKSAGUNG

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Joachim Schmitt. Meine Anfrage nach einer Doktorarbeit hat er von Beginn an unterstützt und ich danke ihm herzlich für das Überlassen des Themas meiner Dissertation. Er hat mir stets hilfreich zur Seite gestanden, unabhängig von der Uhrzeit oder dem Wochentag. Sowohl die experimentellen als auch die inhaltlichen Fragen wurden geduldig und wissenschaftlich fundiert diskutiert. Sein unentwegtes Vertrauen in das Gelingen der Promotion sowie die vielen Gespräche waren eine große Unterstützung.

Frau Professor Dr. rer. nat. Martina Krüger danke ich sehr für die Mitbetreuung der Promotion. Sie hatte immer Zeit für mich, offene Fragen zu beantworten.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Florian Funk und Frau Susanne Hölzer für die Hilfe im Labor. Wenn ich nicht weitergekommen bin, haben sie mich immer unterstützt.

Ein großer Dank geht an meine Eltern. Sie haben mir ermöglicht, mich ohne Ablenkungen auf die Dissertation zu konzentrieren und mich unentwegt unterstützt. Wenn ich an einzelnen Stellen verzweifelt bin und nicht mehr weitergewusst habe, haben sie mich immer wieder motiviert, nicht aufzugeben, sei es mit Gesprächen oder spontanen Besuchen.

Besonders danke ich meiner Frau Viviana, die mir zu jeder Uhrzeit mit Rat zur Seite gestanden und mich unterstützt hat. Ich konnte immer darauf zählen, dass sie sich Zeit nimmt und auf das Abschließen der Dissertation vertraut.