

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

**Mutationen im kardialen Calsequestrin-Gen (*CASQ2*) als Ursache der
catecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lücking, Kerstin
geb. Ondrazek
aus Moers

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Kirchhefer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med J. Sindermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Kirchhefer
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Sindermann

Zusammenfassung

Mutationen im kardialen Calsequestrin-Gen (*CASQ2*) als Ursache der
catecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT)

Kerstin Lücking

Die CPVT bezeichnet eine hereditäre Erkrankung, die durch stressinduzierte Synkopen, ventrikuläre Extrasystolen und polymorphe ventrikuläre Tachykardien charakterisiert ist. Kennzeichnend für diese potentiell lebensbedrohliche Erkrankung sind u.a. Störungen im Rahmen der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase, deren Folgen eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung und daraus resultierende späte Nachdepolarisationen sind. Diese Dissertation beschäftigte sich mit der neu identifizierten Mutation I161V im humanen *CASQ2*-Gen, die in einer klinisch symptomatischen Familie als Ursache von CPVT in Verbindung gebracht wird. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass I161V die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu beeinflussen scheint, indem die Mutation zu einer erhöhten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit des veränderten *CASQ2* gegenüber Wildtyp-*CASQ2* führt. Die vorliegende Arbeit sollte den strukturellen und/oder funktionellen Ursachen der veränderten Speicherfähigkeit nachgehen. Ferner sollten die Folgen der erhöhten Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit auf die Ca^{2+} -Freisetzung des SR untersucht werden. Eine gestörte Polymerisation des mutierten *CASQ2* gegenüber Wildtyp-*CASQ2* scheint dabei keine Rolle zu spielen. Die Rolle einer veränderten Interaktion zum TRD in der Ca^{2+} -Freisetzung wurde in ersten Bindungsversuchen mit rekombinanten Proteinen nach Expression in Sf21-Zellen untersucht. Die bisher vorliegenden Ergebnisse deuten nicht auf ein gestörtes Bindungsverhalten zum TRD von mutiertem *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form hin. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Generierung eines die I161V-Mutation tragenden Adenovirus die Voraussetzung für weiterreichende Funktionsuntersuchungen in neonatalen Maus-Kardiomyozyten geschaffen. Die Expression des mutierten *CASQ2* konnte bereits demonstriert werden. Die aus dem Zellmodell gewonnenen Erkenntnisse könnten für weiterführende Untersuchungen an einem die Mutation tragenden „knock-in-Tiermodell“ genutzt werden. Ziel ist, geeignete *in vivo*-Modelle der Erkrankung zu schaffen, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche kausale Behandlungsstrategie der CPVT.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2011

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Mutationen im kardialen Calsequestrin-Gen (*CASQ2*) als Ursache der
katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT)

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der WWU Münster

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Uwe Kirchhefer

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Moers, 01.03.2011
Ort, Datum

Kerstin Lücking
Unterschrift

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AC | Adenylylcyclase |
| Ad5 | Adenovirus vom Serotyp 5 |
| AP | Aktionspotential |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| bpm | beats per minute (Herzschläge pro Minute) |
| BSA | Albumin aus Rinderserum |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| <i>CASQ2</i> | Calsequestrin (Gen) |
| CHAPS | 3-3-Cholamidopropyl-Dimethylammonio-Propansulfonsäure |
| cDNS | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CIP | Calf intestinal alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm) |
| CSQ | Calsequestrin (Protein) |
| CPVT | Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FKBP12.5 | FK 506-bindendes Protein |
| x g | Erdbeschleunigung |
| Gew. | Gewicht |

| | |
|-----------------|--|
| GST | Gluthation-S-Transferase |
| HEK 293 | human embryonic kidney cells (Humane embryonale Nierenzellen) |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure |
| IP3 | Inositol-1,4,5,-trisphosphat |
| IU | infektiöse Einheiten |
| JCN | Junctin |
| kDa | Kilo-Dalton |
| MF | Myofilamente |
| M_r | Molmassenstandard |
| MOI | Multiplizität der Infektion |
| MOPS | 3-(N-morpholino)propansulfonsäure |
| N | Normalität (Grammäquivalente pro Liter) |
| n | Stichprobenumfang/Anzahl der Versuche |
| NaAc | Natriumacetat |
| NaCl_2 | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NBT | Nitroblau Tetrazolium |
| NCX | Sarkolemmaler $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Kationenaustauscher |
| OD | optische Dichte |
| P | Phosphatgruppe |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | $-\log [\text{H}^+]$ |
| PKA | cAMP-abhängige Proteinkinase A |
| PLB | Phospholamban |
| ppm | parts per million (Teile von einer Million) |
| Primer | Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |

| | |
|----------|---|
| RT | Raumtemperatur |
| RyR | Ryanodin-Rezeptor; synonym: Ca ²⁺ -Freisetzungskanal |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SERCA | Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums |
| SL | Sarkolemma |
| SR | sarkoplasmatisches Retikulum |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA |
| TBS | TRIS-gepufferte Salzlösung |
| TE | TRIS-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin |
| Tn | Troponinkomplex |
| TnC | Calcium-bindendes Troponin |
| TnI | Troponin I (Troponin-Inhibitor) |
| TRD | Triadin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| Vol. | Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 6 |
| 1.1. | Klinisches Erscheinungsbild einer potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung | 6 |
| 1.2. | Genetik der CPVT | 9 |
| 1.3. | Autosomal-dominante Form der CPVT | 9 |
| 1.4. | Autosomal-rezessive Form der CPVT | 10 |
| 1.5. | Das humane <i>CASQ2</i> -Gen | 12 |
| 1.6. | Calsequestrin (CSQ) und seine Aufgaben im Rahmen der zellulären Ca ²⁺ -Homöostase | 16 |
| 1.7. | <i>CASQ2</i> -Genmutationen und CPVT | 17 |
| 1.8. | Die I161V-Mutation im <i>CASQ2</i> -Gen: Eine neue Punktmutation | 18 |
| 2. | Fragestellung | 19 |
| 3. | Material und Methoden | 20 |
| 3.1. | Arbeiten mit Zelllinien | 20 |
| 3.1.1. | Insektenzellen | 20 |
| 3.1.1.1. | Auftauen, Anzucht und Kultivierung | 20 |
| 3.1.1.2. | Teilen und Passagieren eines Zellrasens | 20 |
| 3.1.1.3. | Kultivierung in Suspensionskultur | 21 |
| 3.1.1.4. | Teilen und Passagieren einer Suspensionskultur | 21 |
| 3.1.1.5. | Kotransfektion | 22 |
| 3.1.1.6. | Infektion von Sf21-Insektenzellen | 24 |
| 3.1.1.7. | Ernte der infizierten Insektenzellen | 25 |
| 3.1.2. | HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) | 25 |
| 3.1.2.1. | Auftauen und Anzucht | 25 |
| 3.1.2.2. | Kultivierung als Zellrasen | 26 |
| 3.1.2.3. | Teilen und Passagieren eines Zellrasens | 26 |
| 3.1.2.4. | Einfrieren | 26 |
| 3.1.2.5. | Transfektion | 27 |
| 3.1.2.6. | Infektion | 27 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2. | Arbeiten mit DNS | 28 |
| 3.2.1. | Herstellung kompetenter Bakterien | 28 |
| 3.2.2. | Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNS in kompetente Bakterienzellen | 28 |
| 3.2.3. | Herstellung von bakteriellen Glycerol-Stocks | 29 |
| 3.2.4. | Plasmid-DNS-Präparation | 29 |
| 3.2.4.1. | Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation) | 30 |
| 3.2.4.2. | Präparative Plasmidisolierung (Maxipräparation) | 30 |
| 3.2.5. | Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS | 31 |
| 3.2.6. | Analytischer Restriktionsverdau | 31 |
| 3.2.7. | Präparativer Restriktionsverdau | 32 |
| 3.2.8. | Klonierung von DNS | 32 |
| 3.2.8.1. | Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden | 34 |
| 3.2.8.2. | Ligation | 34 |
| 3.2.8.3. | Agarose-Gelelektrophorese | 34 |
| 3.2.8.4. | Isolierung von DNS aus Agarosegelen | 35 |
| 3.2.8.5. | Kontrolle von Plasmidkonstrukten mittels Sequenzierung | 35 |
| 3.2.9. | Durchführung einer gerichteten Mutagenese | 36 |
| 3.2.9.1. | Klonierung von <i>CASQ2</i> in den pAlter-Vektor | 38 |
| 3.2.9.2. | Einzelstranggewinnung der doppelsträngigen pAlter- <i>CASQ2</i> -WT-cDNS | 38 |
| 3.2.9.3. | Konstruktion des mutagenen Oligonukleotids | 39 |
| 3.2.9.4. | Mutagenese-Reaktion | 39 |
| 3.2.9.5. | Strangsynthese und Ligation | 40 |
| 3.2.9.6. | Transformation in ES1301- <i>E. coli</i> | 40 |
| 3.2.9.7. | Präparation der Plasmid-DNS aus ES1301 mutS-Zellen | 40 |
| 3.2.9.8. | Transformation in kompetente <i>E. coli</i> JM109 | 40 |
| 3.2.9.9. | Nachweis positiver Klone mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung | 40 |
| 3.3. | Das adenovirale Expressionssystem (AdEasy-System) | 41 |
| 3.3.1. | Klonierungsstrategie | 44 |
| 3.3.1.1. | Gewinnung des <i>CASQ2</i> -I161V-Fragments | 45 |
| 3.3.1.2. | Umklonierung von <i>CASQ2</i> -I161V in pBluescript II KS | 45 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.3.1.3. | Umklonierung von <i>CASQ2</i> -I161V und <i>CASQ2</i> -WT aus pBluescript II KS in pAdTrack-CMV | 45 |
| 3.3.2. | Homologe Rekombination in kompetenten <i>E. coli</i> BJ5183-Zellen | 45 |
| 3.3.2.1. | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> BJ5183-Zellen | 46 |
| 3.3.2.2. | Maxipräparation von BJ5183-Klonen, pAdEasy-DNS und pAdTrack-DNS | 46 |
| 3.3.2.3. | Linearisierung der pAdTrack-DNS mit PmeI | 46 |
| 3.3.2.4. | Phenolextraktion | 46 |
| 3.3.2.5. | Hitzeschocktransformation | 47 |
| 3.3.2.6. | Selektion eines rekombinanten Klons | 47 |
| 3.3.2.7. | Sequenzierung von pAdEasy- <i>CASQ2</i> -WT/ pAdEasy- <i>CASQ2</i> -I161V | 48 |
| 3.3.3. | Generierung des Virus in HEK293-Zellen | 48 |
| 3.3.3.1. | Linearisierung der rekombinanten pAdEasy-DNS | 48 |
| 3.3.3.2. | NaAc/Ethanol-Präzipitation | 48 |
| 3.3.3.3. | Transfektion | 48 |
| 3.3.3.4. | Ernte der Zellen | 49 |
| 3.3.3.5. | Erste Infektion | 49 |
| 3.3.3.6. | Amplifikation des Virus und Titerbestimmung | 50 |
| 3.3.3.7. | Vorbereitung und Infektion der Zellen zur Titerbestimmung | 50 |
| 3.3.3.8. | Auswertung der Titerbestimmung | 50 |
| 3.3.3.9. | Adenovirale Infektion von neonatalen Maus- Kardiomyozyten | 51 |
| 3.4. | Arbeiten mit Proteinen | 52 |
| 3.4.1. | Herstellung der Homogenate | 52 |
| 3.4.1.1. | Sf21-Insektenzellen | 52 |
| 3.4.1.2. | Adenoviral-infizierte neonatale Maus-Kardiomyozyten | 52 |
| 3.4.2. | Proteinbestimmung nach Lowry | 52 |
| 3.4.3. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 53 |
| 3.4.3.1. | Western Blot-Verfahren | 53 |
| 3.4.3.2. | Immunologische Identifizierung von Proteinen | 53 |
| 3.4.3.3. | Quantifizierung der Immunreaktion | 54 |
| 3.4.3.4. | Autoradiographie | 55 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.3.5. | „ ⁴⁵ Ca ²⁺ -Overlay“-Assay | 55 |
| 3.4.3.6. | Quantifizierung der Proteinexpression | 55 |
| 3.4.3.7. | Linearer Bereich der Bestimmung | 56 |
| 3.4.3.8. | Statistische Auswertungen | 56 |
| 3.4.4. | „Pull-down“-Assay | 56 |
| 3.4.4.1. | Herstellung der Homogenate | 58 |
| 3.4.4.2. | Bindung von GST-TRD an Glutathion-Agarose-Beads | 58 |
| 3.4.4.3. | Binden von <i>CASQ2</i> -WT/ <i>CASQ2</i> -I161V an GST-TRD | 59 |
| 4. | Ergebnisse | 60 |
| 4.1. | Die <i>CASQ2</i> -Mutation I161V: Klinische Daten | 60 |
| 4.2. | Gerichtete Mutagenese des <i>CASQ2</i> | 63 |
| 4.3. | Expression von <i>CASQ2</i> -WT und <i>CASQ2</i> -I161V in Sf21-Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren | 65 |
| 4.3.1. | Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pVL1393-) <i>CASQ2</i> -WT | 66 |
| 4.3.2. | Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pVL1393-) <i>CASQ2</i> -I161V | 67 |
| 4.3.3. | Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pAchLT-) 6x His- <i>CASQ2</i> -WT | 67 |
| 4.4. | Immunologischer Nachweis der Proteinexpression des humanen <i>CASQ2</i> in Sf21-Insektenzellen | 68 |
| 4.5. | Ca ²⁺ -abhängige Kalziumbindung von rekombinantem <i>CASQ2</i> -I161V und <i>CASQ2</i> -WT | 70 |
| 4.5.1. | Etablierung des Versuchsablaufs | 70 |
| 4.5.2. | Ca ²⁺ -abhängige Kalziumbindung | 74 |
| 4.6. | Quantitative Bestimmung der Ca ²⁺ -abhängigen Ca ²⁺ -Bindung von <i>CASQ2</i> -WT/ <i>CASQ2</i> -I161V | 78 |
| 4.7. | Bindung von <i>CASQ2</i> -WT und <i>CASQ2</i> -I161V an TRD/ Etablierung eines „Pull-Down“-Assays | 81 |
| 4.7.1. | Herstellung der Proben und immunologischer Nachweis von <i>CASQ2</i> -WT, <i>CASQ2</i> -I161V und GST-TRD | 81 |
| 4.7.2. | Immobilisierung von GST-TRD an Glutathion-Agarose-Beads | 83 |
| 4.7.3. | Bindung von <i>CASQ2</i> -WT und <i>CASQ2</i> -I161V an GST-TRD | 85 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.8. | Nativgel zur Beurteilung des Faltungszustands von mutiertem <i>CASQ2</i> und Wildtyp- <i>CASQ2</i> | 89 |
| 4.9. | Herstellung eines rekombinanten Adenovirus | 91 |
| 4.9.1. | Adenovirale Überexpression von <i>CASQ2</i> -WT und <i>CASQ2</i> -I161V | 91 |
| 4.9.2. | Amplifikation der rekombinanten Adenoviren in HEK293-Zellen | 97 |
| 4.9.3. | Immunologischer Nachweis der Proteinexpression von Ad5- <i>CASQ2</i> -WT und Ad5- <i>CASQ2</i> -I161V in HEK-Zellen | 98 |
| 4.9.4. | Adenovirale Infektion von neonatalen Maus-Kardiomyozyten | 99 |
| 5. | Diskussion | 101 |
| 5.1. | Beziehung zwischen dem Genotyp der I161V-Mutation und dem klinischen Phänotyp | 102 |
| 5.2. | Expression von <i>CASQ2</i> -I161V/ <i>CASQ2</i> -WT in einem geeigneten Zellsystem | 105 |
| 5.3. | Die I161V-Mutation im kardialen <i>CASQ2</i> -Gen und ihre funktionellen Auswirkungen auf die zelluläre Ca ²⁺ -Homöostase | 106 |
| 5.4. | Effekte der I161V-Mutation auf die SR-Ca ²⁺ -Freisetzung | 108 |
| 5.5. | Adenovirale Überexpression von <i>CASQ2</i> -I161V und <i>CASQ2</i> -WT | 110 |
| 5.6. | Ausblick | 112 |
| 6. | Anhang | 114 |
| 6.1. | Puffer und Medien | 114 |
| 6.2. | Geräte und Bezugsquellen | 124 |
| 6.3. | Kits | 126 |
| 6.4. | Sonstige Arbeitshilfsmittel | 126 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 127 |
| | Danksagung | 141 |
| | Lebenslauf | 142 |

1. Einleitung

1.1. Klinisches Erscheinungsbild einer potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung

Katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachyarrhythmien (CPVT) liegen Störungen in der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase zugrunde, deren molekulare Mechanismen bis heute trotz intensiver Forschung nicht vollständig verstanden wurden. Die potentielle Gefahr jeder CPVT-bedingten Arrhythmie besteht darin, in ein lebensbedrohliches Kammerflimmern zu degenerieren (Abb. 1). So konnte die Letalität der CPVT, die auch bei optimaler Compliance von betroffenen Patienten im Rahmen der Einnahme der bisher zur Verfügung stehenden Medikamente bei 30-50 % bis zum 30. Lebensjahr liegt (Fisher et al. 1999, Terentyev et al. 2006), bis heute nicht gesenkt werden. Dies verdeutlicht, dass die CPVT im Falle ihres Auftretens nicht nur für die betroffenen Patienten, sondern auch für die behandelnden Ärzte ein ernsthaftes Ereignis darstellt, dessen umfassendes pathophysiologisches Verständnis für eine optimale Behandlungsstrategie essentiell ist.

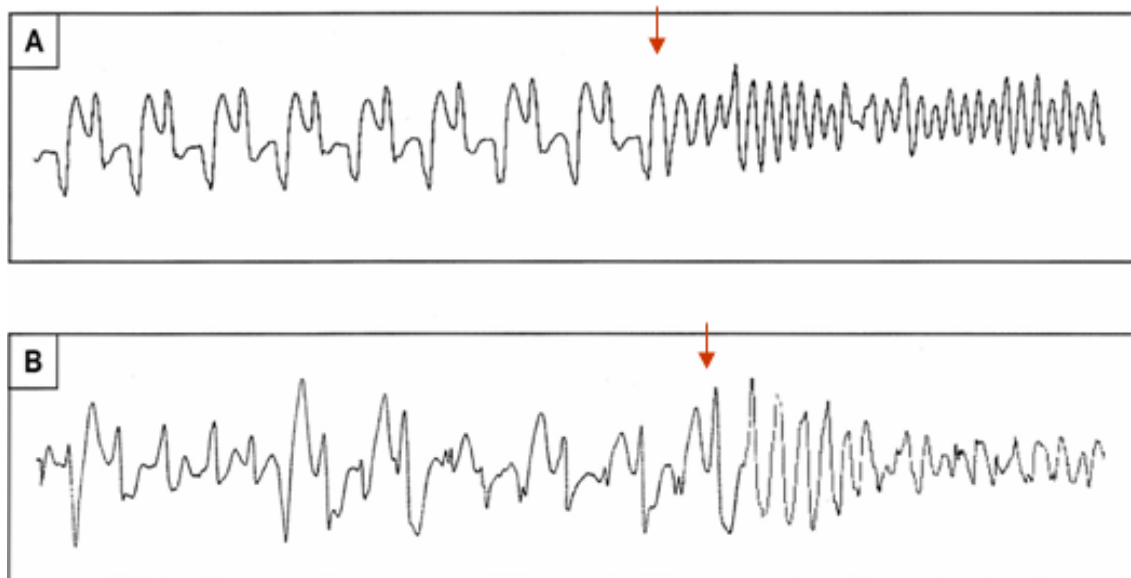


Abb. 1: CPVT und Kammerflimmern (Piori et al. 2002)

Beispiele für bidirektionale (A) und polymorphe ventrikuläre Tachykardien (B), die in ein Kammerflimmern (rote Pfeile) degenerieren.

Die CPVT wird über einen immer wiederkehrenden Symptomkomplex aus Synkopen im Zusammenhang mit körperlicher Anstrengung und/oder emotionaler Erregung definiert. Bei den meist jungen, ansonsten unauffälligen Patienten (Postma et al. 2002; Lahat et al. 2004; Scheinman et al. 2006) zeigt das EKG unter Stress ventrikuläre Tachykardien, die meist ab einer Pulsfrequenz von 107 bis 133 bpm einsetzen (Bauce et al. 2002; Wehrens et al. 2003; Lehnardt et al. 2004), je nach Grad und Dauer der jeweiligen Belastung der Betroffenen als Extrasystolen, Bigemini und/oder CPVT (bidirektional oder polymorph; vgl. Abb. 1) imponieren und nach Ende der Belastung in der Regel reversibel sind (Leenhardt et al. 1995; Priori et al. 2002). Charakteristisch ist ein morphologisch normales Herz (Viskin und Belhassen et al. 1998; Swan et al. 1999) mit unauffälligem Ruhe-EKG und keinerlei Hinweisen auf andere arrhythmogene Syndrome, wie Long-QT-Syndrom, Short-QT-Syndrom oder Brugada-Syndrom.

Das folgende klinische Fallbeispiel (Leenhardt et al. 1995) beschreibt den Krankheitsverlauf eines männlichen Patienten, der im jugendlichen Alter von 23 Jahren einen plötzlichen Herztod erlitt (Abb. 2). Im Alter von 4 Jahren war bei dem ansonsten gesunden Patienten eine schwere Form von CPVT mit regelmäßig, teils mehrfach pro Tag auftretenden Synkopen festgestellt worden. Neben zwei Episoden von polymorphen ventrikulären Tachykardien zeigten sich weitere intermittierende Rhythmusstörungen, wie ein sinoatrialer Block mit in der Folge auftretenden Erregungsrückbildungsstörungen, eine Sinustachykardie und mehrere polymorphe Extrasystolen.

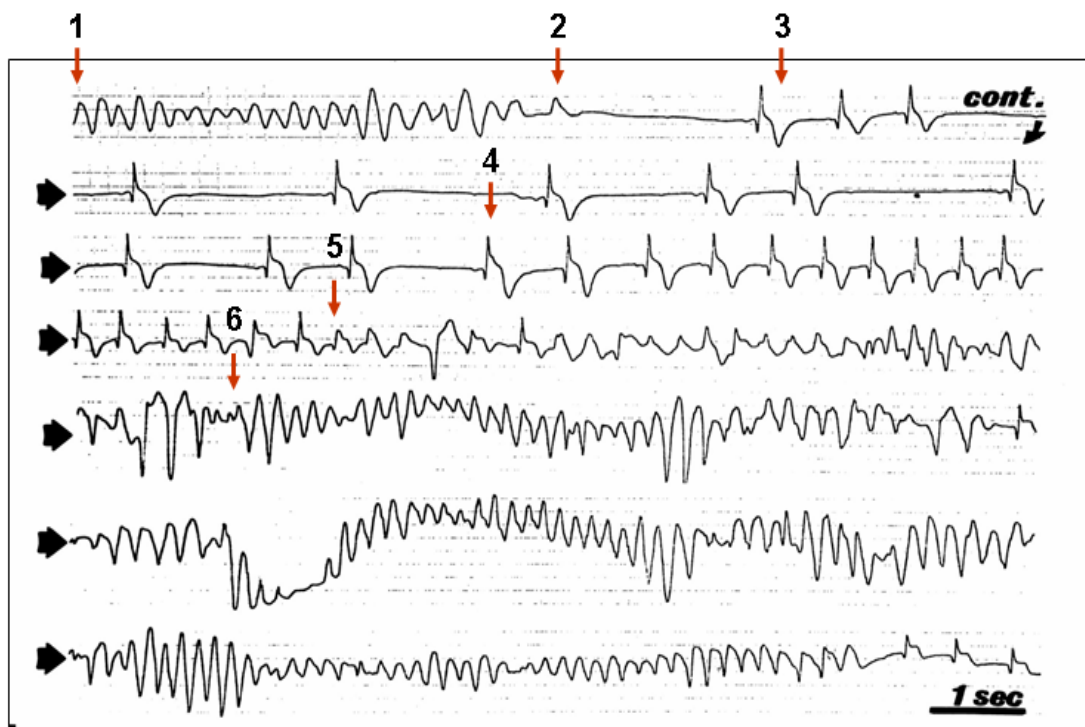


Abb. 2: Polymorphe ventrikuläre Tachykardie im Rahmen einer Synkope (Leenhardt et al. 1995)

Diese EKG-Aufzeichnung des Patienten wurde im Rahmen einer seiner Synkopen aufgezeichnet und zeigt eine initial ablaufende polymorphe ventrikuläre Tachykardie (1), ähnlich einem Kammerflimmern, gefolgt von einer plötzlichen spontanen Konversion in einen sinoatrialen Block (2) mit in der Folge auftretenden Erregungsrückbildungsstörungen (3). Schließlich entwickeln sich eine Sinustachykardie (4), polymorphe ventrikuläre Extraschläge (5) und letztlich eine neue Episode (30 Sekunden) von polymorphen ventrikulären Tachykardien (6).

Eine kausale Therapie der CPVT existiert nicht. So steht die Gabe von β -Rezeptorblockern (z.B. Nadolol, Metoprolol) im Vordergrund der Behandlung, auch wenn ihre Wirkung im Rahmen der CPVT nur symptomatisch ist (Liu et al. 2008). β -Rezeptorblocker antagonisieren die Wirkung endogener Katecholamine, die im Rahmen der getriggerten Arrhythmien freigesetzt werden.

1.2. Genetik der CPVT

Bei der CPVT handelt es sich um eine hereditäre Erkrankung. In der Familiengeschichte von CPVT-Patienten finden sich bei bis zu 30 % aller Erkrankungen weitere Fälle von stressinduzierten Synkopen und plötzlichem Herztod. Die Vererbung erfolgt sowohl autosomal-dominant (CPVT-1; Leenhardt et al. 1995; Fisher et al. 1999; Laitinen et al. 2001; Priori et al. 2001) als auch autosomal-rezessiv (CPVT-2; Lahat et al. 2004). Weiterhin gibt es Hinweise auf einen möglichen Einfluss einer veränderten Penetranz mit unterschiedlicher Ausprägung des Krankheitsbildes zwischen den Generationen (Kirchhefer et al. 2010) sowie auf eine polygene Vererbung bzw. einen multifaktoriellen Hintergrund (Postma et al. 2002). Unabhängig vom Vererbungsmuster lässt sich bei allen Formen der CPVT derselbe charakteristische Symptomkomplex feststellen. Es stellt sich daher die Frage, durch welche pathophysiologischen Ursachen dies möglich ist.

1.3. Autosomal-dominante Form der CPVT

Die autosomal-dominante Form der CPVT wird dem Genlocus 1q42-q43 zugeschrieben, einer Region, in der das *RyR2*-Gen lokalisiert ist. Dieses kodiert für einen Kanal (RyR) des junktionalen Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), der für das ausströmende Ca^{2+} aus dem SR während der Systole der Herzaktion verantwortlich ist (Wagenknecht et al. 1989; Bers et al. 2001). So fanden sich unterschiedliche Punktmutationen im *RyR2*-Gen von CPVT-betroffenen Patienten (Priori et al. 2001; Laitinen et al. 2001), von denen mittlerweile mindestens 71 identifiziert wurden (<http://www.fsm.it/cardmoc>). Untersuchungen zu subzellulären Abläufen im Rahmen dieser Mutationen konnten zeigen, dass Veränderungen im Porenbereich des RyR die Effektivität bzw. Aktivierbarkeit dieses Kanals so moduliert, dass es im Verlauf der Diastole zu einem „ Ca^{2+} -Leck“ (Wehrens et al. 2003; George et al. 2003) und somit zu einer Ca^{2+} -Überladung im Zytosol mit der Folge von sogenannten „verspäteten Nachdepolarisationen“ (DADs=delayed afterdepolarisations) kommt (Bers et al. 2002). Dieser Prozess könnte CPVT triggern (vgl. 1.6.). Ursächlich für das auftretende „ Ca^{2+} -Leck“ könnte eine reduzierte Bindungsaffinität des RyR zu einem seiner Regulatorproteine, FKBP 12.6, sein, dessen Bindung an den RyR normalerweise den geschlossenen Zustand des

Kanals stabilisiert (Bers et al. 2001; Gellen et al. 2008). Betrachtet man die Regulation der Bindungsaffinität des RyR zu seinen Regulatorproteinen, so erfolgt diese normalerweise durch eine Proteinkinase A (PKA)-induzierte Phosphorylierung des RyR. Diese Phosphorylierung könnte im Rahmen einer adrenergen Stimulation mutationsbedingt verändert sein (Wehrens et al. 2003; Lehnhard et al. 2004; Marks et al. 2001, 2002), z.B. als Folge einer abnormalen Autoregulation des RyR (über fehlerhafte interdomäne Interaktionen; George et al. 2006). Tatsache ist, dass umfassende Versuche an sogenannten „knock-in-Mäusen“ mit der *RyR2*-Mutation R4496C eine Modulation der RyR-Aktivität unter basalen Bedingungen (Jiang et al. 2002) und/oder nach β -adrenerger Stimulation (George et al. 2003) bestätigen konnten. Die Tiere zeigten im Rahmen eines Vergleichs mit Wildtyp-Mäusen nach Gabe von Koffein und β -adrenerger Stimulation bidirektionale ventrikuläre Tachyarrhythmien (Cerrone et al. 2005; Liu et al. 2006; Fernandez-Velasco et al. 2009).

1.4. Autosomal-rezessive Form der CPVT

Neben den autosomal-dominant vererbten *RyR2*-Mutationen wurden bisher mindestens 10 weitere Fälle von CPVT identifiziert (<http://www.fsm.it/cardmoc>), die, bis auf wenige Ausnahmen (Postma et al. 2002, Kirchhefer et al. 2010), einem rezessiven Erbmuster folgen, bei gleichzeitig nicht nachweisbaren Veränderungen im *RyR2*-Gen. Aufgrund dieser Tatsache stehen zunehmend Untersuchungen mit den RyR-assoziierten Proteinen im Vordergrund. So ist der RyR einerseits mit Triadin (TRD; Guo et al. 1995, 1996) und Junctin (JCN; Jones et al. 1995), zwei transmembranären SR-Proteinen, andererseits mit dem intraluminal gelegenen Calsequestrin (CSQ; Ikemoto et al. 1989, 1991) assoziiert, indem der RyR, TRD, JCN und CSQ einen funktionell eng verknüpften quaternären Proteinkomplex im junktionalen SR bilden (Abb. 3; Zhang et al. 1997).

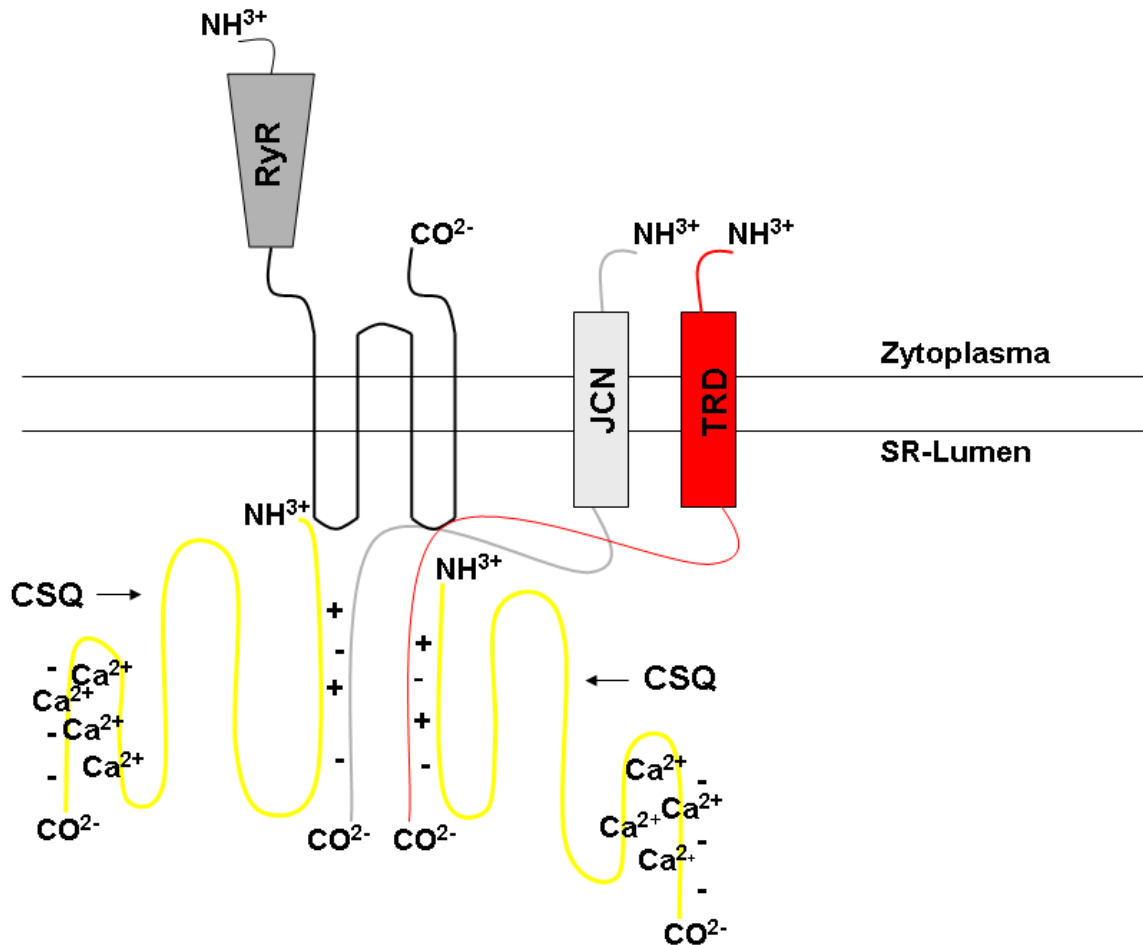


Abb. 3: Der quaternäre Proteinkomplex im junktionalen SR (Zhang et al. 1997)

Schematische Darstellung des quaternären Proteinkomplexes im junktionalen SR. Der Ryanodin-Rezeptor (RyR) und seine transmembranären Bindungspartner Triadin (TRD) und Junctin (JCN) stehen in enger Verbindung mit dem auf der SR-luminalen Seite befindlichen kardialen Calsequestrin (CSQ). Während der RyR als Kanal für in das Zytoplasma ausströmendes Ca²⁺ dient, ist CSQ an die innere Oberfläche des SR gekoppelt, wo es durch TRD und JCN sowohl strukturell als auch funktionell Ca²⁺-abhängig am RyR verankert wird. Negativ geladene Aminosäuren des Calsequestrins binden Kalzium-Ionen.

Die Erstbeschreibung einer *CASQ2*-Genmutation erfolgte im Jahr 2001. Die Mutation D307H, mit Zuordnung auf dem Genlokus 1p13-21, wurde mit einer autosomal-rezessiven Form der CPVT in Verbindung gebracht. D307H bezeichnet eine Punktmutation in einer hoch konservierten Region des *CASQ2*-Gens, bei

der negativ geladenes Asparagin gegen positiv geladenes Histidin ausgetauscht ist. Der Nachweis der Mutation erfolgte in einem israelischen Beduinenstamm (7 verwandte Familien, 12 weitere Kinder), bei dem eine geschlechterunabhängige Ausprägung des Krankheitsbildes nur in homozygoten Trägern (die heterozygoten Eltern waren phänotypisch unauffällig) aufgefallen war, bei gleichzeitig negativer Testung auf *RyR2*-Mutationen (Lahat et al. 2004).

1.5. Das humane *CASQ2*-Gen

Das humane *CASQ2*-Gen besteht aus 11 Exons (MacLennan und Reithmeier, 1998; Wang et al. 1998; Lahat et al. 2001), wobei die Genstruktur der Abb. 4 zu entnehmen ist.

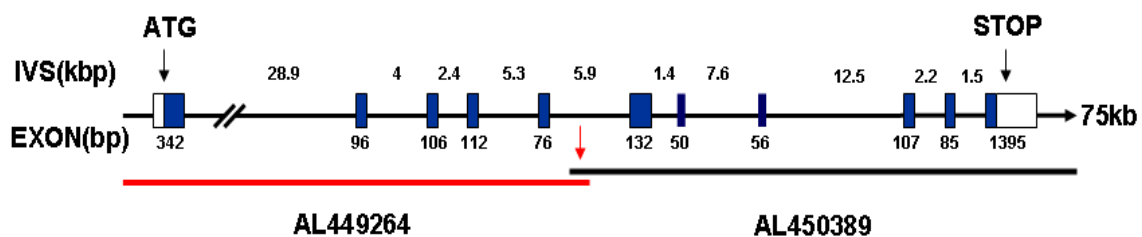


Abb. 4: *CASQ2*-Genstruktur (Lahat et al. 2001)

Vergrößerte Ansicht auf das 75kb-Segment des *CASQ2*-Gens. Das Intervall ist unterteilt in zwei genomische Klone, die eine 5kb große Überlappung zeigen (roter Pfeil). AL449264 beinhaltet die ersten 4 Exons, AL450389 die anderen 7. Gekennzeichnet sind diese zudem durch blaue Boxen, wobei die Länge der Exons (EXON) unter den jeweiligen Boxen benannt ist. Über der Linie ist weiterhin die Länge der Introns (IVS) angezeigt. Das Bild beinhaltet den Translations-Initiations-Bereich (ATG) sowie das Stopp-Codon (STOP).

Das humane *CASQ2*-Gen kodiert für insgesamt 399 Aminosäuren (AS). Im Vergleich dazu besitzt das *CASQ2*-Gen des Hundes 410 AS (Frank et al. 2001). Es besteht ein hoher Konservierungsgrad zwischen den Spezies mit einer 90 %igen Übereinstimmung der einzelnen AS. Wichtige Funktionsbereiche, wie z.B. das für die Ca^{2+} -Bindung wichtige C-terminale Ende (AS 352-367; vgl. 1.6.) weisen sogar eine Übereinstimmung von 100 % zwischen den Spezies auf. Abb. 5 zeigt das *CASQ2*-Gen des Hundes im direkten Vergleich mit dem humanen *CASQ2*-Gen.

| | | |
|--------|---|-----|
| Hund | MKRTHLFIAGLYLLASCRAEEGLNFPTYDGKDRVVSLEKNFKQVLKKYD | 50 |
| Mensch | MKRTHLFIVGIYFLSSCRAEEGLNFPTYDGKDRVVSLEKNFKQVLKKYD | |
| Hund | VLCLYYHESVSSDKVAQKQFQLKEIVLELVAQVLEHKDIGFVMVDAKKEA | 100 |
| Mensch | LLCLYYHEPVSSDKVTQKQFQLKEIVLELVAQVLEHKAIGFVMVDAKKEA | |
| Hund | KLAKKLGFDDEEGSLYVLKGDRTIEFDGEFAADVLEFLLDLIEDPVEIIN | 150 |
| Mensch | KLAKKLGFDDEEGSLYILKGDRTIEFDGEFAADVLEFLLDLIEDPVEIIS | |
| Hund | SKLEVQAFERIEDQIKLIGFFKSESEYYKAFEEAAEHFQPYIKFFATFD | 200 |
| Mensch | SKLEVQAFERIEDYIKLIGFFKSEDSEYYKAFEEAAEHFQPYIKFFATFD | |
| Hund | KGVAKKLSLKMNEVDYEPFMDEPIAIPDKPYTEEELVEFVKEHQRPTLR | 250 |
| Mensch | KGVAKKLSLKMNEVDYEPFMDEPIAIPNKPYTEEELVEFVKEHQRPTLR | |
| Hund | RLRPEDMFETWEDDLNGIHIVAFERSDPDGYEFLEILKQVARDNTDNP | 300 |
| Mensch | RLRPEEMFETWEDDLNGIHIVAFEAESDPDGYEFLEILKQVARDNTDNP | |
| Hund | LSIVWIDPDDFPLLVAWYWEKTFKIDLFKQIGVVNVTADSVWMEIPDDD | 350 |
| Mensch | LSILWIDPDDFPLLVAWYWEKTFKIDLFRPQIGVVNVTADSVWMEIPDDD | |
| Hund | DLPTAEELEDWIEDVLSGKINTEDDDNEEGDDGDDDEDDDDDDGNNSDDEE | 400 |
| Mensch | DLPTAEELEDWIEDVLSGKINTEDDDEDDDDDDNSDEEDNDDSDDDDE | 399 |
| Hund | SNDDSDDDDE | 410 |
| Mensch | | |

Abb. 5: Das *CASQ2*-Gen des Menschen im Vergleich zum *CASQ2*-Gen des Hundes.

Das menschliche *CASQ2*-Gen besitzt 11 Aminosäuren (AS) weniger als das *CASQ2*-Gen des Hundes bei einer 90 %igen Übereinstimmung der einzelnen AS.

Die physiologischen Aufgaben von CSQ im SR des Kardiomyozyten sind von zentraler Bedeutung und lassen sich anhand der zellulären Ca^{2+} -Homöostase (Abb. 6) erläutern.

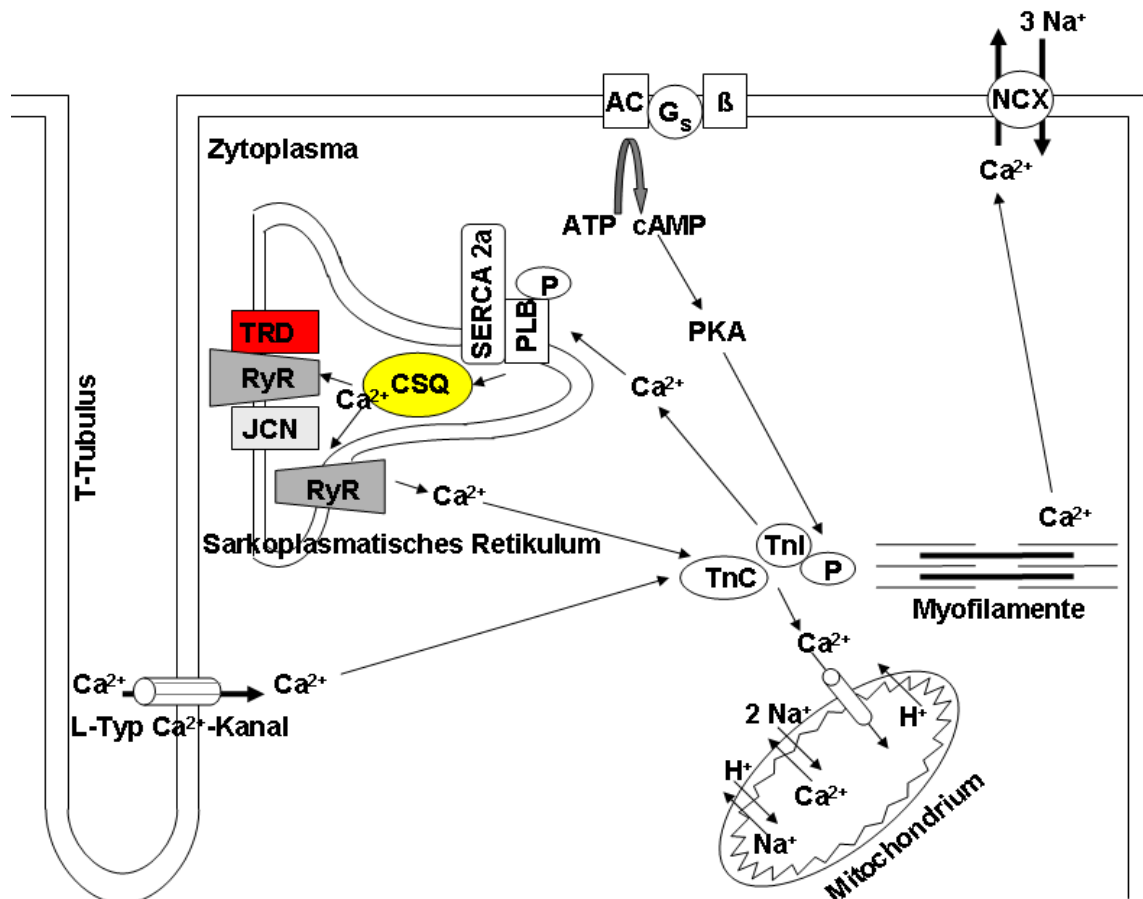


Abb. 6: Die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase des Kardiomyozyten

Die Abb. zeigt eine schematische Übersicht zur zellulären Ca^{2+} -Homöostase eines Kardiomyozyten. Die Stimulation von β -Adrenorezeptoren führt über ein stimulierendes G_s -Protein (G_s) zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC). Diese katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosin triphosphat (ATP). In der Folge wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die ihrerseits den L-Typ Ca^{2+} -Kanal (Dihydropyridinrezeptor) aktiviert, über den Ca^{2+} in das Zytoplasma einströmt. Ferner phosphoryliert die PKA Phospholamban (PLB), ein intrinsisches Protein des SR. Durch diese Phosphorylierung verliert PLB seine hemmende Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a) des SR, wodurch sich die Affinität von SERCA 2a für Ca^{2+} erhöht. In der Folge wird die Ca^{2+} -Rückaufnahme in das SR gesteigert.

gert. Neben SERCA 2a transportiert der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) Ca^{2+} -Ionen zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zytoplasma. Im SR werden die Ca^{2+} -Ionen an das Ca^{2+} -Speicherprotein Calsequestrin (CSQ) gebunden. CSQ, Triadin (TRD) und Junctin (JCN) stellen zusammen mit dem Ryanodinrezeptor (RyR) den funktionell wichtigen quaternären Proteinkomplex des SR dar (vgl. Abb. 3, S. 11), über den die Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung erfolgt. Während jeder Systole wird Ca^{2+} über den RyR aus dem SR in das Zytoplasma freigesetzt. Dort bindet es an die regulatorischen Proteine der Myofilamente, zu denen z.B. Troponin C (TnC) und Troponin-Inhibitor (TnI) gehören. In der Folge kommt es zur Herzmuskelkontraktion. Durch PKA phosphoryliertes TnI inhibiert TnC, was eine verringerte Affinität von TnC für Ca^{2+} zur Folge hat.

1.6. Calsequestrin (CSQ) und seine Aufgaben im Rahmen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase

CSQ ist das für die Ca^{2+} -Speicherung wichtigste SR-Protein. Es bindet Ca^{2+} mit hoher Kapazität (900 nmol Ca^{2+} /mg Protein bzw. ca. 40 mol Ca^{2+} /mol CSQ) und geringer Affinität (0,5 mM; Mitchell et al. 1988). Man nimmt an, dass das C-terminale Ende des CSQ sowohl für die Ca^{2+} -abhängige Kondensation des Proteins als auch für die Ca^{2+} -Bindung selbst verantwortlich ist (Wang et al. 1998; Park et al. 2004). Nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen an CSQ kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, die zur Internalisierung von hydrophoben Regionen des Proteins führt (Mitchell et al. 1988). Für die funktionell wichtige Polymerisation im Rahmen der Ca^{2+} -Bindung werden u.a. die C-terminal gelegenen Aminosäuren (AS) 337-357 (Gatti et al. 2001) verantwortlich gemacht, während die Ca^{2+} -Bindung durch die AS 352-367 vermittelt werden könnte. (Wang et al. 1998). Es ist bekannt, dass es andere für die Ca^{2+} -Speicherung/ Ca^{2+} -Homöostase wichtige Proteine gibt (Bsp. Sarcolipin; Asai et al. 2004; Babu et al. 2006; Knollmann et al. 2006). Jedoch konnte die fundamentale Bedeutung von CSQ im Rahmen der Ca^{2+} -Speicherung mithilfe von „CSQ-knock-out-Mäusen“ gezeigt werden. Diese Tiere zeigten ventrikuläre Extrasystolen aufgrund einer gestörten Ca^{2+} -Freisetzung (Knollmann et al. 2006). Die Regulation der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen erfolgt Ca^{2+} -abhängig (Bassani et al. 1995) durch eine gezielte Interaktion von CSQ mit RyR, TRD und JCN (Zhang et al. 1997; Kobayashi et al. 2000; Terentyev et al. 2008; vgl. Abb. 3, S. 11), wobei TRD und JCN möglicherweise als Ca^{2+} -Sensor im SR zu sehen sind (Gyorke und Terentyev, 2008). Im Rahmen der geregelten Kopplung von elektrischer Erregung und Kontraktion führt die Stimulation von spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (Dihydropyridinrezeptoren) im Sarkolemma zum Einströmen von Ca^{2+} in das SR (Carafoli et al. 1987). Ferner verliert Phospholamban (PLB), das intrinsische Protein des SR, nach Phosphorylierung durch die PKA seine hemmende Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a) des SR. Hierdurch erhöht sich die Affinität von SERCA 2a für Ca^{2+} , und die Ca^{2+} -Rückaufnahme in das SR wird gesteigert (Mintz und Guillain et al. 1997; MacLennan et al. 2000). Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im SR bzw. in unmittelbarer Umgebung des RyR kommt es zu einer vermehrten Besetzung von CSQ mit Ca^{2+} -Ionen, wodurch die bei

niedrigem Ca^{2+} -Gehalt bestehende starke Interaktion zwischen CSQ, TRD und JCN abgeschwächt und so der RyR aktiviert wird (Bers et al. 2002; Jiang et al. 2005). In der Folge kommt es zur Freigabe großer Mengen an Ca^{2+} -Ionen durch das am RyR verankerte CSQ. Die Ca^{2+} -Ionen gelangen über den offenen Rezeptor in das Sarkolemma der Herzmuskelzelle und triggern hier die Aktivierung kontraktile Filamente (Puglisi et al. 1996). Nach einer β -adrenergen Stimulation, z.B. im Rahmen einer Stresssituation (Katecholaminfreisetzung), kann sich die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR soweit verstärken, dass letztlich eine globale Ca^{2+} -Überladung der Herzmuskelzelle resultieren kann. Diese Ca^{2+} -Überladung wird als Trigger für das Auftreten von spontanen/ungewollten Ca^{2+} -Freisetzungen, den späten Nachdepolarisationen (DADs), gesehen (vgl. 1.3.), deren Auftreten im Rahmen der CPVT als pathognomonisch diskutiert wird. Man nimmt an, dass CSQ in der Lage ist, solche DADs zu verhindern, indem es die Menge der Ca^{2+} -Freigabe unter erhöhter intraluminaler Ca^{2+} -Beladung durch Hemmung des RyR steuert, mit dem Ziel, zu jeder Zeit einen geregelten Herzrhythmus sicherzustellen. (Knollmann et al. 2006; Chopra et al. 2007).

1.7. *CASQ2*-Genmutationen und CPVT

CASQ2-Genmutationen beeinflussen die Funktion des *CASQ2* auf unterschiedliche Art und Weise, bei gleichem klinischen CPVT-Phänotyp. Daher besteht ein großes Interesse an der Untersuchung von *CASQ2*-Genmutationen. Es wird vermutet, dass *CASQ2*-Mutationen zu Störungen der Ca^{2+} -Speicherung und/oder -Freisetzung führen, indem sie beispielsweise eine veränderte Ca^{2+} -Bindungskapazität bewirken. Mittels Herstellung eines die Mutation *CASQ2*-D307H tragenden rekombinanten Adenovirus und Expression in adulten Ratten-Kardiomyozyten konnte z.B. gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit im Vergleich zu Wildtyp-*CASQ2* reduziert ist. Daraus resultiert ein erniedrigter Ca^{2+} -Gehalt im Zytosol mit in der Folge erniedrigten und verkürzten Amplituden Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Transienten (Viatchenko-Karpinski et al. 2004). Transgene Mäuse, die die *CASQ2*-D307H-Mutante überexprimierten, entwickelten unter katecholaminergem Stress ventrikuläre Tachyarrhythmien ähnlich den CPVTs, die beim Menschen beobachtet werden (Dirksen et al. 2007). Untersuchungen mit der

CASQ2-Genmutation G112+5X (di Barletta et al. 2006) zeigten ähnliche Ergebnisse. Diese Mutation beeinträchtigt die für die Ca^{2+} -Bindungskapazität wichtige Polymerisationsfähigkeit des *CASQ2*. Kürzlich konnten Untersuchungen mit der *CASQ2*-Genmutation K206N zeigen, dass eine gestörte Polymerisationsfähigkeit des mutierten *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form möglicherweise im Zusammenhang mit einer mutationsbedingt aufgetretenen zweiten *N*-Glykosilierungsstelle ($\text{K}^{206} \rightarrow \text{N-X-S/T}$) stehen könnte (Kirchhefer et al. 2010). Neben der veränderten Ca^{2+} -Bindungskapazität könnten *CASQ2*-Genmutationen ferner eine Beeinflussung der RyR-Funktion verursachen. So könnte eine verspätete RyR-Deaktivierung ursächlich für die Entstehung spontaner extrasystolischer Ca^{2+} -Transienten und DADs sein (Viatchenko-Karpinski et al. 2004; Houle et al. 2004; di Barletta et al. 2006). Die *CASQ2*-Genmutation R33Q scheint z.B. die Interaktion mit dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal zu beeinträchtigen (Terentyev et al. 2006, 2008). Ursächlich hierfür könnte u.a. eine veränderte Bindung zum TRD von mutiertem *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form sein. Die Bindung zu TRD scheint sowohl für die *CASQ2*-Mutation R33Q als auch für die *CASQ2*-Mutation L167H verstärkt zu sein (Kim et al. 2007; Valle et al. 2008), während sie für die Mutation D307H, möglicherweise durch eine veränderte Tertiärstruktur des *CASQ2* (Houle et al. 2004) geringer zu sein scheint. Die Mutation G112+5x weist beispielsweise aufgrund eines Verlustes des C-terminalen Endes des *CASQ2* keine Bindung mehr zum TRD auf (Kobayashi und Jones, 2000).

1.8. Die I161V-Mutation im *CASQ2*-Gen: Eine neue Punktmutation

Bei der Mutation I161V handelt es sich um eine bisher nicht beschriebene Mutation im humanen *CASQ2*-Gen (durch Prof. Dr. E. Schulze-Bahr persönlich kommuniziert). Durch eine Punktmutation der AS 161 der *CASQ2*-cDNS (**ATT** \rightarrow **GTT**) besteht ein Austausch der chemisch neutralen AS Isoleucin gegen die ebenfalls chemisch neutrale AS Valin (vgl. Abb. 10, S. 39). Wir vermuten, dass *CASQ2*-I161V als Ursache einer klinisch relevanten CPVT in einer betroffenen Familie fungiert, wobei die hier zugrundeliegenden pathophysiologischen Ursachen bisher nicht bekannt sind. *CASQ2*-I161V diente dieser Promotionsarbeit als Grundlage für erste experimentelle Untersuchungen. Im Vordergrund stand die folgende Fragestellung:

2. Fragestellung

Die zentrale Aufgabe der Arbeit bestand in der Expression und funktionellen Charakterisierung der neu identifizierten Punktmutation I161V im humanen kardialen *CASQ2*-Gen. Methodisch-experimentell standen 4 Teilaspekte im Vordergrund:

1. Expression von humanem Wildtyp-Calsequestrin (*CASQ2*-WT) und gentechnisch verändertem Calsequestrin (*CASQ2*-I161) mittels Baculoviren in Sf21-Insektenzellen. Nachweis der exprimierten Proteine im Western Blot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern.
2. Expression von an Glutathion S-Transferase (GST) gekoppeltem Triadin (GST-TRD) des Hundes mittels Baculoviren in Sf21-Insektenzellen und Nachweis des exprimierten Fusionsproteins im Western Blot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern.
3. Funktionelle Untersuchung der exprimierten Proteine durch Testung der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit von Wildtyp- und mutiertem Calsequestrin einerseits, erste Untersuchungen zum Interaktionsverhalten mit Triadin andererseits.
4. Generierung rekombinanter Adenoviren, die zur Expression der Wildtyp-Form des humanen kardialen Calsequestrins (Ad5-*CASQ2*-WT) oder der I161V-Mutante (Ad5-*CASQ2*-I161V) führen. Nachweis der anschließenden Proteinexpression in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) und in neonatalen Maus-Kardiomyozyten mittels Western Blot-Verfahren unter Einsatz spezifischer Antikörper.

Ziel der geplanten Versuche sollte die Erlangung erster Erkenntnisse über die humane *CASQ2*-Mutation I161V sein. Durch die angestrebten Untersuchungen versprechen wir uns eine Verbesserung des Verständnisses der zugrunde liegenden Veränderungen in der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase und somit über die Pathophysiologie der CPVT. Durch die Generierung rekombinanter Expressionsmodelle sollten die Voraussetzungen für weiterreichende Forschungsarbeiten geschaffen werden. So könnten durch eine spätere Herstellung und Charakterisierung eines „I161V-knock-in-Tiermodells“ weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen erfolgen, mit dem Ziel, eine kausale Behandlungsstrategie der hereditären CPVT zu erarbeiten.

3. Material und Methoden

3.1. Arbeiten mit Zelllinien

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in Laborbereichen mit der Sicherheitsstufe 1 (Sf21-Zellen) bzw. 2 (HEK293-Zellen) an einer Sterilbank (Lamin Air HB 2472, Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf) und unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt.

3.1.1. Insektenzellen

Bei den Insektenzellen handelte es sich um eine Zelllinie aus Darmepithelzellen der Art *Spodoptera frugiperda*, Gattung der Lepidoptera, einer amerikanischen Schmetterlingsart (Vaughn et al. 1977). Es wurden Zellen der Zelllinie Sf21 (Invitrogen) verwendet.

3.1.1.1. Auftauen, Anzucht und Kultivierung

Die in 1 ml Gefriermedium enthaltenen 1×10^7 Zellen wurden nach dem Auftauen bei Raumtemperatur (RT) mit 4 ml Insektenzellmedium in einer 25 cm²-Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) ausgesät und bei 27°C im Inkubatorschrank (Inkubator Inforce-HT Minitron, Rose Scientific Ltd, Einsbach) kultiviert (ohne CO₂ Begasung). Insektenzellen bilden bei Kultivierung in Zellkulturflaschen einen „semiadhärent“ wachsenden Zellrasen, indem sie am Boden der Flaschen miteinander aggregieren. Während der Kultivierung in den Zellkulturflaschen wurde das Medium regelmäßig alle 1-2 Tage gewechselt. Nach Ausbildung des zusammenhängenden Zellrasens wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mithilfe von 10-15 ml frischem Medium und einer Pipette (Costar Stripette, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) abgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zwecks weiterer Kultivierung in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

3.1.1.2. Teilen und Passagieren eines Zellrasens

Das Teilen und Passagieren eines konfluent gewachsenen Zellrasens erfolgte gewöhnlich nach jeweils 4 Tagen, indem zunächst das verbrauchte Medium steril abgesaugt wurde und die Zellen danach mit 6 ml Insektenzellmedium vom Fla-

schenboden abgespült wurden. Es folgte die Überführung von jeweils 3 ml aus der entstandenen Zellsuspension in zwei frische 75 cm²-Flaschen, welche zuvor mit jeweils 10 ml frischem Medium versehen worden waren. Dieses Passagieren entspricht einem Verhältnis von ~1:4. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 27°C inkubiert.

3.1.1.3. Kultivierung in Suspensionskultur

Als Alternative zur Kultur als Zellrasen, bei dem die zunehmend aggregierenden Zellen einem hohen mechanischen Stress ausgesetzt sind, wurden die Sf21-Insektenzellen auch in Suspensionskultur kultiviert. Diese hat gegenüber dem Zellrasen einige Vorteile. So ist erstens eine Massenanzucht der Zellen möglich, zweitens kommt es durch ständige Bewegung auf einem Rundschüttler zu einer regelmäßigen Umspülung der Zellen, was ihr Aggregieren verhindert und so wiederum effektiv größere Wachstumsflächen erzeugt, weil die komplette Oberfläche der Zellen besiedelt werden kann. Für die Anzucht einer Suspensionskultur wurden die Sf21-Insektenzellen nach dem Zählen auf eine Dichte von 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und in einen verschließbaren Erlenmeyerkolben gegeben, der zuvor mit insgesamt 100 ml Insektenzellmedium versehen worden war. Eine Ergänzung des Mediums mit 0,1 % Pluronic F-68 (Gibco/Life Technologies), einem nichtionischen Tensid, schützte dabei die Insektenzellen vor hydrodynamischen Schäden. Die Verdopplungszeit von Sf21-Insektenzellen bei Kultivierung auf einem Rundschüttler (Modell 3015, GFL, Burgwedel) mit 90 Umdrehungen/min bei 27°C ohne CO₂-Begasung beträgt ca. 24 h.

3.1.1.4. Teilen und Passagieren einer Suspensionskultur

Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen wurden die Zellen erneut gezählt. Bei einer Dichte von mindestens 1,5 x 10⁶ Zellen/ml bis maximal 2,5 x 10⁶ Zellen/ml erfolgte die Überführung eines Teils der alten Kultur auf einen weiteren Erlenmeyerkolben. Durch Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen auf eine Dichte von ca. 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt und erneut auf einem Rundschüttler mit 90 Umdrehungen/min bei 27°C ohne CO₂-Begasung kultiviert.

3.1.1.5. Kotransfektion

Sf21-Insektenzellen können als Expressionssystem für Fremd-DNS eingesetzt werden, indem sie das Fremdgen gezielt vermehren (King et al. 1992; Ailor und Betenbaugh, 1999). Hierfür müssen die Sf21-Insektenzellen mit einem geeigneten Transfervektor (Baculovirus-Transfervektor pVL1393), in den die Fremd-DNS zuvor einkloniert wurde, und einer linearisierten Baculovirus-DNS kotransfiziert werden. Nach Rekombination homologer DNS-Bereiche entstehen vermehrungsfähige, rekombinante Baculoviren, welche die cDNS für das jeweilige Fremdgen enthalten (Abb. 7).

Die Kotransfektion erfolgte dabei mithilfe der Kalziumphosphat-Kopräzipitation nach Graham und van der Eb (1973). Die DNS wird dabei mit einer CaCl_2 -Lösung (6.1., Transfektionspuffer A und B, BD Biosciences) gemischt. Unter Anwesenheit von Phosphationen fällt Kalziumphosphat als Präzipitat aus. Die DNS, die ebenfalls Phosphatgruppen besitzt, fällt bei dieser Methode mit aus und wird mit dem Kalziumphosphat zusammen in die Zellen aufgenommen.

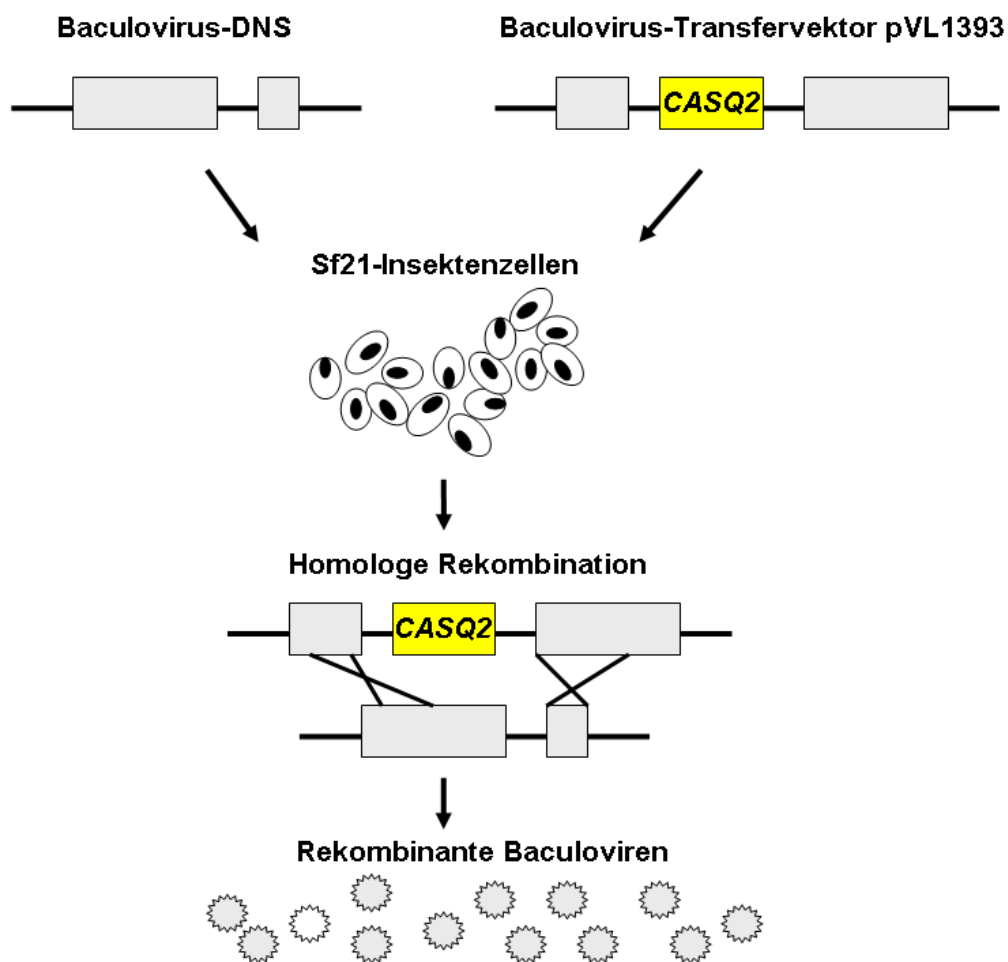


Abb. 7: Schematische Übersicht zur Kotretransfektion

Der Baculovirus-Transfervektor pVL1393, in den die Fremd-DNS (*CASQ2*) zuvor inkloniert wurde, und die linearisierte Baculovirus-DNS wurden in Sf21-Insektenzellen kotretransfiziert. Nach Rekombination homologer DNS-Bereiche entstanden vermehrungsfähige, rekombinante Baculoviren, welche die cDNS für das Fremdgen enthielten.

Die Aussaat von 2×10^6 Insektenzellen erfolgte in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen mit 2 ml frischem Medium. Die Zellen wurden anschließend 15 min inkubiert, wodurch es diesen ermöglicht wird, sich am Boden der Zellkulturflasche abzusetzen. Nach Zugabe von weiteren 2-3 ml Medium erfolgte eine erneute Wartezeit von 15 min, bevor das komplette Medium vorsichtig mittels Pipette abgesaugt wurde. 3 μg des rekombinanten Transfervektors und 0,25 μg (2,5 μl) Baculovirus-DNS (Ba-

culoGold, Pharmingen) wurden in 1 ml Transfektionspuffer B (BD Bioscience) gegeben, auf Eis gekühlt und schließlich tropfenweise auf die Insektenzellen gegeben. Nach sanfter Mischung und 4-stündiger Inkubation bei 27°C wurden die Zellen mit Insektenzellmedium gewaschen und für weitere 4-5 Tage bei 27°C inkubiert. Das Medium wurde in dieser Zeit nicht gewechselt.

3.1.1.6. Infektion von Sf21-Insektenzellen

4-5 Tage nach der Kotransfektion wurden die Zellen vom Boden abgelöst und die Zellsuspension bei 820 x g für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 16 R, Hettich Zentrifuge, Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf), wobei der Überstand mit den rekombinanten Baculoviren zur weiteren Infektion der Insektenzellen benutzt wurde. Die Aussaat von 3×10^6 Insektenzellen erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen, die zuvor mit 4 ml Insektenzellmedium befüllt worden waren, wobei nach 15-minütiger Wartezeit das Medium abgenommen und mit 1 ml des Kotransfektionsüberstands (Virusüberstand) tropfenweise versetzt wurde. Eine Inkubation von 1 h bei 27°C ermöglichte die Infektion der Zellen. Die weitere Kultivierung erfolgte in 4 ml frisch zugegebenem Medium bei 27°C, wobei die Zellen nach 3 Tagen im Mikroskop deutliche morphologische Unterschiede zeigten. So gaben sie ihre glatte kugelige Form auf und blähten sich auf. Im Lichtmikroskop (Leica DMIL, Wetzlar) zeigten sich typische Einschlusskörper als Zeichen einer gelungenen Infektion (Abb.8). Einschlusskörper stellen bei Kontroll-Baculovirus-infizierten Zellen das Korrelat des Hüllproteins Polyhedrin dar, das bei *CASQ2*-Baculoviren durch homologe Rekombination entfernt und durch die *CASQ2*-Sequenz ersetzt wird.

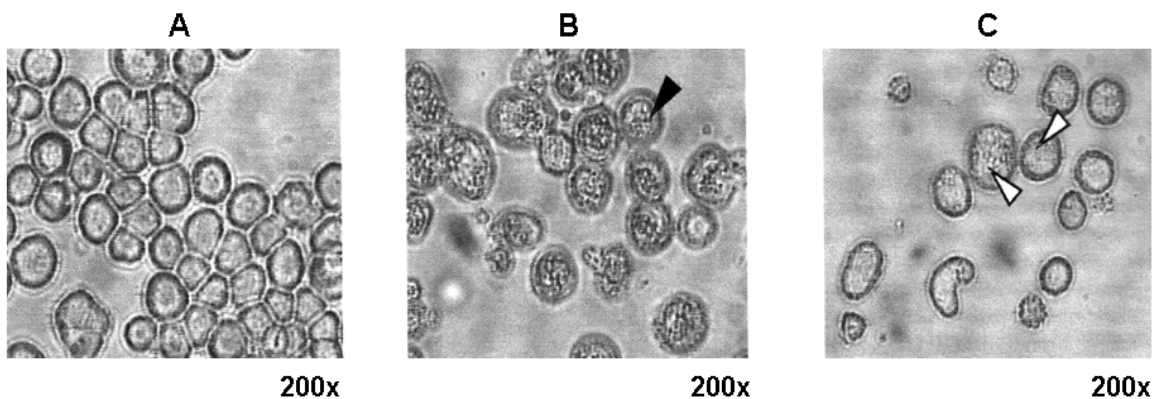


Abb. 8: Nicht-infizierte und infizierte Sf21-Insektenzellen

Nicht-infizierte (A), mit Kontroll-Baculovirus (B) und mit rekombinantem *CASQ2*-Baculovirus pVL1393 infizierte (C) Sf21-Insektenzellen wurden 3 Tage nach der Infektion fotografiert. Die typischen Einschlusskörper von Kontroll-Baculovirus-infizierten Zellen entstehen durch das Hüllprotein Polyhedrin (schwarzer Pfeil) und sind bei den *CASQ2*-Baculoviren durch homologe Rekombination entfernt und durch die *CASQ2*-Sequenz ersetzt worden. Man erkennt die typische Vakuolisierung der Zellen (weiße Pfeile) bei Infektion mit den *CASQ2*-Baculoviren.

3.1.1.7. Ernte der infizierten Insektenzellen

Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und für 10 min bei 820 x g zentrifugiert. Nach anschließender Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit einem Homogenisierungspuffer versehen. Die Homogenisierung erfolgte mittels Ultraschallstab (VirSonic 60®, Virtis, New York, USA) für 3 x 10 s, der Expressionsnachweis mittels Western Blot-Verfahren.

3.1.2. HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)

Bei den verwendeten HEK-Zellen handelte es sich humane embryonale Nierenzellen (Graham et al. 1977) der Zelllinie 293 (Mikrobix).

3.1.2.1. Auftauen und Anzucht

Die Zellen wurden zunächst aus dem N₂-Tank schrittweise erwärmt und anschließend mit 5 ml vorgewärmtem HEK-Zellen-Medium versehen. Nach Zentrifugation (Universal 16 R, Hettich Zentrifuge, Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf) bei 300 x g für 5 min und Raumtemperatur (RT) konnte der Überstand verworfen und

die Zellen in 3-5 ml frischem HEK-Zellen-Medium in eine 25 cm²-Zellkulturflasche (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt werden. Die Inkubation erfolgte im Inkubationsschrank (Queue Stabil Therm, Nalge Nunc International, Wiesbaden) bei 37°C und feuchter Atmosphäre bei 5 % CO₂-Begasung bis zur Konfluenz der Zellen. Um DMSO-Überreste aus dem Gefriermedium verlässlich entfernen zu können, wurde nach dieser Zeit das HEK-Zellen-Medium nochmals erneuert.

3.1.2.2. Kultivierung als Zellrasen

HEK-Zellen wachsen analog zu Insektenzellen als „semiadhärenter“ Zellrasen. So lassen sie sich in 25 cm²- oder in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultivieren, worin sie unter den für sie optimalen Bedingungen bei 37°C im Inkubationsschrank bei feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂-Begasung konfluierend wachsen.

3.1.2.3. Teilen und Passagieren des Zellrasens

Das Passagieren konfluent gewachsener HEK-Zellen erfolgte nach jeweils 4 Tagen, indem zunächst das gebrauchte Medium steril abgesaugt wurde und die Zellen danach mit 6 ml HEK-Zellen-Medium in einer sterilen Pipette (Costar Stripette, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) vom Flaschenboden abgespült wurden. Es folgte die Überführung von jeweils 2 ml aus dieser entstandenen Zellsuspension in zwei frische 75 cm²-Flaschen, welche zuvor mit jeweils 10 ml frischem Medium aufgefüllt worden waren. Dieses Passagieren entspricht einem Verhältnis von 1:6. Danach wurden die Zellen erneut der Inkubation im Inkubationsschrank zugeführt.

3.1.2.4. Einfrieren

Ein konfluent gewachsener Zellrasen aus einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurde nach Absaugen des Mediums in 6 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und in ein 10 ml-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 4°C und 300 x g für 5 min konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden. Die erneute Resuspension erfolgte in speziellem DMSO-Medium. Das anschließende Einfrieren in sterilen Sarstedt-Kryoröhrchen erfolgte schrittweise für 24 h bei -80°C dann dauerhaft in einem N₂-Tank.

3.1.2.5. Transfektion

Das Protokoll zur Durchführung einer Transfektion ist den Abschnitten 3.3.3. ff. zu entnehmen.

3.1.2.6. Infektion

Das Protokoll zur Durchführung einer Infektion ist den Abschnitten 3.3.3. ff. zu entnehmen.

3.2. Arbeiten mit DNS

Als Hilfsmittel für das Arbeiten mit DNS dienten u.a. Pipetten (Research), Tischzentrifugen (5415 C) sowie Thermomixer (5436) der Firma Eppendorf AG, Hamburg.

3.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Plasmiden wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) für die Aufnahme von DNS kompetent gemacht. Dies erfolgte mit Hilfe einer CaCl_2 -Behandlung (6.1., Lösung 1 und 2). Durch dieses Verfahren erlangen die Zellen durch einen im Detail noch nicht bekannten Mechanismus die Kompetenz, Fremd-DNS zu erkennen und deren Aufnahme in die Zelle und Integration durch Rekombination in das Genom zu ermöglichen. Transformationen wurden in dieser Arbeit insbesondere mit den *E. coli*-Stämmen JM109, Top10F und BJ5183 durchgeführt. Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde in 500 ml LB-Medium gegeben und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm überprüft (Spectrophotometer Uvikon 922, Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz). Nach Erreichen einer OD 578 von 0,5 (nach 3 bis 4 Stunden) wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min ($2,000 \times g$, 4°C) zentrifugiert (Centrikon Typ T-124, Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz). Das Bakteriensediment wurde mit 100 ml Lösung 1 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 ml Lösung 2 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen für 10 min ($1,800 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml (Lösung 2 + 10 % sterilem Glycerin) resuspendiert und in Aliquots von 200 μl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Hitzeschocktransformation in kompetente Bakterienzellen.

3.2.2. Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNS in kompetente Bakterienzellen

5-10 ng einer gereinigten Plasmid-DNS bzw. 2-5 μl eines Ligationsansatzes wurden in 100 μl kompetente Zellen durch Hitzeschock nach einem Standardprotokoll transformiert (Sambrook et al. 1989). Gemäß Protokoll wurde 1 μl DNS auf 50 μl der Bakterien gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 45 s in einem 42°C heißen Wasserbad. Nach an-

schließender Zugabe von 200 µl LB-Medium und einstündiger Schüttelinkubation (220 rpm) bei 37°C konnten die transformierten Bakterienzellen auf Agarplatten, die das Antibiotikum der jeweiligen Plasmidresistenz enthielten (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin oder 10 µg/ml Tetracyclin), ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Eine Aufbewahrung der Agarplatten bei 4°C war für eine weitere Verwendung möglich. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die jeweils verwendeten Plasmide und Bakterien sowie über die bestehenden Resistenzen.

| Plasmid-DNS | <i>E. coli</i> | Resistenz |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------|
| pBluescript- <i>CASQ2</i> -WT/I161V | JM109 | Ampicillin |
| pAlter- <i>CASQ2</i> -WT/I161V | TOP10F | Tetracyclin |
| pAdTrack- <i>CASQ2</i> -WT/I161V | BJ5183 | Kanamycin |

Tab. 1: Plasmide, *E. coli*-Stämme, Resistenzen

3.2.3. Herstellung von bakteriellen Glycerol-Stocks

4 ml aus einer Bakterienübernachtskultur (5 ml LB-Medium + 5 µl aus einer Plasmidpräparation + entsprechendes Antibiotikum) wurden in ein steriles 2 ml-Eppendorfgefäß überführt, wobei nach Zentrifugation bei 15,800 x g und RT für 1-2 min der Überstand jeweils vorsichtig abgenommen und verworfen wurde. Das Pellet wurde daraufhin mit 1 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Glycerol erfolgte die Durchmischung der Suspension mithilfe einer Pipette und das anschließende Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.4. Plasmid-DNS-Präparation

Um Plasmide aus transformierten Bakterien (3.2.2.) präparativ zu isolieren, erfolgte die analytische Plasmidisolierung (Minipräparation) für eine Plasmidmenge bis ca. 25 µg bzw. mit einem Volumen von 2-5 ml. Die präparative Plasmidisolierung (Maxipräparation) erfolgte für größere Mengen von Plasmiden bis 1 mg oder mit einem Volumen von 500 ml bis 2 l.

3.2.4.1. Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation)

Minipräparationen wurden mit dem „Wizard Plus Minipreps DNS Purification System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Aus Bakterienübernachtskulturen von 2 bis 5 ml Volumen wurden die Plasmide durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim et al. 1979). Die abzentrifugierten Bakterienzellen wurden mit 500 µl Puffer P1 (6.1., Resuspensionspuffer 1 + RNase) gewaschen. Der Zellrückstand wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 (6.1., Lysispuffer) vollständig lysiert. Durch diese alkalische Lyse in Anwesenheit von SDS werden Bakterienproteine zerstört und chromosomale Bakterien-DNS denaturiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P3 (6.1., Neutralisationspuffer) wurde die Lösung anschließend neutralisiert. Neutralisationspuffer beinhaltet neben Essigsäure Kaliumacetat. Durch die Anwesenheit von Essigsäure (pH-Shift) kommt es zu einer raschen Hybridisierung von Plasmid-DNS, während größere chromosomale DNS einzelsträngig bleibt und zusammen mit SDS als wasserunlösliches Kalium-SDS in Form eines weißen, flockigen Niederschlags ausfällt. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurde der weiße Niederschlag durch Zentrifugation (15,800 x g, 4°C, 15 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wurde die DNS mit 0,7 Volumenanteilen 100 %igem Isopropanol ausgefällt und für 30 min zentrifugiert (13,600 x g, 4°C). Das Sediment wurde mit 70 %igem Ethanol (4°C) gewaschen und unter Vakuum (SpeedVac® Plus AR, SC110 AR, Life Sciences International, Frankfurt) bei RT getrocknet. Die getrocknete DNS wurde in sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei –20°C gelagert.

3.2.4.2. Präparative Plasmidisolierung (Maxipräparation)

Aus Bakterienübernachtskulturen mit einem Volumen von 500 ml bis 2 l wurden die Plasmide mithilfe des „Plasmid Maxi Kit 25“ (Qiagen) über Qiatip 500-Säulen nach Anweisung des Herstellers isoliert. Ein 1 l-Ansatz wurde für 15 min (2,500 x g, 4°C) zentrifugiert. Die abzentrifugierten Bakterien wurden, analog zur analytischen Plasmidisolierung (3.2.4.1.), in 40 ml Puffer 1 resuspendiert, anschließend mit 40 ml Puffer 2 im Rahmen einer 15-minütigen Inkubation bei RT alkalisch lysiert. Hiernach erfolgte die Neutralisation der Lösung mit 40 ml Puffer 3. Durch mehrfaches vorsichtiges Schütteln im Rahmen einer insgesamt 30-minü-

tigen Inkubation auf Eis konnten denaturierte Proteine als weißer, flockiger Niederschlag identifiziert werden. Die gefällten Proteine wurden bei 12,000 x g für 30 min (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals bei 12,000 x g (4°C, 15 min) zentrifugiert, um jeglichen Niederschlag zu entfernen. Der klare Überstand wurde auf zwei mit Puffer QBT äquilibrierte Qiatip 500-Säulen gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNS mit je 15 ml aufgekochtem Puffer QF eluiert. Die Verwendung von heißem Elutionspuffer erhöht hierbei die Quantität der Elution. Die Eluate wurden vereinigt, die DNS mit 70 %igem Isopropanol bei -20°C ausgefällt und schließlich mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Trocknen erfolgte bei 37°C im Heizblock (Thermomixer, Modell 5436, Eppendorf AG, Hamburg); die DNS konnte danach in 150 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert werden.

3.2.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte photometrisch (Uvicon 922, Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz) durch Messung der Extinktion von DNS-haltigen Lösungen bei 260 nm. Dabei entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg DNS/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der DNS wurde gleichzeitig die OD bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet. Der Quotient reiner DNS sollte zwischen 1,6 und 1,9 liegen.

3.2.6. Analytischer Restriktionsverdau

Die Analyse von Plasmidpräparationen erfolgte durch Verdau der DNS mit geeigneten Restriktionsendonukleasen. Restriktionsendonukleasen sind aus Bakterien isolierte Enzyme, die DNS an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Hierdurch entstehen DNS-Fragmente spezifischer Größe, die nach Gelelektrophorese in einem Agarosegel (3.2.8.3.) sichtbar gemacht und analysiert werden können. Der Restriktionsansatz (1 µl Restriktionsendonuklease + 10 x Restriktionspuffer + 100-200 ng DNS) wurde hierfür in einem Gesamtvolumen von 20 µl (auffüllen mit Aqua bidest) für 4-5 h bei 37°C inkubiert, danach mit 2 µl eines 10 x Ladepuffers versehen und der Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8.3.) bei 100 V zugeführt. Tab. 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer (www.promega.com).

| Restriktionsendonukleasen | Puffer |
|----------------------------------|---------------|
| BamHI | Puffer E |
| BglII | Puffer D |
| EcoRI | Puffer H |
| EcoRV | Puffer D |
| KpnI | Puffer J |
| NdeI | Puffer D |
| NotI | Puffer D |
| PmeI | Puffer 4 |
| PacI | Puffer J |
| PstI | Puffer H |
| SmaI | Puffer J |
| XbaI | Puffer D |

Tab. 2: Restriktionsendonukleasen und Puffer
(www.promega.com)

3.2.7. Präparativer Restriktionsverdau

Neben der Anwendung des Restriktionsverdau zur Analyse von DNS-Fragmenten (3.2.6.) kann mit diesem Verfahren die Gewinnung von linearisierten Plasmidvektoren bzw. Genabschnitten aus Plasmidkonstrukten z.B. für Klonierungszwecke (3.2.8.) ermöglicht werden. Sämtliche DNS-Spaltungen im Sinne eines solchen präparativen Restriktionsverdau wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Enzym-Herstellers durchgeführt (vgl. Tab. 2). Ebenso wurden alle Puffer und Lösungen gemäß Vorgabe der Hersteller verwendet, um jeweils optimale Reaktionsbedingungen gewährleisten zu können.

3.2.8. Klonierung von DNS

DNS-Fragmente mit einer Größe bis ca. 20 kb lassen sich mit Hilfe von sog. Vektoren in Bakterienzellen einfügen. Hierzu wird das zu klonierende DNS-Fragment zunächst mit ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt. Auch der Vektor, in den ein DNS-Fragment eingebracht werden soll, muss mit diesen Restriktionsenzymen behandelt werden, so dass zueinander passende Enden erzeugt werden. Die hier verwendeten Vektoren (Tab. 3), in die die geschnittenen Fragmente ein-

gebracht wurden, besitzen in der Regel eine Größe von ca. 3000-9000 bp und sind noch mit dem für die Selektion notwendigen antibiotischen Resistenzgen sowie einem Replikationsursprung für ihre Vermehrung ausgestattet. Die zur Erleichterung der Klonierungen vorhandene, künstlich eingefügte multiple Klonierungsstelle enthält eine Reihe sogenannter singularer Restriktionsschnittstellen, was bedeutet, dass das Plasmid von Restriktionsenzymen, die an dieser Stelle eine Erkennungssequenz besitzen, ausschließlich geschnitten werden können. Das DNS-Fragment kann dann durch Ligation mit Hilfe einer T4-DNS-Ligase in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und ATP in den Vektor eingefügt werden (3.2.8.2.). Dabei katalysiert die Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den freien Enden des DNS-Fragments und des Vektors. Die Klonierungen erfolgten weitestgehend nach Standardmethoden von Maniatis (1989).

| Vektor | Größe | Beschreibung | Resistenzen | Herkunft |
|-------------------|--------------|---|--------------------|-----------------------|
| pAlter | 5676 bp | Plasmidvektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten | Tetracyclin | Promega, Mannheim |
| pBluescript II KS | 3000 bp | Plasmidvektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten | Ampicillin | Stratagene, Amsterdam |
| pAdTrack-CMV | 9000 bp | Plasmidvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren | Kanamycin | B.Vogelstein, 1998 |
| pAd Easy | 35k bp | adenoviraler Vektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren (He et al. 1998) | Ampicillin | B.Vogelstein, 1998 |

Tab. 3: Vektoren, Größe, Beschreibung, Resistenzen, Herkunft

3.2.8.1. Dephosphorylierung von 5`-Vektorenden

Um die Religation eines Vektors mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde die geschnittene DNS mit alkalischer Phosphatase (AP) aus Kälberdarm behandelt. Die AP spaltet die nach einem Restriktionsverdau verbleibenden Phosphatreste am 5`-Ende der DNS ab, somit ist eine Religation der Vektorenden nicht mehr möglich. Das einzubauende Fragment besitzt diese Phosphatreste jedoch noch, so dass eine Ligation zwischen Fragment und Vektor möglich ist. Zur Dephosphorylierung der 5`-Vektorenden wurde der Restriktionsansatz für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und auf RT abgekühlt. Die Dephosphorylierung erfolgte mit 1 µl AP (Roche) pro 7,5 µg DNS in 1 x AP-Puffer für 30 min bei 37°C. Nach Hitzeinaktivierung (15 min bei 70°C) erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8.3.).

3.2.8.2. Ligation

Der Ligationsansatz bestand aus linearisiertem Vektor, einzubauendem DNS-Fragment, 10 Weiss-Einheiten T4-DNS-Ligase (Promega) sowie 10 x Ligationspuffer, wobei das zu klonierende Fragment in einem 3-5-fachen Überschuss zum linearisierten Vektor eingesetzt wurde. Die Ligation erfolgte für 6-8 h bei 4°C oder über Nacht bei 16°C.

3.2.8.3. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe in 0,3-2,0 %igen Agarosegelen durch horizontale Elektrophorese in einer Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) aufgetrennt werden, wobei die Gelkonzentration dabei den Trennbereich bestimmt, so dass lineare DNS-Fragmente von 0,1 kb bis 20 kb getrennt werden können (je größer das Fragment, desto geringer sollte die Gelkonzentration gewählt werden). Je nach gewünschtem Trennbereich wurde die entsprechende Menge Agarose in 50 ml TAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Um die DNS später durch Bestrahlung mit UV-Licht (Kamera: Olympus GmbH, Hamburg; UV-Lichtanlage: Docu Gel-V8A400, MWG-Biotech, Ebersberg) sichtbar zu machen, wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) hinzugegeben. Die Proben wurden in einem 10 x Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNS im Gel erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 4 mA/cm bzw. 100 V.

3.2.8.4. Isolierung von DNS aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung der Restriktionsansätze erfolgte die sog. präparative Agarose-Gelelektrophorese. Nach der Gelextraktion, bei der das gewünschte DNS-Fragment sorgfältig unter einer UV-Quelle aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten wurde, erfolgte die Aufreinigung der DNS mittels „Invisorb Gel Extraction Kit 50“ (Invitex). Hierbei wird zur Isolation der DNS aus Agarosegelen ein Silica-Material verwendet. Das Silica-Material bindet DNS in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Anschließend kann die DNS nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden (Vogelstein et al. 1979). Der DNS-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt, die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C .

3.2.8.5. Kontrolle von Plasmidkonstrukten mittels Sequenzierung

Die Identität neu erzeugter Plasmidkonstrukte (pBluescript-*CASQ2*-cDNS, pAd-Track-*CASQ2*-cDNS, pAd-Easy-*CASQ2*-cDNS) wurde durch Sequenzierung der DNS bei der Firma GATC Biotech in Konstanz überprüft. Geeignete Sequenzierungsprimer wurden hierfür mit Hilfe des Programms OMIGA (Oxford Molecular, Madison, USA) ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 4 aufgeführt.

| Primername | Sequenz (5` - 3`) | nachgewiesenes Konstrukt |
|-----------------------------------|-----------------------|--|
| CSQ-NThum657 SEQ-REV (Rev.) | TGGCTCATAGAAGTCAACCTC | <i>CASQ2</i> -WT/ <i>CASQ2</i> -I161V |
| CSQ-NThum417SEQ (Fwd.) | GGATCTAATTGAAGACCCAGT | <i>CASQ2</i> -WT/ <i>CASQ2</i> -I161V |
| CSQ-SEQ-P5 (Fwd.) | CTCTTGAAAAAGCCAATGAG | <i>CASQ2</i> -WT/ <i>CASQ2</i> -I161V |

Tab. 4: Primer, Sequenz (5`-3`) und nachgewiesenes Konstrukt. Rev.: Reverse-Primer (3`-5`); Fwd.: Forward-Primer (5`-3`)

3.2.9. Durchführung einer gerichteten Mutagenese

Durch eine gerichtete Mutagenese ist es möglich, einzelne Nukleotide in einer DNS gezielt auszutauschen. Hierdurch kann ein veränderter Aminosäurecode mit einer veränderten Aminosäure in dieser DNS entstehen, wodurch wiederum ein verändertes (mutiertes) Protein translatiert wird. Die gerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit an humanem *CASQ2* durchgeführt, wobei die cDNS des *CASQ2* aus dem linken Ventrikel eines gesunden Spenderherzens (28jähriger männlicher Donor) stammte (BioChain Institute Inc., Hayward, CA, USA). Für die gerichtete Mutagenese stand das „Altered sites® II *in vitro* Mutagenesis System“ (Promega) zur Verfügung, mit dem alle Plasmide, die ein Ampicillin- oder Tetrazyclin-Resistenzgen enthalten, mutiert werden können. Die *CASQ2*-cDNS wurde zunächst in den pAlter-Vektor einkloniert, der sowohl eine Tetrazyclin-Resistenz als auch eine inaktivierte Ampicillin-Resistenz besitzt. Im Rahmen der Mutagenesereaktion wird die Tetrazyclin-Resistenz durch eine Ampicillin-Resistenz ersetzt. Die für die Mutagenesereaktion erforderliche initiale Einzelstranggewinnung (ss; Vieira und Messing, 1987) des doppelsträngigen pAlter-*CASQ2*-Plasmids erfolgte mittels Infektion von Helfer-Phagen (R408, Promega). Durch Verwendung zweier Oligonukleotide, die sowohl eine neue Ampicillin-Resistenz als auch das mutierte Nukleotid besaßen, wurden diese mit der Einzelstrangmatrix in Verbindung gebracht (Annealing). Durch diese Versuchsanordnung entstand nach Strangsynthese und Ligation ein komplementärer Strang, der die Mutation und die neue Ampicillin-Resistenz enthielt. Eine Selektion der mutierten Klone wurde über die neue Antibiotikaresistenz erreicht. Die folgende Abb. 9 zeigt eine schematische Veranschaulichung zum Prinzip der gerichteten Mutagenese.

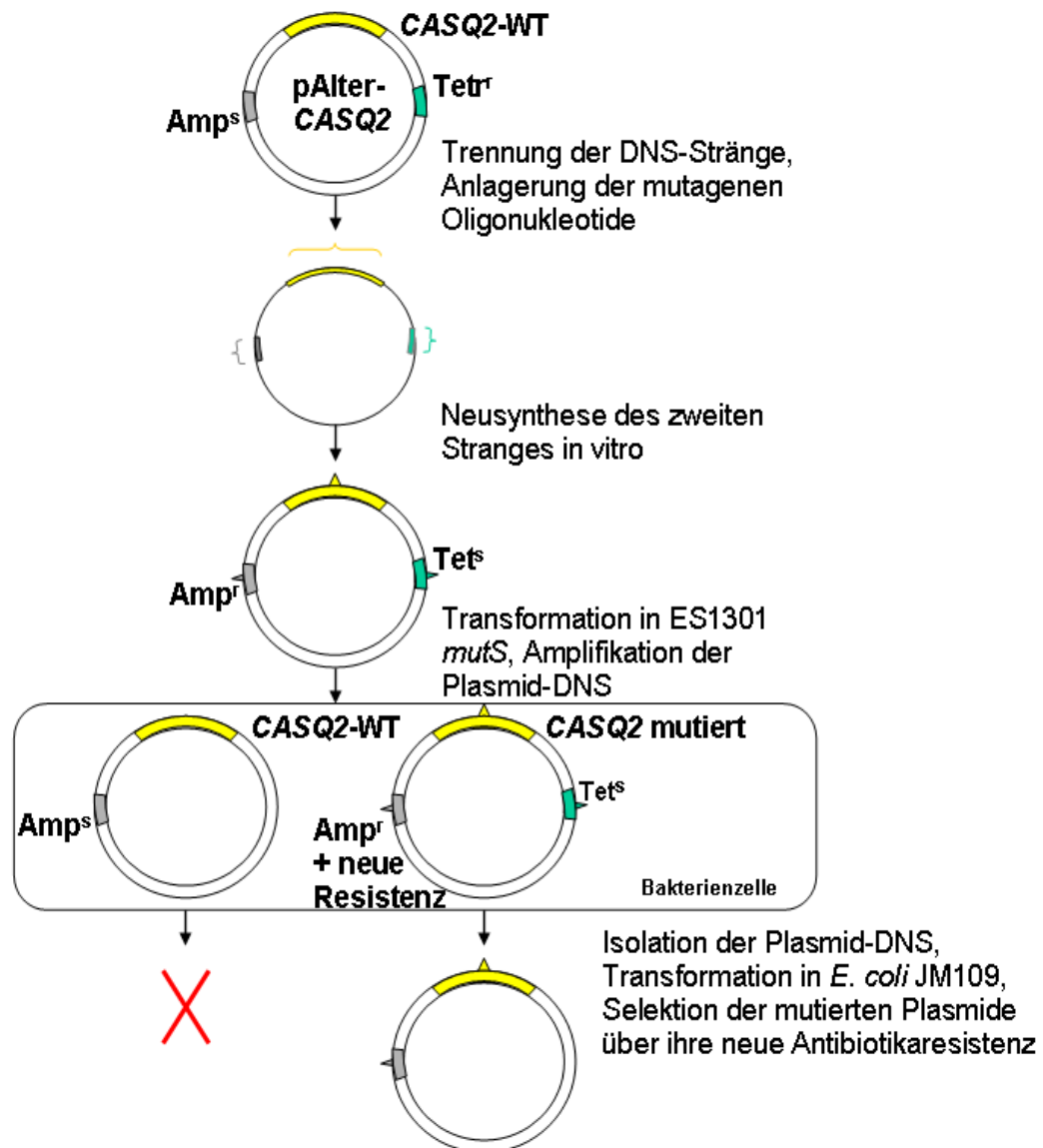


Abb. 9: Schematische Darstellung zur Durchführung einer gerichteten Mutagenese

Nach Einzelstrangsynthese des zu mutierenden Plasmids (pAlter-*CASQ2*) und Anlagerung der mutagenen Oligonukleotide erfolgt die Neusynthese des zweiten DNS-Stranges. Hierbei wird das Fremdgen (*CASQ2*) und die Tetrazyklin (Tetr^r)- bzw. Ampicillin (Amp^r)-Resistenz verändert. Über die neue Antibiotikaresistenz erfolgt die Selektion der mutierten Plasmide. Amp^s/Tetr^s: Ampicillin/Tetracyclin-Sensibilität

In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Arbeitsschritte der gerichteten Mutagenese chronologisch aufgeführt:

3.2.9.1 Klonierung von *CASQ2* in den pAlter-Vektor

Die kodierende Plasmid-Sequenz von *CASQ2*-WT sowie der pAlter-Vektor wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen XbaI (5'-Ende) und PstI (3'-Ende) geschnitten. Gemäß Herstellerangaben erfolgte der Verdau nacheinander. Die verdauten Plasmide wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8.3.) aufgetrennt und die DNS aus dem Gel extrahiert (3.2.8.4.). Das geschnittene *CASQ2* wurde in die Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAlter durch Ligation einkloniert (3.2.8.2.) und in kompetente *E. coli* JM109 transformiert (3.2.9.8.). Die DNS einzelner Klone wurde mittels Restriktionsverdau analysiert (3.2.6.).

3.2.9.2. Einzelstranggewinnung der doppelsträngigen pAlter-*CASQ2*-WT-cDNS

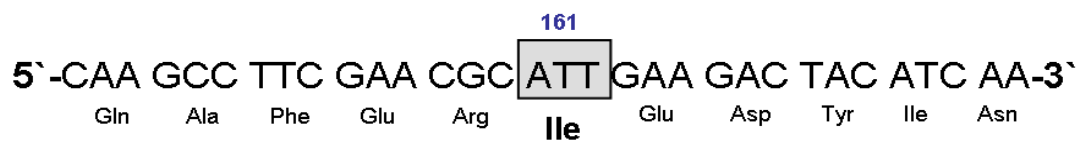
Durch Infektion mit Helferphagen R408 und unter Verwendung eines DNS-Reinigungskits für M13-Phagen ("QIAprep™ M13-System", Qiagen) wurde die einzelsträngige DNS (ss-DNS) gewonnen. 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur von pAlter-*CASQ2*-WT wurden in 25 ml LB-Medium gegeben, mit Ampicillin versehen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach folgte die Infektion mit 500 µl Helferphagen bei 37°C über 9 h (bis zum Erreichen einer OD von 0,9). Die Zellsuspension wurde anschließend 2 x zentrifugiert (12,000 x g, 15 min), der Überstand mit jeweils 0,25 Volumenanteilen Präzipitationspuffer versetzt und die Phagen über Nacht auf Eis präzipitiert. Das aus 15-minütiger Zentrifugation bei 12,000 x g resultierende Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer aufgenommen und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, um die Phagen-DNS zu isolieren. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren (12,000 x g, 5 min) erfolgte die zweimalige Extraktion der oberen wässrigen Phase mit jeweils 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Nach Zugabe von 200 µl 7,5 M Ammoniumacetat (Merck) und 1200 µl 100 % Ethanol zur oberen wässrigen Phase (Präzipitation der Einzelstrang-DNS) wurde der Ansatz für 30 min bei -20°C gekühlt und dann erneut zentrifugiert (12,000 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde schließlich mit 70

%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die DNS-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8.3.) überprüft.

3.2.9.3. Konstruktion des mutagenen Oligonukleotids

Das mutierte Oligonukleotid enthielt jenseits der mutierten Basen 12-15 komplementäre Basen, wobei das Oligonukleotid zunächst am 5`-Ende phosphoryliert wurde. 100 pmol des Oligonukleotids wurden mit 2,5 µl 10 x Kinase-Puffer, 5 U T4-Polynukleotid-Kinase und 2,5 µl 10 mM ATP versetzt und in 25 µl Gesamtvolumen für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Polynukleotid-Kinase erfolgte anschließend für 10 min bei 70°C. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 10 die Nukleotidsequenzen von nicht-mutiertem und mutiertem *CASQ2*-Oligonukleotid.

Nicht-mutiertes *CASQ2*:



Mutiertes *CASQ2*:



Abb. 10: Nicht-mutiertes und mutiertes *CASQ2*-Oligonukleotid

Im Rahmen der Konstruktion des mutagenen *CASQ2*-Oligonukleotids erfolgte ein Austausch der Base Adenin an Position 481 des *CASQ2* durch die Base Guanin. Hierdurch konnte die an Position 161 des *CASQ2* vorkommende physiologische Aminosäure Isoleucin (Ile, Nukleotidcode: ATT) durch die Aminosäure Valin (Val, Nukleotidcode: GTT) ersetzt und die Mutation I161V hergestellt werden.

3.2.9.4. Mutagenese-Reaktion

10 µl der Einzelstrang-DNS, 25 pmol Mutagenese-Oligonukleotid sowie 0,25 pmol Selektions-Oligonukleotid (Ampicillin-Resistenz) wurden in 1 x Annealingpuffer (Promega) in einem PCR-Gerät (Mastercycler gradient, Eppendorf AG,

Hamburg) für 1 min auf 95°C erhitzt, danach schnell auf 75°C abgekühlt und anschließend mit 1°C/min auf 37°C heruntergekühlt. Zur Optimierung der Annealingwahrscheinlichkeit schloß sich zuletzt eine 5-minütige Inkubation bei 37°C an.

3.2.9.5. Strangsynthese und Ligation

Unter Verwendung von 1 x Synthesepuffer (Promega), 5 U T4-DNS-Polymerase (Promega) und 1 U T4-DNS-Ligase (Promega) wurde bei 37°C für 90 min ein Zweitstrang synthetisiert, der die potentielle Mutation enthielt.

3.2.9.6. Transformation in ES1301-*E. coli*

Mit 3 µl Reaktionsprodukt wurden 100 µl kompetente ES1301-*E. coli* des Stammes mutS gemäß Herstellerprotokoll hitzeschocktransformiert. Die *E. coli* mutS-Bakterien besitzen kein funktionierendes „DNS mismatch repair“-System (Zell und Fritz, 1987) und waren somit nicht in der Lage, den neu synthetisierten Strang zu reparieren. Der Transformationsansatz wurde in 4 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 230 rpm und 37°C inkubiert.

3.2.9.7. Präparation der Plasmid-DNS aus ES1301 mutS-Zellen

4 ml der Übernachtskultur wurden mit Hilfe des „Wizard Plus DNA purification Kits“ aufgearbeitet. Die Elution erfolgte mit 50 µl bidestilliertem Wasser.

3.2.9.8. Transformation in kompetente *E. coli* JM109

5-10 ng der Plasmid-Präparation wurden in 100 µl *E. coli* JM109 nach Standardprotokoll hitzeschocktransformiert (3.2.2.). Auf LB-Agarplatten, die Ampicillin enthielten, erfolgte die Selektion der potentiell positiven Klone. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Plasmid-DNS einiger Klone (5 ml Übernachtskultur) mit einem Aufreinigungskit (Promega) isoliert.

3.2.9.9. Nachweis positiver Klone mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung

Durch automatische Sequenzierung (3.2.8.5.) etwaiger Klone erfolgte der Nachweis einer erfolgreichen Mutagenese.

3.3. Das adenovirale Expressionssystem (AdEasy-System)

Beim AdEasy-System nach He et al. (1998) handelt es sich um ein einfaches System zur Erzeugung rekombinanter Adenoviren, wobei die rekombinationsfähigen Adenoviren zum Serotyp 5 (Ad5), einer Gruppe nicht-onkogener Adenoviren, gehören. Ihre doppelsträngige, lineare DNS mit einer Länge von ca. 35 kb ist durch Deletion der Genabschnitte $\Delta E1$ und $\Delta E3$ *in vivo* nicht replikationsfähig. *In vitro* allerdings ist die $\Delta E1$ -Region nicht nur an der Initiation der Aufnahme eines zu rekombinierenden Plasmids beteiligt, sondern auch für den Zusammenbau infektiöser Viruspartikel essentiell. Das Vorhandensein der $\Delta E3$ -Region, die es dem Adenovirus *in vivo* ermöglicht, den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entkommen, ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht erforderlich. Im Gegenteil, die Deletion dieser $\Delta E3$ -Region ermöglicht *in vitro* die Aufnahme von Fremdgenen bis zu 7,5 kb (Benihoud et al. 1999). Eine Vermehrung der Viren ist aufgrund dieser Tatsachen nur in Zelllinien, wie z.B. HEK-Zellen möglich, welche die deletierten Gene $\Delta E1$ und $\Delta E3$ stattdessen exprimieren und das Virusgenom daher komplettieren können (Graham et al. 1973).

Da die direkte Einklonierung eines Fremdgens (*CASQ2*) in den AdEasy-1-Vektor (pAdEasy-1) aufgrund sowohl fehlender singulärer Schnittstellen als auch der Größe der DNS (35 kb) schwierig ist, wurde die kodierende Sequenz des zu exprimierenden *CASQ2* zunächst in die multiple Klonierstelle des Rekombinationsplasmids pAdTrack-CMV (9220 bp) eingebracht (3.3.1. ff.). Dieser Shuttle-Vektor enthält u.a. die Sequenz für ein EGFP-Reportergen (GFP), einem Protein der Qualle *Aequora victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert. Dies hat den Vorteil, dass das Genprodukt selbst ein fluoreszierender Farbstoff ist und hierüber entsprechend nachgewiesen werden kann (Nachweis der Transfektionseffizienz; vgl. 3.3.3.3.). Abb. 11 zeigt schematisch das aus pAdTrack-CMV und *CASQ2* resultierende Rekombinationsplasmid (pAdTrack-*CASQ2*), das durch einen Verdau mit PmeI linearisiert und zusammen mit pAdEasy-1, in den es zuvor über homologe Rekombination (Chartier et al. 1996) integriert worden war, in chemisch kompetente *E. coli* (BJ5183) mittels Hitzeschocktransformation kotransfiziert wurde.

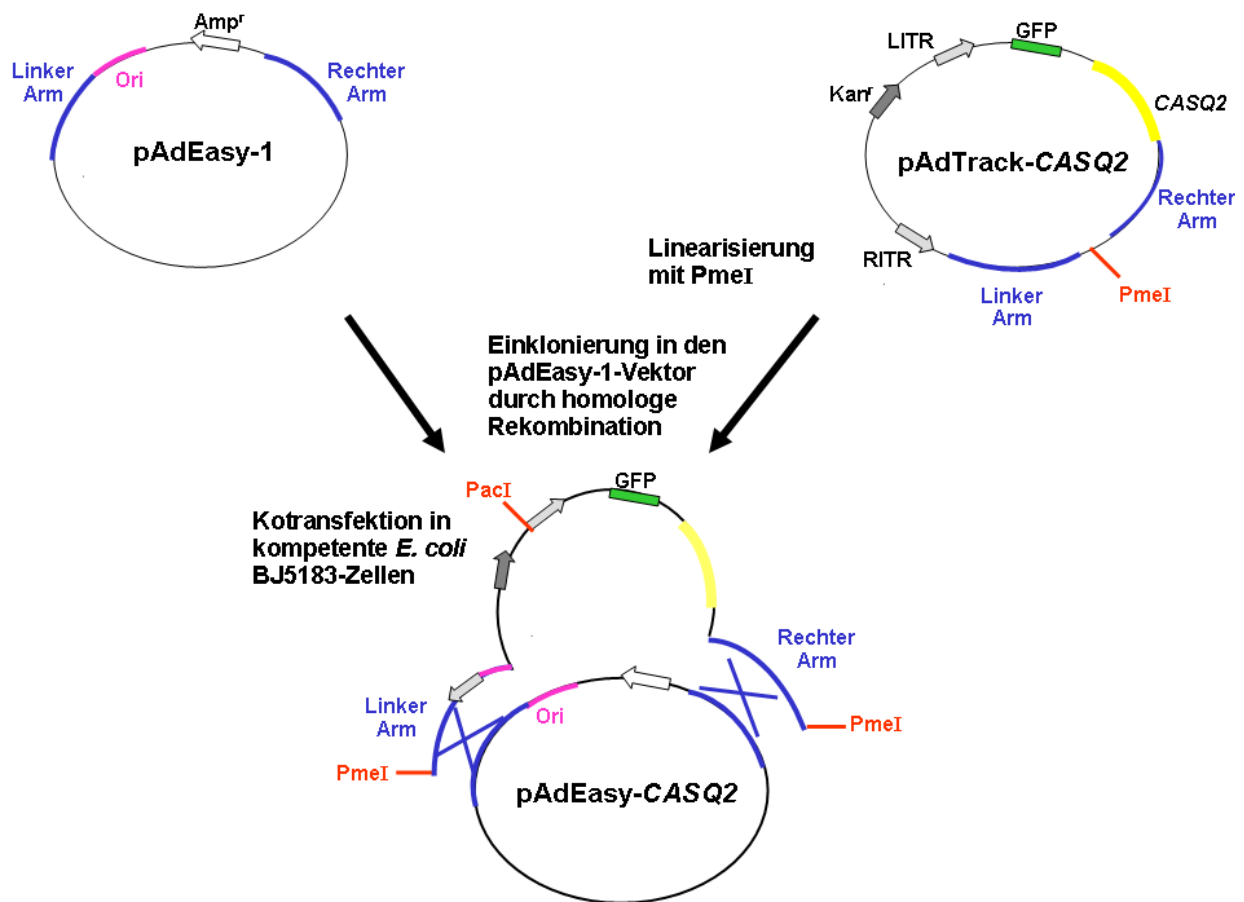


Abb. 11: Einklonierung von pAdTrack-CASQ2 in den pAdEasy-1-Vektor

Der rekombinante Shuttle-Vektor pAdTrack-CASQ2 wurde mit dem Restriktionsenzym *PmeI* linearisiert. Durch Rekombination homologer Bereiche (linker Arm und rechter Arm) des Shuttle-Vektors und der adenoviralen DNS (pAdEasy-1) mittels kompetenter *E. coli* BJ5183-Zellen wurde *CASQ2* in das Adenovirus-Genom eingefügt (pAd-Easy-CASQ2). GFP: EGFP-Reportergen; *Amp^r*: Ampicillin-Resistenz; *Kan^r*: Kanamycin-Resistenz; LITR: Linke, invertierte terminale Wiederholungssequenz; RITR: Rechte, invertierte terminale Wiederholungssequenz; *PacI*: Restriktionsenzym *PacI*; *CASQ2*: kodierende Sequenz des Calsequestrins; *Ori*: Replikationsursprung des pAdEasy-1-Vektors

Die rekombinante Adenovirus-DNS (pAdEasy-*CASQ2*) wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert. So konnte die rechte und linke invertierte terminale Wiederholungssequenz, die für die Amplifikation des Virus notwendig ist, zugänglich gemacht werden (vgl. Abb. 11). Die linearisierte DNS wurde in HEK293-Zellen transfiziert (3.3.3.ff.). Diese sind in der Lage, die deletierten Genprodukte $\Delta E1$ und $\Delta E3$ zu ergänzen, wodurch schließlich die rekombinanten Adenoviren erzeugt werden. Die folgende Abb. 12 zeigt schematisch die Struktur der rekombinanten Adenoviren nach Linearisierung mit *PacI* anhand sog. Expressionskassetten.

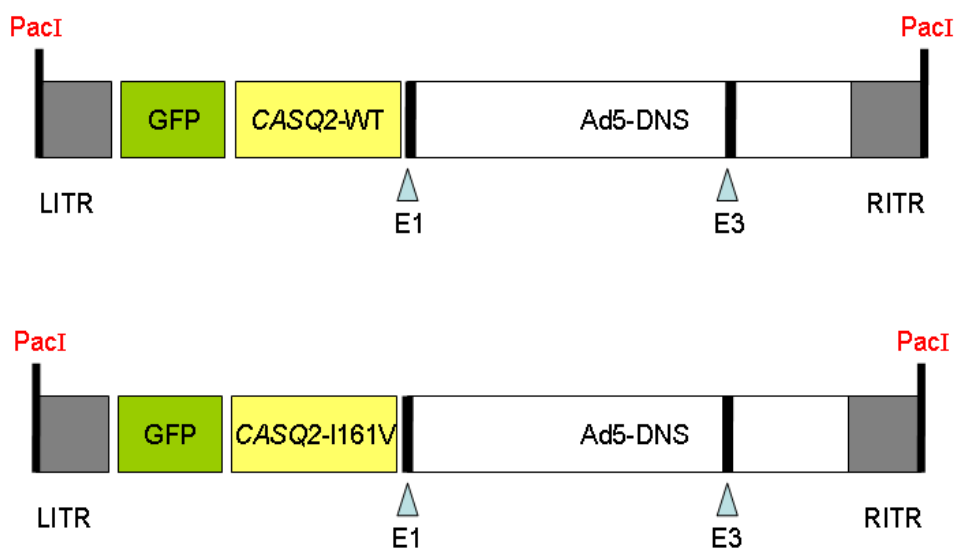


Abb. 12: Expressionskassetten der rekombinanten Adenoviren nach Linearisierung mit *PacI*

Dargestellt sind die Expressionskassetten der rekombinanten Adenoviren nach Integration der kodierenden Sequenz von *CASQ2-WT* sowie *CASQ2-I161V*. Durch Linearisierung mit *PacI* wurden die linken und rechten invertierten, terminalen Wiederholungssequenzen (LITR, RITR) freigesetzt. Diese gewährleisten die Infektiosität der Adenoviren. Die dargestellten Expressionskassetten wurden in humane embryonale Nierenzellen transfiziert. Dabei wurden die Genprodukte deletierter adenoviraler Gene ($\Delta E1$, $\Delta E3$) komplettiert und es entstanden die infektiösen, aber replikationsdefizienten rekombinanten Adenoviren. Das integrierte EGFP-Reportergen (GFP) diente hierbei dem Nachweis der Transfektionseffizienz. Ad5-DNS: viruseigene DNS

Im folgenden Abschnitt sind die einzelnen Arbeitsschritte der Herstellung rekombinanter Adenoviren chronologisch aufgeführt:

3.3.1. Klonierungsstrategie

Die folgende Abb. 13 zeigt eine schematische Übersicht zur Klonierungsstrategie, die das Einbringen von *CASQ2* in den pAdTrack-Vektor ermöglichte.

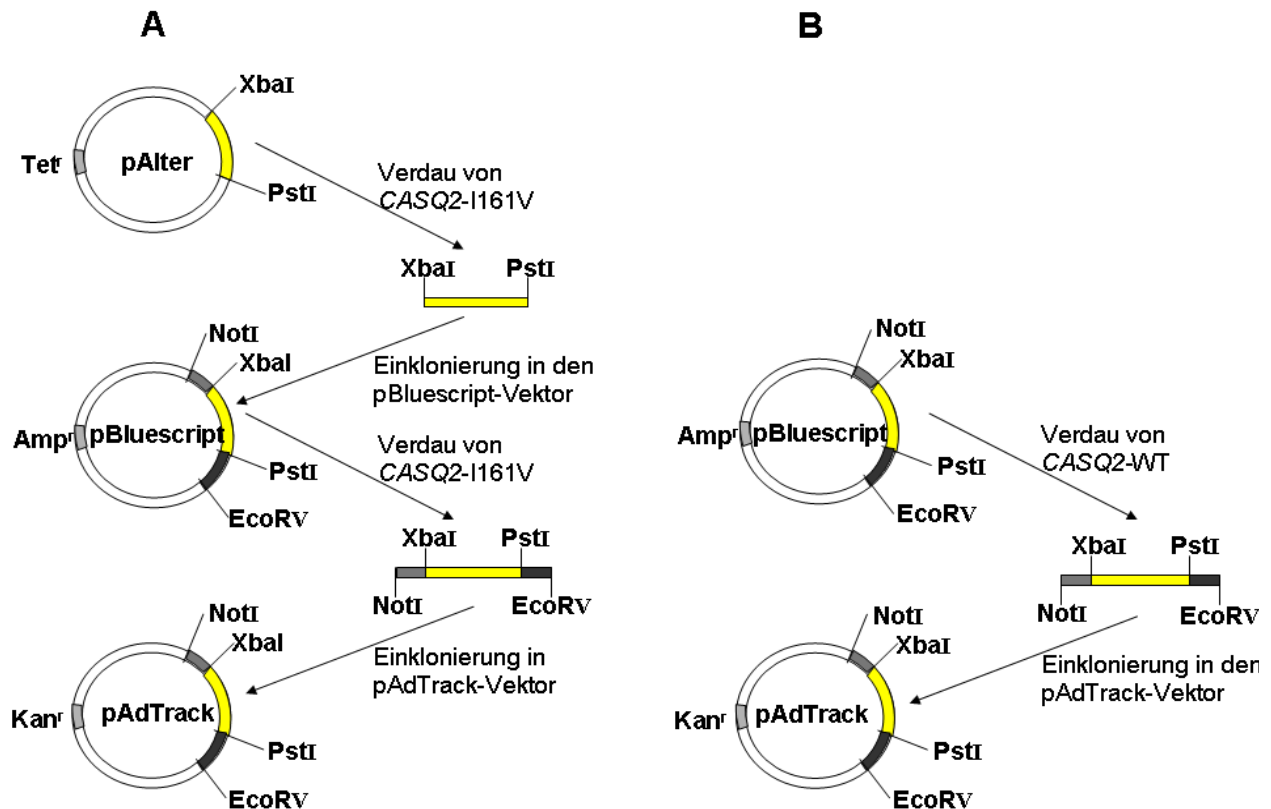


Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie

Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte im Rahmen der Klonierungen, wobei das Ziel darin bestand, die kodierenden Sequenzen von *CASQ2-I161V* (A) und *CASQ2-WT* (B) in den für die Generierung des Adenovirus wichtigen pAdTrack-Vektor einzubringen. Die Einklonierung des XbaI-PstI-Fragments von pAlter-*CASQ2-I161V* in pAdTrack erfolgte aufgrund fehlender geeigneter Schnittstellen über einen Umweg zunächst in den pBluescript-Vektor, der die geeigneten Schnittstellen NotI und EcoRV besaß. Die gelb dargestellten Flächen stellen die kodierenden Sequenzen von *CASQ2-WT* bzw. *CASQ2-I161V* dar. Amp^r: Ampicillin-Resistenz; Kan^r: Kanamycin-Resistenz; Tet^r: Tetracyclin-Resistenz; EcoRV, NotI, PstI, XbaI: Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme

3.3.1.1. Gewinnung des *CASQ2-I161V*-Fragments

Der Vektor pAlter-*CASQ2-I161V* sowie der pAlter-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI (5'-Ende) und PstI (3'-Ende) geschnitten. Die verdauten Plasmide wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8.3.) aufgetrennt und die cDNS aus dem Gel extrahiert (3.2.8.4.).

3.3.1.2. Umklonierung von *CASQ2-I161V* in pBluescript II KS

Da die direkte Einklonierung in den pAdTrack-Vektor aufgrund fehlender geeigneter Schnittstellen nicht möglich war, erfolgte die Umklonierung aus pAlter in pBluescript II KS. pBluescript wurde hierfür mithilfe der Restriktionsenzyme XbaI (5'-Ende) und PstI (3'-Ende) geschnitten. Das *CASQ2-I161V*-Fragment aus pAlter wurde in die Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pBluescript II KS durch Ligation einkloniert. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* JM109 (vgl. Tab. 1, S. 29) verwandt. Der analytische Restriktionsverdau der cDNS erfolgte mit NotI und EcoRV.

3.3.1.3. Umklonierung von *CASQ2-I161V* und *CASQ2-WT* aus pBluescript II KS in pAdTrack-CMV

Die kodierenden Plasmid-Sequenzen von *CASQ2-I161V* und *CASQ2-WT* sowie der pAdTrack-Vektor wurden jeweils mithilfe der Restriktionsenzyme NotI (5'-Ende) und EcoRV (3'-Ende) aus dem Transfervektor pBluescript II KS herausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV durch Ligation einkloniert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* Top 10F (vgl. Tab. 1, S. 29) durch Ligation, der analytische Restriktionsverdau der cDNS mit NotI und EcoRV.

3.3.2. Homologe Rekombination in kompetenten *E. coli* BJ5183-Zellen

Nach Einklonierung der kodierenden Sequenzen von *CASQ2-WT* und *CASQ2-I161V* in den pAdTrack-Vektor erfolgte die homologe Rekombination der pAdTrack-DNS mit der pAdEasy-DNS (vgl. Abb. 11, S. 42) mittels kompetenter *E. coli* BJ5183-Zellen (Stratagene). Da eine Elektroporation gemäß Herstellerprotokoll trotz diverser Versuche unter modifizierten Bedingungen und auch nach selbständiger Herstellung elektrokompenter BJ5183-Zellen (Stratagene-Standardprotokoll) nicht zu einer erfolgreichen homologen Rekombination führte,

wurde diese schließlich mittels selbst hergestellter chemisch kompetenter *E. coli* BJ5183-Zellen und Hitzeschocktransformation realisiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt:

3.3.2.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* BJ5183-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter BJ5183-Zellen erfolgte entsprechend dem in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Protokoll.

3.3.2.2. Maxipräparation von BJ5183-Klonen, pAdEasy-DNS und pAdTrack-DNS

Aus Bakterienübernachtskulturen mit einem Volumen von 500 ml wurden chemisch kompetente BJ5183-Klone, pAdEasy-DNS und pAdTrack-DNS (pAdTrack-CASQ2-WT/pAdTrack-CASQ2-I161V) jeweils mithilfe des „Plasmid Maxi Kit 25“ (Qiagen) über Qiatip 500-Säulen nach Anweisung des Herstellers präparativ isoliert (3.2.4.2). Die Kontrolle der Konstrukte erfolgte mittels analytischem Restriktionsverdau (3.2.6.).

3.3.2.3. Linearisierung der pAdTrack-DNS mit PmeI

Die Linearisierung der pAdTrack-DNS erfolgte unter Benutzung des Restriktionsenzym PmeI. Dazu wurden jeweils 30 µg der DNS zunächst für 2 h mit jeweils 20 U PmeI bei 37°C verdaut. Danach wurden nochmals 20 U PmeI zugegeben und für weitere 2 h verdaut. Eine Rekombination in BJ5183-Zellen kann nur erfolgen, wenn pAdTrack-CASQ2-WT/pAdTrack-CASQ2-I161V vollständig geschnitten sind. PmeI wurde hitzeinaktiviert; die linearisierte DNS wurde mit NaAc/Ethanol ausgefällt, in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm in einer Endkonzentration von 1,5 U/µl für 1,5 h bei 37°C dephosphoryliert. Die AP wurde für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Ein analytischer Restriktionsverdau diente der Kontrolle der linearisierten DNS.

3.3.2.4. Phenolextraktion

Die pAdTrack-DNS wurde durch eine Phenolextraktion gereinigt, um die Proteine des Restriktionsverdaus zu entfernen. Das Volumen der Ansätze wurde hierfür mit sterilem Wasser auf 200 µl erhöht. Anschließend wurden 200 µl gesättigtes

Phenol (pH 7,9) zugegeben. Dieses Gemisch wurde geschüttelt und für 5 min bei 15,800 x g (Tischzentrifuge Modell 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit 200 µl Chloroform/Ethanol (1:1) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 14,000 x g) wurde die obere Phase abgenommen und mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen der oberen Phase konnte die darin enthaltene DNS mittels NaAc/Ethanol-Fällung (3.3.3.2.) präzipitiert werden. Die DNS-Pellets wurden jeweils in insgesamt 60 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung des DNS-Gehaltes wurden die Proben auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel mit einem Massenstandard (MBI-Fermentas) verglichen.

3.3.2.5. Hitzeschocktransformation

Die Hitzeschocktransformation der pAdEasy-DNS mit der pAdTrack-DNS erfolgte mittels chemisch kompetenter *E. coli* BJ5183-Zellen (3.3.2.1.) nach dem in Abschnitt 3.2.2. beschriebenen Standardprotokoll (Sambrook et al. 1989). Für die Selektion auf LB-Agarplatten enthielt ein pAdEasy-Kontrollansatz 100 µg/ml Ampicillin, die restlichen Ansätze 50 µg/ml Kanamycin.

3.3.2.6. Selektion eines rekombinanten Klons

Von den LB-Agarplatten wurden 60-80 Klone gepickt. Diese wurden zur Selektion in 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt. Die Plasmid-DNS wurde präparativ isoliert und hiernach in 30 µl sterilem Aqua bidest aufgenommen. Der Nachweis von pAdEasy-CASQ2-WT und pAdEasy-CASQ2-I161V erfolgte nach Restriktionsverdau mit PacI mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese in einem 0,3 %igen Gel und Lambda-Größenstandard neben dem 1 kb-Standard. Die Auftrennung der DNS im Gel erfolgte in 1 x TAE-Puffer (6.1.) über 12-14 h bei einer Feldstärke von 30 V. Positive Klone wurden mithilfe präparativer Isolierung gewonnen und nach Restriktionsanalyse und Auftrennung im Agarosegel erneut überprüft.

3.3.2.7. Sequenzierung von pAdEasy-CASQ2-WT/pAdEasy-CASQ2-I161V

Zwecks endgültiger Sicherung der Identität der Konstrukte wurden die im Agarsiegel positiven Klone zwecks automatischer Sequenzierung an die Firma GATC Biotech in Konstanz gesandt. Die verwendeten Primer sind der Tab. 4 (S. 35) zu entnehmen.

3.3.3. Generierung des Virus in HEK293-Zellen

Die Generierung des Virus in HEK293-Zellen umfasste die folgenden Arbeitsschritte, die in chronologischer Reihenfolge aufgeführt sind:

3.3.3.1. Linearisierung der rekombinanten pAdEasy-DNS

Die rekombinante pAdEasy-DNS (pAdEasy-CASQ2-WT und pAdEasy-CASQ2-I161V) wurde mit PacI linearisiert. Dazu wurden jeweils 10 µg DNS mit 20 U PacI für 4 h bei 37°C geschnitten. Danach wurde das Enzym hitzeinaktiviert (80°C, 20 min).

3.3.3.2. NaAc/Ethanol-Präzipitation

Für die NaAc/Ethanol-Präzipitation zur Entfernung von Proteinen wurde zu der DNS 1/10 Volumenanteil einer 3 M Na-Acetat-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 3 Volumenanteilen eisgekühltem 100 %igem Ethanol wurden die Ansätze für 30 min bei -80°C inkubiert, wodurch die DNS-Präzipitation erfolgte. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 4°C und 14,000 x g. Hiernach wurde der Überstand verworfen und die DNS erneut, diesmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Zwischen den 3 Waschschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation für 10 min bei 14,000 x g und RT. Nach Verwerfung des Überstandes konnte die gefällte DNS in sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen werden. Der Gehalt wurde photometrisch ermittelt.

3.3.3.3. Transfektion

Zur Transfektion wurden jeweils 5 µg der linearisierten Vektoren pAdEasy-CASQ2-WT und pAdEasy-CASQ2-I161V in 150 µl DMEM (Sigma) vorgelegt und mit 30 µl Superfect (6 µg/µl; Qiagen) gemischt. Der Ansatz wurde zur Bildung von Mizellen für 10 min bei RT inkubiert. Durch die Mizellenbildung ist die DNS in der Lage,

die Zellmembran zu durchdringen und in die HEK-Zellen zu gelangen. Nach der Inkubation wurde zum Transfektionsansatz 1 ml HEK-Zellen-Medium gegeben. Diese Mischung wurde vorsichtig und tropfenweise mittels einer Pasteur-Pipette auf die in einer 25 cm²-Zellkulturflasche befindlichen und zu 70 % konfluenten HEK-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 5-6 ml HEK-Zellen-Medium zugegeben und der Ansatz im Brutschrank inkubiert. Nach 4-6 Tagen zeigten einige, mit pAdEasy-CASQ2-WT und mit pAdEasy-CASQ2-I161V transfizierte Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht eine grüne, durch das EGFP-Reportergen (GFP) hervorgerufene Fluoreszenz (vgl. 3.3.). Die Expression des GFP diente als Zeichen für eine erfolgreiche Transfektion, die erstens die korrekte Funktion eines der beiden CMV-Promotoren anzeigte und zweitens als Nachweis der Transfektionseffizienz diente.

3.3.3.4. Ernte der Zellen

Zum Zeitpunkt der Ernte (ca. 50 % der Zellen sind vom Boden gelöst) leuchteten einige Zellen unter UV-Licht grün. Die Zellen wurden im HEK-Zellen-Medium mit einer Pipette vom Boden abgelöst und bei 51 x g bei RT für 4 min abzentrifugiert (Zentrifuge Universal 16, Hettig/Heraeus Instruments AG, Zürich, Schweiz). Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS-Puffer (6.1.) gewaschen, rezentrifugiert und in 300 µl 100 mM HEPES, pH 7,4, resuspendiert. Das in HEPES-Puffer gelöste Zellpellet wurde insgesamt 4 x abwechselnd in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren und im Anschluss daran bei 37°C wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang wurden die HEK293-Zellen aufgebrochen und die Viren freigesetzt. Die lysierten Zellbestandteile wurden bei 91 x g für 4 min bei RT abzentrifugiert und der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert.

3.3.3.5. Erste Infektion

Eine 75 cm²-Schale mit zu 75 % konfluenten HEK293-Zellen wurde mit 50 µl des Überstandes der Transfektion infiziert. Die Infektion erfolgte in 2 ml DMEM + 20 µl Penicillin/Streptomycin (6.1.) ohne Serum für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden 20 ml HEK-Zellen-Medium hinzugegeben und die Schale bei 37°C inkubiert, bis erneut einige Zellen unter UV-Licht grün fluoreszierten (nach 4 bis 7 Tagen).

3.3.3.6. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung

Die Zellen der ersten Infektion wurden wie oben beschrieben geerntet. Zur Amplifikation wurden zu 75 % konfluente HEK293-Zellen in 185 cm²-Schalen mit je 10 µl Viruslösung (Ad5-*CASQ2*-WT/Ad5-*CASQ2*-I161V) der ersten Infektion infiziert. Bereits nach einem Tag fluoreszierten einige Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht. Die Zellen wurden geerntet, als ca. 80 % der Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigten. Die Zellen von vier infizierten 185 cm²-Schalen wurden in 1 ml 100 mM HEPES, pH 7,4, lysiert. Zur weiteren Vermehrung des Virus wurden zwanzig 185 cm²-Schalen mit je 5 µl des Überstandes der ersten Amplifikation infiziert. Nach 3 bis 5 Tagen leuchteten alle Zellen grün. Die Zellen wurden in 5 ml 100 mM HEPES, pH 7,4, lysiert und die Viruslösungen in 1 ml-Aliquots bei -80°C gelagert.

3.3.3.7. Vorbereitung und Infektion der Zellen zur Titerbestimmung

Je 10⁶ HEK293-Zellen wurden auf sechs 1,5-cm²-Kulturschalen (NUNC) ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Infektion wurde zunächst das alte Kulturmedium abgesaugt und 500 µl neues Kulturmedium pro Schale hinzugegeben. Jeweils 2, 5, 10, 25 und 50 µl der zu untersuchenden Viruslysate (Ad5-*CASQ2*-WT/Ad5-*CASQ2*-I161V) wurden zu einer 1,5-cm²-Schale hinzugegeben, wobei eine Schale nicht infiziert blieb und als Kontrolle diente. Anschließend wurde für 3 h inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml frischem Kulturmedium zu jeder Schale folgte eine weitere Inkubation von 72 h bei 37°C. Die Titerbestimmung erfolgte unter dem Mikroskop (Leica DMIL, Wetzlar).

3.3.3.8. Auswertung der Titerbestimmung

Die hier angewandte Methode der Titerbestimmung nutzte den zytotoxischen Effekt der Virusinfektion, der sich als Zelllyse darstellte. Nach 72 h Inkubationszeit entsprach diejenige Viruslysatkonzentration einer MOI (multiplicity of infection) von 10-20, bei der die Zellen vollständig abgelöst waren. Als Vergleich bzw. als Negativkontrolle diente die nicht-infizierte Schale. Hatten sich nach 72 h keine oder alle Zellen abgelöst, wurde die Titerbestimmung wiederholt, wobei die Viruslysatkonzentration pro Schale dementsprechend erhöht oder erniedrigt wurde.

3.3.3.9. Adenovirale Infektion von neonatalen Maus-Kardiomyozyten

Neonatale Maus-Kardiomyozyten wurden nach einem modifizierten Protokoll von Kliche et al. (2006) isoliert und kultiviert. Die anschließende Infektion der Maus-Kardiomyozyten mit den rekombinanten Adenoviren Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V erfolgte mit einer MOI von 25-200 in serumhaltigem Kulturmedium (6.1.). Die Ernte bzw. Weiterverarbeitung der Zellen zu Homogenaten (3.4.1.2.) erfolgte 48 h nach der Infektion.

3.4. Arbeiten mit Proteinen

3.4.1. Herstellung der Homogenate

3.4.1.1. Sf21-Insektenzellen

Die Herstellung der Homogenate aus Sf21-Insektenzellen erfolgte unter ständiger Kühlung auf Eis im Homogenisationspuffer (Histidin-Saccharose-Puffer, 6.1.) mit einem Ultraschallstab (VirSonic 60®, Virtis, New York, USA), womit durch eine dreimalige Homogenisierung für jeweils 10 s die Zerstörung der Zellmembranen erfolgte. Alle Proben wurden für ca. 10 s bei 15,800 x g und 4°C zentrifugiert und der dabei entstandene klare Überstand jeweils als Homogenat bezeichnet. Für die anschließende Proteinbestimmung wurde das Standardverfahren nach Lowry (1951) durchgeführt (3.4.2.).

3.4.1.2. Adenoviral-infizierte neonatale Maus-Kardiomyozyten

Die Herstellung der Homogenate aus infizierten neonatalen Maus-Kardiomyozyten erfolgte durch Waschen der Zellen in sterilem, kaltem PBS (6.1.) und Lyse im Homogenisationspuffer. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt, um anhaftende Adenoviren zu inaktivieren. Nicht gelöste Zellbestandteile wurden für dreimal 10 s mit einem Ultraschallstab homogenisiert und danach für 10 min bei 15,800 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (1951).

3.4.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in mit Histidin-Saccharose-Puffer aufgearbeiteten Proben gemäß Lowry-Standardprotokoll mit 0,1 mg Rinderse-
rumalbumin/ml Aqua bidest. Nach diesem Protokoll beruht ein erster Schritt auf der Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen Peptidbindungen des Proteins und Kupferionen mithilfe einer alkalischen Lösung. In einem zweiten Schritt kommt es nach zweifacher Kupferreduktion unter Einfluss von Folin-Ciocalteu Reagenz (Sigma-Aldrich) zur Ausbildung einer intensiven Blaufärbung. Die quantitative Bestimmung erfolgte im Photometer (Uvikon 922, Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz) bei 660 nm.

3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Jede Probe wurde vor der Gelbeladung für 10 min zwecks Denaturierung der Proteine auf 95°C erhitzt (Laemmli et al. 1970). Dann wurden je nach Versuch 50–200 µg Protein pro Gelspur geladen. Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Es wurden 8 % Acrylamid enthaltende Trenngele nach Porzio und Pearson (1977) benutzt. Eine besondere Gelelektrophorese erfolgte mit einem Nativgel nach Laemmli (1970), bei dem für die Herstellung aller Komponenten auf denaturierende Bestandteile verzichtet wurde (kein SDS, DTT oder Kochen der Proben). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4°C mit 40 mA pro Gel für 30 min (Sammeln der Proben) und mit 60 mA pro Gel bis zur vollständigen Auftrennung der Proben in einer Hoefer SE600-Elektrophoresekammer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in einem Elektrodenpuffer (6.1.). Auf jedem Gel wurde ein Standard (Amersham Biosciences Europe GmbH) mitgeführt.

3.4.3.1. Western Blot-Verfahren

Die geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Nasszellen-Blotting-Verfahren von Polyacrylamidgelen in einer Transfereinheit (Hoefer) im elektrischen Feld (Towbin et al. 1979; Gershoni, 1988) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell GmbH) übertragen. Der Transfer wurde bei 1,5 A für 3 h und 4°C in einem Transferpuffer (6.1.) durchgeführt und durch eine Färbung der Membranen mit Ponceau S-Lösung kontrolliert.

3.4.3.2. Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die mit Ponceau S-gefärbten Membranen wurden, entsprechend der erwarteten Molekulargewichte der zu identifizierenden Proteine, in Streifen geschnitten und in bidestilliertem Wasser vollständig entfärbt. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Streifen in einer 2 %igen Albumin-Lösung (BSA; (gelöst in Puffer A, 6.1.) für 45 min schüttelnd bei RT inkubiert. Nach Inkubation für 12 h bei 4°C mit dem jeweiligen ersten Antikörper wurden die Streifen bei anschließender nicht-radioaktiver Detektion dreimal mit Puffer C (6.1.), bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min) gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Streifen bei nicht-radioaktiver

Detektion dreimal mit TBS-Puffer (6.1.), pH 9,4, sowie einmal mit AP-Puffer (6.1.) gewaschen, bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min). Die Antikörper wurden in den in Tab. 5 angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung (3.4.3.3.) oder mittels Autoradiographie (^{125}I -Protein A; 3.4.3.4.).

| 1. Antikörper | Verdünnung | 2. Antikörper | Firma/Referenz |
|------------------------------------|-------------------|---|-------------------------------|
| Anti- <i>CASQ2</i> (rabbit, pk) | 1:2500 | Alkalische Phosphatase/ Protein A | Dianova GmbH Hamburg |
| Anti-GST (mouse, mk) | 1:1000 | Alkalische Phosphatase/ Protein A | BD Biosciences, Heidelberg |

Tab. 5: 1. Antikörper, Verdünnung, 2. Antikörper (wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt). pk: polyklonal; mk: monoklonal

3.4.3.3. Quantifizierung der Immunreaktion

Die Immunfärbung wurde mit dem Fluoreszenzsubstrat ECFTM (Amersham Biosciences Europe GmbH) durchgeführt. Das ECFTM-Substrat wurde im Verhältnis 1:10 in AP-Puffer verdünnt und die in Streifen geschnittenen und entfärbten Nitrozellulosemembranen für 2 min damit inkubiert. Die an den 2. Antikörper gekoppelte AP katalysiert die Dephosphorylierung des ECFTM-Substrats in ein Produkt, das bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert (maximale Anregung bei 430 nm). Die Fluoreszenz wurde mit einem Phosphorimager (STORM 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) detektiert und mithilfe der ImageQuant[®]-Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) quantifiziert. Nach der Detektion mit ECFTM wurden die Membranstreifen mit bidestilliertem Wasser entfärbt und für 10 min in AP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine auf den Membranstreifen durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP, 6.1.), Toluidin-Salz und Nitroblau-Tetrazolium (NBT, 6.1.) in AP-Puffer detektiert. BCIP dient dabei als Substrat der an den zweiten Antikörper gekoppelten AP. Es wird nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen

wasserunlöslichen blauen Indigofarbstoff überführt. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion zu einem ebenfalls wasserunlöslichen blauen Farbstoff reagiert und somit farbverstärkend wirkt.

3.4.3.4. Autoradiographie

Die Membranstreifen wurden für 2 h mit ^{125}I -Protein A (1:1000 in 2 % BSA in Puffer A) bei RT inkubiert und anschließend je zweimal in Puffer A und Puffer C gewaschen. Die Membranen wurden anschließend für 5 min getrocknet, auf Trockenpapier gelegt, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in Phosphorimager-Kassetten exponiert.

3.4.3.5. „ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Overlay“-Assay

Mit diesem Assay lässt sich die Bindungsfähigkeit von Proteinen für Ca^{2+} -Ionen messen. Im Vergleich wurde hier die Bindungsfähigkeit von in Sf21-Insektenzellen exprimiertem *CASQ2* (*CASQ2-WT* und *CASQ2-I161V*) festgestellt. Western Blot, SDS-PAGE, Nasstransfer und Ponceau S-Färbung erfolgten gemäß Standardprotokoll (3.4.4.1.). Die Nitrozellulosemembranen wurden nach Ponceau S-Färbung für 2 x 15 min mit Aqua bidest ausgewaschen und danach für 15 min mit TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 6.1.), pH 7,4, entfärbt. Die Membranspülung erfolgte danach für 4 x 15 min mit Imidazolpuffer (6.1.). Anschließend wurde der Imidazolpuffer mit $1 \mu\text{Ci}^{45}\text{CaCl}_2/\text{ml}$ supplementiert (Herstellung einer 1 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung). Hiermit wurden die Membranen für 15 min inkubiert. Nach zwei Waschsritten mit bidestilliertem Reinstwasser wurden die Membranen schließlich getrocknet, in Folie eingeschweißt und in Phosphorimager-Kassetten exponiert.

3.4.3.6. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch Densitometrie mit der ImageQuant[®]-Software. Das unspezifische Hintergrundsignal wurde von jedem Signal abgezogen.

3.4.3.7. Linearer Bereich der Bestimmung

Der lineare Bereich jeder Messung wurde mithilfe verschiedener Homogenatmengen überprüft. Er umfasste den Bereich, in dem entsprechend einer zunehmenden Proteinbeladung eine zunehmende Proteinexpression festzustellen war. Hierdurch war es möglich, eine quantitative Aussage bezüglich der Proteinexpression zu erheben.

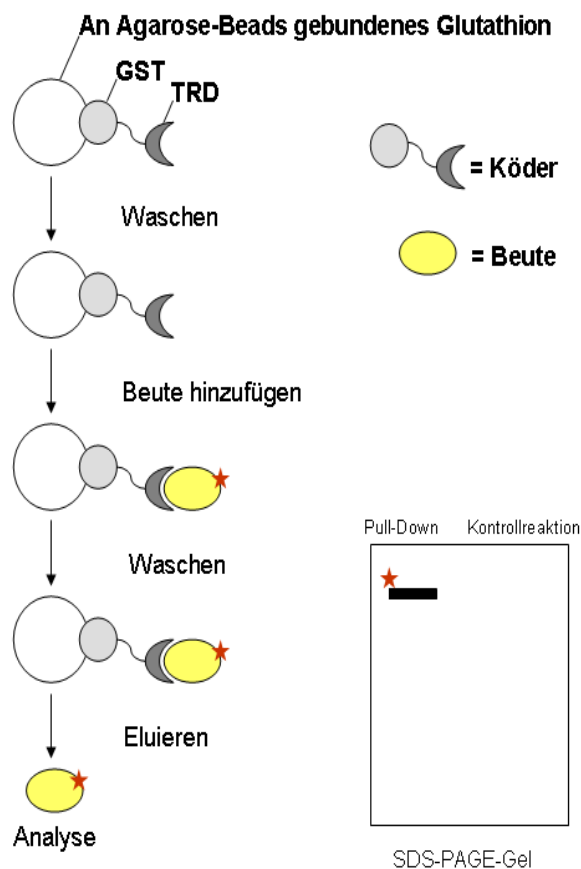
3.4.3.8. Statistische Auswertungen

Mithilfe der ImageQuant®-Software wurde nach Abzug der Hintergrundsignalstärke die Höhe der jeweiligen spezifischen Signale ermittelt. Aus den Versuchsergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der dazugehörige Standardfehler des Mittelwertes errechnet. Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz von Messergebnissen wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test nach Student ermittelt. Die Nullhypothese wurde bei $p < 0,05$ verworfen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern gekennzeichnet.

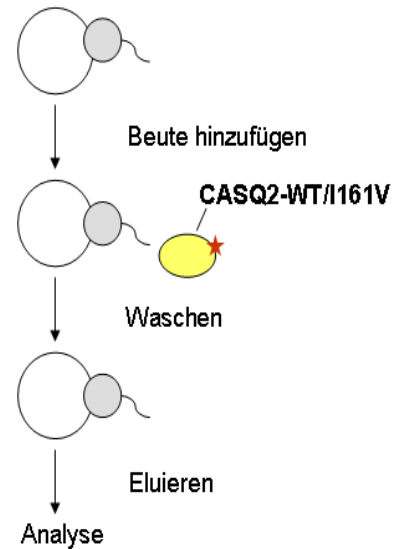
3.4.4. „Pull-down“-Assay

Ein „Pull-Down“-Assay dient als *in vitro*-Methode der Ermittlung von Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Proteinen. Im Sinne eines Köder-Beute-Prinzips wird hierbei eine definierte Menge eines gereinigten Fusions-Proteins (hier: an Glutathion S-Transferase gebundenes Triadin = GST-TRD) als Köderprotein eingesetzt. Dieses Fusionsprotein wird über eine Bindung des GST-Schwanzes an eine geeignete Matrix (hier: Glutathion-Agarose-Beads, BD Biosciences) immobil gemacht, wodurch es eine messbare Wechselwirkung mit einem anderen Protein, dem Beuteprotein (hier: natives oder mutiertes Calsequestrin, *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V), eingehen kann. Abb. 14 veranschaulicht schematisch das Prinzip eines „Pull-Down“-Assays.

„Pull-Down“-Assay



Kontrollreaktion

**Abb. 14: Prinzip des „Pull-Down“-Assays**

An Agarose-Beads kovalent gebundenes Glutathion dient der Kopplung mit an GST gebundenem TRD (GST-TRD). Dieses an GST gebundene TRD stellt das sog. „Köderprotein“ dar, an das im Rahmen des Assays die „Beuteproteine“ (*CASQ2*-WT/I161V) gebunden werden. Dies erfolgt im Rahmen eines feststehenden Versuchsablaufs (links im Bild), bestehend aus Inkubation, Waschen und Elution. Im Vergleich mit einer entsprechenden Kontrollreaktion (rechts im Bild), bei der das Beuteprotein ohne Köderprotein direkt mit dem immobilisierten Glutathion inkubiert, gewaschen und eluiert wird, ist es möglich, das Bindeverhalten dieser Beuteproteine an sein Köderprotein zu analysieren (SDS-PAGE). Roter Stern: Detektion von *CASQ2* mit einem spezifischen anti-*CASQ2*-Antikörper

3.4.4.1. Herstellung der Homogenate

Als „Köderprotein“ diente TRD, welches mit GST fusioniert war und in Sf21-Insektenzellen mithilfe eines Baculovirussystems exprimiert wurde (3.1.1.5. und 3.1.1.6.). Als „Beuteprotein“ diente das ebenfalls durch Sf21-Zellen produzierte *CASQ2*-WT sowie seine mutierte Form *CASQ2*-I161V, wobei die Herstellung der Homogenate je nach Größe der Sf21-Zellpellets in 4 ml bzw. 2 ml PBS-Puffer (6.1.) erfolgte. 3 %iges CHAPS (6.1.) als Zusatz zum Puffer diente hierbei der Solubilisierung der Proteine, Proteaseinhibitoren (PMSF und Benzamidin, jeweils 1 µM) wirkten der Zerstörung der Proteine durch enzymatischen Verdau entgegen. Nach einer 10 s-Homogenisierung mittels VirSonic 60[®] wurden die Proben für 1 h bei 4°C auf einer Rotierscheibe inkubiert. Es folgte das Zentrifugieren für 10 min bei 4°C und 15,800 x g, wobei der dabei entstandene klare Überstand als Homogenat bezeichnet und jeweils in ein Eppendorf-Gefäß geeigneter Größe überführt wurde. Da die verbliebenen Pellets eine wichtige Kontrollprobe darstellten, wurden diese jeweils in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte für alle Proben und Kontrollproben gemäß Lowry-Standardprotokoll (3.4.3.). Die Aufbewahrung der Homogenate erfolgte bei -20°C.

3.4.4.2. Bindung von GST-TRD an Glutathion-Agarose-Beads

An Agaroseharz durch kovalente Bindung immobilisierte Glutathion-Partikel dienen GST-gekoppelten Proteinen als Ligand, wobei Glutathion in der Lage ist, diese mit GST fusionierten Proteine mit hoher Kapazität (5-8 mg/ml) zu binden. 100 µl Beads (200 µl Suspension, da Beads und Puffer im Verhältnis 1:1 vorliegen) wurden 3 x mit jeweils 100 µl PBS-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgte eine 3-5-minütige Zentrifugation bei ca. 500 x g. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Puffer vorsichtig abgenommen und das GST-Fusionsprotein zugegeben. Hierbei diente die zusätzliche Zugabe von 1/10 Volumenanteil PBS-Puffer der Absenkung der in den Proben vorhandenen CHAPS-Konzentration auf ca. 0,3 %.

Nach Inkubation bei 4°C für 1 h erfolgte das Zentrifugieren für 5 min bei 500 x g, bevor sich erneut 3 Waschschriffe mit jeweils 1 ml PBS-Puffer anschlossen. Durch das Waschen sollten nicht gebundene Proteine aus den Proben entfernt werden. Daher wurde der 1. Waschüberstand nicht verworfen und konnte so als

Kontrollprobe dienen. Das Zentrifugieren im Rahmen der 3 Waschgänge erfolgte jeweils bei 500 x g. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE in einem 8 %igen Porziogel. Western Blot, Nasstransfer, Ponceau S-Färbung und Autoradiographie erfolgten nach Standardprotokollen (3.4.3. ff.).

3.4.4.3. Binden von *CASQ2-WT/CASQ2-I161V* an GST-TRD

Zu 25 µl (500 µg) GST-TRD wurde nach Vorverdünnung in PBS-Puffer (1:20) *CASQ2-WT/CASQ2-I161V* zugegeben (je nach Versuchsanordnung wurden unterschiedliche Homogenatmengen eingesetzt). Die Inkubation erfolgte bei 4°C auf einer Rotierscheibe, was zu einer stetigen Durchmischung der Proben führte. Drei Waschschriffe mit jeweils 1 ml PBS folgten, wobei zwischen den Waschschriffen für 3-5 min bei 500 x g zentrifugiert wurde. Der 1. Waschüberstand wurde zum Nachweis des nicht gebundenen Proteins aufbewahrt, die restlichen Waschüberstände wurden verworfen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE in einem 8 %igen Porziogel. Western Blot, Nasstransfer, Ponceau S-Färbung und Autoradiographie erfolgten nach Standardprotokollen (3.4.3. ff.).

4. Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit stand die Mutation I161V im humanen *CASQ2*-Gen. Wir vermuten, dass diese Mutation, die durch eine Punktmutation an der Aminosäure 161 des Gens einen Austausch von Isoleucin gegen Valin bewirkt (vgl. Abb. 10, S. 39), als Ursache einer hereditären, klinisch relevanten Form der CPVT in einer betroffenen Familie fungiert. Darauf deutet einerseits die Tatsache hin, dass eine umfassende genetische Testung der betroffenen Familie auf andere bekannte Mutationen im *CASQ2*- und *RyR2*-Gen negativ verlaufen war, andererseits zeigt das klinische Erscheinungsbild von *CASQ2*-I161V eine Vereinbarkeit mit einer Form der CPVT.

4.1. Die *CASQ2*-Mutation I161V: Klinische Daten

Die hauptbetroffene Patientin P. R. (Geburtsjahr 1965) zeigt seit ihrer Jugend ein immer wiederkehrendes und im Alter zunehmendes klinisches Bild aus symptomatischen Rhythmusstörungen, wie Herzstolpern und Herzrasen. Auffällig ist ein stark gehäuftes Auftreten dieser Rhythmusstörungen in psychisch stressigen Lebenslagen oder während emotionaler Anspannung. Die Symptome der Patientin werden teilweise von Schwindel und damit einhergehenden Prä-/Synkopen begleitet und setzen stets plötzlich und in den unterschiedlichsten alltäglichen Situationen ein (z.B. beim Führen eines Pkw). Körperliche Belastung wie Sport und andere aktive Freizeitaktivitäten scheinen dagegen präventiv zu wirken. Die Patientin berichtet darüber, dass die Rhythmusstörungen in einigen Fällen mittels eines sogenannten vagalen Manövers (z.B. Eiswasser trinken) positiv beeinflusst oder sogar in Regression gebracht werden können. Durch ein vagales Manöver wird der für den vegetativen Parasympathikotonus bestimmende Nervus vagus aktiviert, über dessen hemmende Wirkung auf die kardialen Erregungsbildungszentren in Stresssituation die Herzfrequenz gezielt herabgesetzt werden kann.

Während im Rahmen elektrophysiologischer und funktioneller Untersuchungen (Ruhe-EKG, Stress-EKG, Echokardiographie, Koronarangiographie, Elektrophysiologie) neben einem funktionell und strukturell unauffälligen Herzen kein Anhalt für das Vorliegen von angeborenen Syndromen wie z.B. Brugada-Syndrom, Long QT-Syndrom, Short QT-Syndrom gefunden werden konnte (Pati-

tenakten des Klinikums Braunschweig, Medizinische Klinik 2; Patientenakten des Universitätsklinikums Münster, Medizinische Poliklinik C, 2005/2008), zeigt die folgende EKG-Aufzeichnung der Patientin (Abb. 15), die während einer Episode von symptomatischem Herzrasen entstand (Klinikum Braunschweig, 2005), ein CPVT-typisches pathologisches Korrelat aus nicht anhaltenden polymorphen Extrasystolen (VTs; vgl. Abb. 2, S. 8).

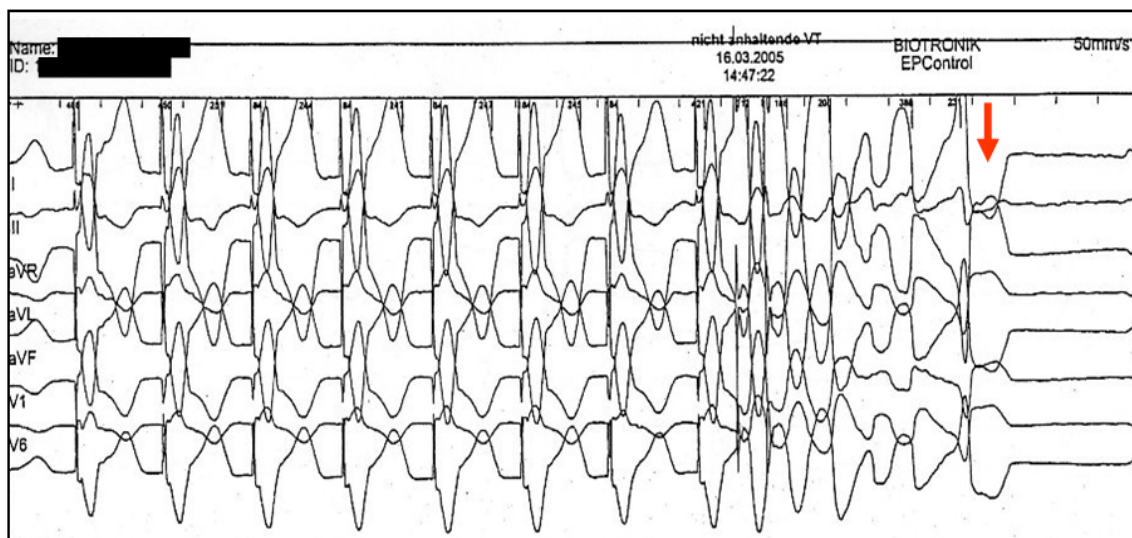


Abb. 15: *CASQ2*-Mutation I161V bewirkt nicht anhaltende polymorphe VTs

Dieser EKG-Ausschnitt stammt von der Patientin P. R. und entstand im März 2005 im Klinikum Braunschweig während einer Episode von Herzrasen. Die Patientin hatte sich aufgrund von wiederholt aufgetretenen Rhythmusstörungen mit begleitenden Schwindelgefühlen im Klinikum vorgestellt. Die Abb. zeigt nicht anhaltende polymorphe VTs, die sich gegen Ende der EKG-Aufzeichnung selbst limitieren (roter Pfeil).

Neben der vorgestellten Patientin zeigen sowohl die Schwester als auch die Mutter der Patientin stressinduzierte Episoden von Herzstolpern bzw. Herzrasen, wobei im Gegensatz zur Patientin P. R. weder bei der Schwester noch bei der Mutter Präsynkopen oder Synkopen bekannt wurden. Der genetische Nachweis der *CASQ2*-Mutation I161V erfolgte durch sogenannte DNS-Analyse-Assays (Schulze-Bahr et al. 2001, Neu et al. 2010). Hierbei wird das zu analysierende

Gen in Internet-zugänglichen Datenbanken gesucht und deren cDNS mittels der genomischen DNS abgeglichen. Es werden Intron-spezifische Genprimer entwickelt, die zur Amplifikation und anschließenden Sequenzierung der DNS notwendig sind. So wird die komplette kodierende Sequenz eines Gens untersucht. Die Ergebnisse dieser Assays zeigten eine heterozygote (nur ein Allel betroffen) Veränderung im *CASQ2*-Gen der hauptbetroffenen Patientin P. R. sowie bei der Mutter bei gleichzeitig negativer Testung auf andere zur Zeit bekannte Mutationen im *CASQ2*-Gen und *RyR*-Gen. Bei der ebenfalls von den Rhythmusstörungen betroffenen Schwester der Patientin gelang dagegen kein Mutationsnachweis. (Patientenakten des Klinikums Braunschweig, Medizinische Klinik 2; Patientenakten des Universitätsklinikums Münster, Medizinische Poliklinik C, 2005/2008). Abb. 16 zeigt zur Veranschaulichung den Stammbaum der Familie.

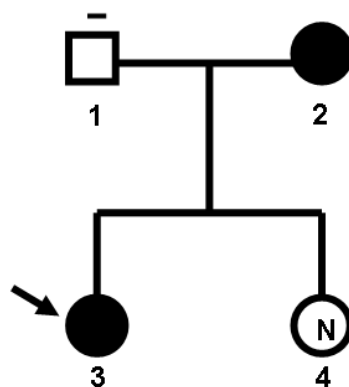


Abb. 16: Stammbaum der betroffenen Familie mit *CASQ2*-Mutation I161V

Die Abb. zeigt den Stammbaum der betroffenen Familie. Legende: (1) Vater der Patientin; (2) Mutter der Patientin; (3) Patientin P. R. (zusätzlich durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet); (4) Schwester der Patientin. Die leeren Felder bezeichnen die nicht betroffenen Familienangehörigen (Minuszeichen) bzw. die betroffenen Angehörigen, bei denen der genetische Nachweis der *CASQ2*-Mutation I161V nicht gelang (N). Die gefüllten Felder bezeichnen die Familienmitglieder, bei denen der Nachweis der Mutation gelang.

Die Mutation I161V könnte zu bisher unbekanntem Störungen im Rahmen der kardialen Ca^{2+} -Homöostase führen. Die Teilaspekte, die im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund standen, hatten daher zum Ziel, erste Erkenntnisse über die Mu-

tation zu erlangen und so eine Verbesserung des Verständnisses der potentiell zugrunde liegenden Veränderungen in der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase und über die Pathophysiologie der CPVT zu erreichen. Neben der künstlichen Generierung der Mutation mittels gerichteter Mutagenese sowie anschließender baculoviraler Infektion und Expression in Sf21-Zellkulturen erfolgten Funktionsuntersuchungen zur Ca^{2+} -abhängigen Speicherkapazität des mutierten *CASQ2* im Vergleich zu seiner Wildtyp-Form. Weiterhin wurden erste Untersuchungen zum Ca^{2+} -abhängigen Bindungsverhalten an Triadin, einem wichtigen Bindungspartner des CSQ am Ca^{2+} -Freisetzungskanal des junktionalen SR (vgl. Abb. 3, S. 11), durchgeführt. Die Herstellung eines rekombinanten, das humane *CASQ2* und seine Mutante I161V exprimierenden Adenovirus (Ad5-*CASQ2*-WT/Ad5-*CASQ2*-I161V) sowie die adenovirale Infektion von neonatalen Maus-Kardiomyozyten rundeten die Arbeit ab.

4.2. Gerichtete Mutagenese des *CASQ2*-Gens

Durch die gerichtete Mutagenese des humanen *CASQ2*-Gens (vgl. 3.2.9 ff.) wurde mittels eines gezielten Basenaustauschs (Adenin—>Guanin) eine Veränderung der Aminosäuresequenz (Isoleucin—>Valin) herbeigeführt und so die Mutation I161V (*CASQ2*-I161V) künstlich hergestellt. Die hierfür erforderliche cDNS mit der Sequenz des *CASQ2* stammte von einem 28jährigen herzgesunden männlichen Spender (BioChain Institute Inc. Hayward, CA, USA). Die Mutagenese erfolgte mit dem „Altered sites® II *in vitro* Mutagenesis System“ (Promega) unter Verwendung des pAlter1-Vektors, der sowohl eine inaktivierte Ampicillinresistenz als auch eine Tetracyclinresistenz enthält. Unter Verwendung zweier Oligonukleotide wurde neben der gewünschten Mutation im *CASQ2* eine Mutation in das inaktivierte Ampicillin-Resistenzgen des pAlter1-Vektors eingeführt. Diese eingefügte Mutation reparierte die Resistenz gegenüber Ampicillin und ermöglichte so eine Selektion mutierter Klone. Für die Mutagenesereaktion des pAlter-*CASQ2*-WT-Plasmids war es erforderlich, initial einen Einzelstrang (ss) des Plasmids über dessen Infektion mit einem Helferphagen (R408) zu synthetisieren (Russel et al. 1986; Vieira und Messing, 1987). Die folgende Abb. 17 zeigt einen Restriktionsverdau, der die erfolgreiche Herstellung einer ss-pAlter-*CASQ2*-WT-DNS zeigt.

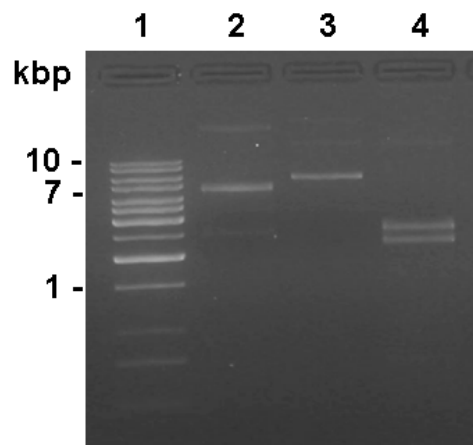


Abb. 17: Herstellung einer einzelsträngigen (ss-)pAlter-*CASQ2*-WT-DNS.

Dargestellt ist die Fotografie eines Restriktionsverdaus, die die erfolgreiche Herstellung einer ss-pAlter-*CASQ2*-WT-DNS (**4**) zeigt. Zum Größenvergleich diente eine 1 kb DNS-Leiter als Standard (**1**). Die Größe in Kilo-Basenpaaren (kbp) ist am linken Bildrand ersichtlich. Zur Kontrolle wurde sowohl die Helferphagen-DNS (**2**) als auch die doppelsträngige (ds-)pAlter-*CASQ2*-WT-DNS (**3**) mit aufgetragen.

Die Mutagenesereaktion erfolgte mit dem ss-pAlter-*CASQ2*-WT-Plasmid durch Anlagerung eines entsprechenden phosphorylierten mutagenen Oligonukleotids. Unter Verwendung von T4-DNS-Polymerase und T4-DNS-Ligase wurde ein Zweitstrang synthetisiert, der die Mutation enthielt. Mit dem Reaktionsprodukt wurden *E. coli* ES1301 mutS-Zellen transformiert, die kein funktionierendes "DNA mismatch repair"-System besitzen (mutS) und somit nicht in der Lage waren, den neu synthetisierten Strang zu modifizieren (Zell und Fritz, 1987). Nach Vermehrung und Selektion der transformierten Klone in einer mit Ampicillin versetzten Flüssigkultur wurde die Plasmid-DNS isoliert, in *E. coli* JM109-Zellen transformiert und mittels Ampicillin positive Kolonien selektiert. Nach der Gewinnung von Plasmid-DNS aus Einzelkolonien und automatischer Sequenzierung erfolgte die Expression in Sf21-Insektenzellen mittels baculoviraler Infektion.

4.3. Expression von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V in Sf21-Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren

Für eine baculovirale Infektion von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V in Sf21-Insektenzellen unter Benutzung des Baculovirussystems (vgl. 3.1.1.5. ff.) wurde die cDNS zuerst in den Transfervektor pVL1393 eingebracht (4.3.1, 4.3.2.), der sich wiederum homologe Bereiche mit dem Baculovirusgenom teilt. Um einerseits eine erleichterte Isolation und Aufreinigung der exprimierten Proteine zu ermöglichen und andererseits deren immunologischen Nachweis zu führen, wurde eine 6 x Histidin-Erkennungssequenz benutzt (4.3.3.). Die Erkennungssequenz ist Teil des Expressionsvektors pAcHLT-A. Nach entsprechender Kotransfektion der Baculovirus-DNS und eines rekombinanten Transfervektors in Sf21-Insektenzellen wurde die *CASQ2*-cDNS (*CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V) durch homologe Rekombination in die Baculovirus-DNS integriert. So entstanden die rekombinanten *CASQ2*-Baculoviren (pBac-*CASQ2*-WT/pBac-*CASQ2*-I161V).

Als Kontrollvirus diente ein Baculovirus ohne Fremdgen, wobei mit Kontrollbaculoviren infizierte Insektenzellen an Stelle eines Fremdgens nur das Hüllprotein Polyhedrin exprimieren. Dies ist an typischen Einschlusskörperchen in den Sf21-Insektenzellen zu erkennen (vgl. Abb 8, S. 25). Die folgende Abb. 18 entstand jeweils 3 Tage nach Infektion der Insektenzellen und zeigt neben nicht infizierten Insektenzellen (A) mit dem Kontrollbaculovirus infizierte Insektenzellen (B) sowie mit *CASQ2*-I161V infizierte Zellen (C).

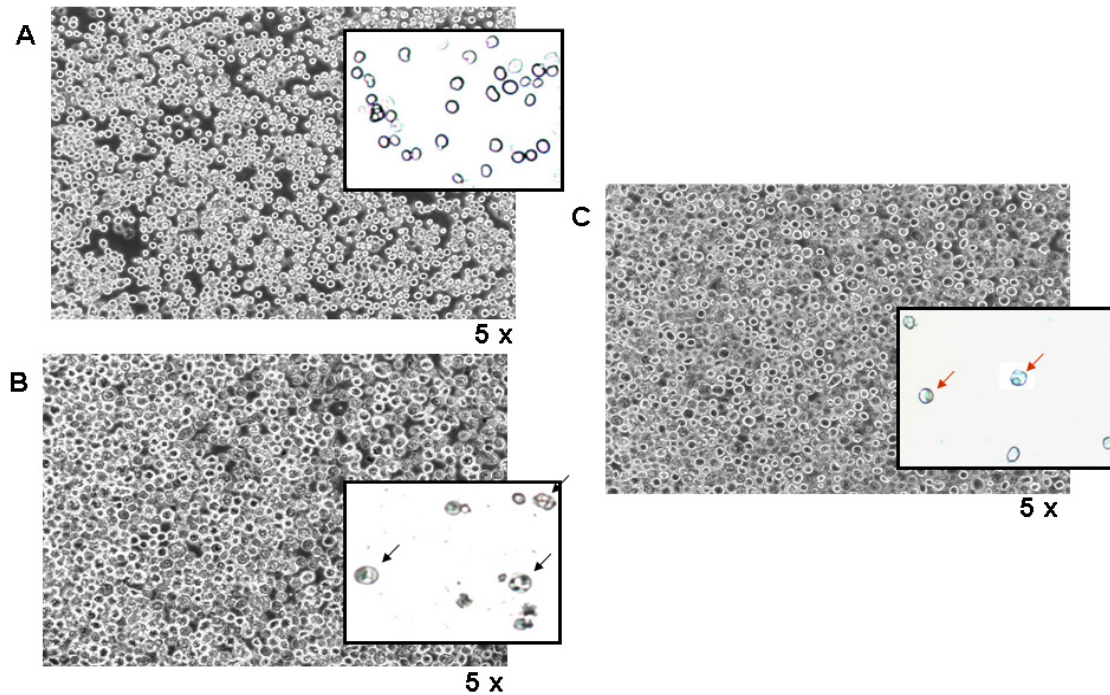


Abb. 18: Aufnahmen nicht-infizierter und infizierter Sf21-Insektenzellen

Die Phasenkontrast-Mikroskopien (mit zur Veranschaulichung aufliegenden lichtmikroskopischen Bildausschnitten) zeigen in jeweils 5facher Vergrößerung (5 x) nicht-infizierte **(A)** und mit Kontrollbaculovirus infizierte **(B)** Sf21-Insektenzellen. Das Kontrollbaculovirus exprimiert statt des Fremdgens das Hüllprotein Polyhedrin, welches an typischen Einschlusskörperchen (schwarze Pfeile) zu erkennen ist. In den mit *CASQ2*-cDNS (hier exemplarisch *CASQ2-I161V*) infizierten Zellen **(C)** wurde die Sequenz für dieses Hüllprotein durch homologe Rekombination entfernt und durch die *CASQ2*-Sequenz ersetzt (rote Pfeile). Die Aufnahmen entstanden jeweils 3 Tage nach der Infektion.

4.3.1. Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pVL1393-)*CASQ2*-WT

Zur Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pVL1393-)*CASQ2*-WT wurde die nicht-mutierte *CASQ2*-cDNS zunächst aus cDNS eines humanen Herzens (BioChain Institute Inc. Hayward, CA, USA) mittels PCR amplifiziert und zeitgleich mit entsprechenden Primern eine XbaI- und BglII-Schnittstelle am 5`-Ende bzw. 3`-Ende eingefügt. Das Einfügen der Schnittstellen XbaI und BglII diente Restriktionsenzymen für das Schneiden des PCR-Fragments mit anschließender Einklonierung in entsprechende Schnittstellen des pVL1393-Vektors. Nach Ko-

transfektion des Vektors mit Baculovirus-DNS entstand ein rekombinantes Baculovirus. Der virushaltige Überstand der Kotransfektion wurde zur Infektion weiterer Insektenzellen genutzt.

4.3.2. Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pVL1393-)CASQ2-I161V

Zur Herstellung von (pVL1393-)CASQ2-I161V erfolgte zunächst der Verdau des Shuttlevektors pBluescript II KS mit den Restriktionsenzymen XbaI (5`-Ende) und BamHI (3`-Ende) sowie der Verdau des humanen CASQ2-Fragments (aus PCR; vgl. 4.3.1.) mit den Restriktionsenzymen XbaI (5`-Ende) und BglII (3`-Ende). Durch die anschließende Einklonierung des CASQ2-Fragments in pBluescript II KS gingen die Schnittstellen BamHI und BglII wieder verloren. Es folgte der erneute Verdau mit XbaI (5`-Ende) und PstI (3`-Ende). So wurde das Konstrukt aus pBluescript II KS wieder ausgeschnitten und in entsprechende Schnittstellen des pAlterI-Vektors einkloniert. Nach Durchführung der gerichteten Mutagenese (vgl. 4.1.) und Einklonierung des mutierten Konstruktes in die Schnittstellen XbaI (5`-Ende) und PstI (3`-Ende) des Transfervektors pVL1393 entstand das rekombinante Baculovirus durch Kotransfektion des Vektors mit der Baculovirus-DNS. Der virushaltige Überstand der Kotransfektion wurde zur Infektion weiterer Insektenzellen genutzt.

4.3.3. Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pAchLT-) 6x His-CASQ2-WT

Die Herstellung des rekombinanten Baculovirus (pAchLT-) 6x His-CASQ2-WT erfolgte nach PCR-Amplifikation der humanen CASQ2-Ausgangs-cDNS und Einbringen einer zusätzlichen NdeI-Schnittstelle (5`Ende) in das PCR-Produkt durch die Einklonierung in den mit NdeI und SmaI geschnittenen Transfervektor pAchLT. Nach Kotransfektion zusammen mit Baculovirus-DNS entstand das rekombinante Baculovirus. Der virushaltige Überstand der Kotransfektion wurde zur Infektion weiterer Insektenzellen genutzt.

Die folgende Abb. 19 belegt die Herstellung rekombinanter Baculoviren am Beispiel der erfolgreichen Herstellung von (pVL1393-)CASQ2-I161V.

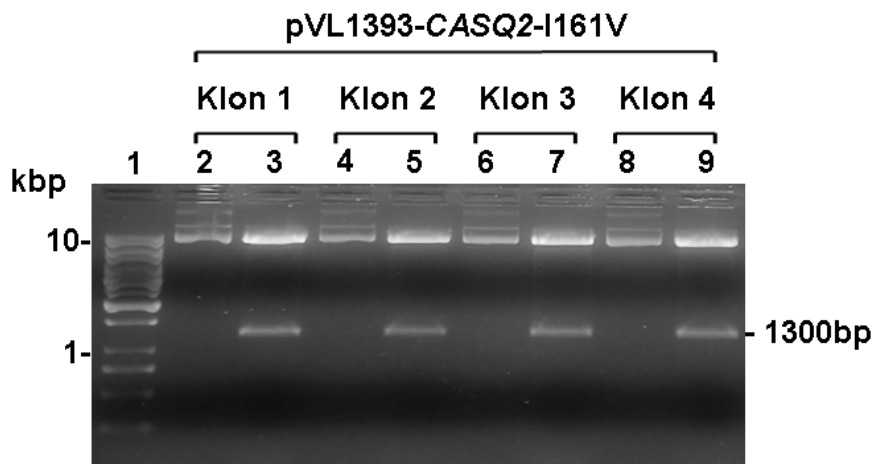


Abb. 19: Herstellung von (pVL1393-)CASQ2-I161V

Dargestellt ist die Fotografie einer Agarose-Gelelektrophorese, die die erfolgreiche Herstellung von (pVL1393-)CASQ2-I161V anhand eines Restriktionsverdau zeigt. Die cDNS von 4 verschiedenen Klonen (Klon 1-4) für CASQ2-I161V war hierfür mit den Restriktionsenzymen XbaI (5'-Ende) und PstI (3'-Ende) geschnitten worden. Die unverdauten Proben von CASQ2-I161V (**2, 4, 6 und 8**) sind im Wechsel mit den verdauten Proben (**3, 5, 7 und 9**) zu vergleichen. Diese sind an der zusätzlichen Bande bei ca. 1300 bp zu erkennen (humanes CASQ2: 1197 bp). Eine 1 kb DNS-Leiter (**1**) diene als Größenstandard. Die Größenangabe in Kilo-Basenpaaren (kbp) ist am linken Bildrand ersichtlich.

4.4. Immunologischer Nachweis der Proteinexpression des humanen CASQ2 in Sf21-Insektenzellen

Für den immunologischen Nachweis der Proteinexpression von CASQ2-WT und CASQ2-I161V in Sf21-Insektenzellen erfolgte die Ernte und Homogenisation der baculoviral infizierten Sf21-Insektenzellen (vgl. 3.4.1.). Nach dem Lösen der Proteine in Histidin-Saccharose-Puffer erfolgte die quantitative Bestimmung der Proteine nach der Standardmethode von Lowry (1951). Abb. 20 zeigt einen Immunoblot zum Nachweis von CASQ2-WT und CASQ2-I161V nach Expression in Insektenzellen.

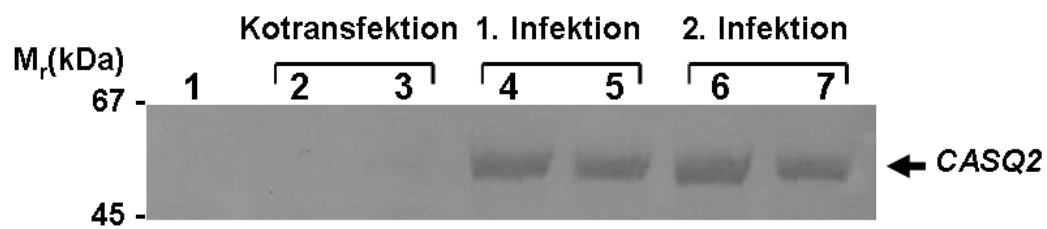


Abb. 20: Proteinexpression von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V in Sf21-Insektenzellen

Dargestellt ist der immunologische Nachweis der Proteinexpression von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V in Sf21-Insektenzellhomogenaten nach deren Infektion mit den rekombinanten Baculoviren. Der Nachweis erfolgte im Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Porziogel. Pro Spur wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen. Der Molmassenstandard (M_r) in kDa befindet sich am linken Bildrand. Gezeigt ist der Bereich zwischen 45 und 67 kDa. *CASQ2* konnte mithilfe eines spezifischen Antikörpers auf einer Höhe von 55 kDa nachgewiesen werden. Insgesamt wurde einmal kotransfiziert und jeweils 2 x infiziert. Gelbeladung: **(1)** mit Kontrollbaculovirus (ohne Fremdgen) infizierte Insektenzellen; **(2)** Kotransfektion *CASQ2*-WT; **(3)** Kotransfektion *CASQ2*-I161V; **(4)** 1. Infektion *CASQ2*-WT; **(5)** 1. Infektion *CASQ2*-I161V; **(6)** 2. Infektion *CASQ2*-WT; **(7)** 2. Infektion *CASQ2*-I161V.

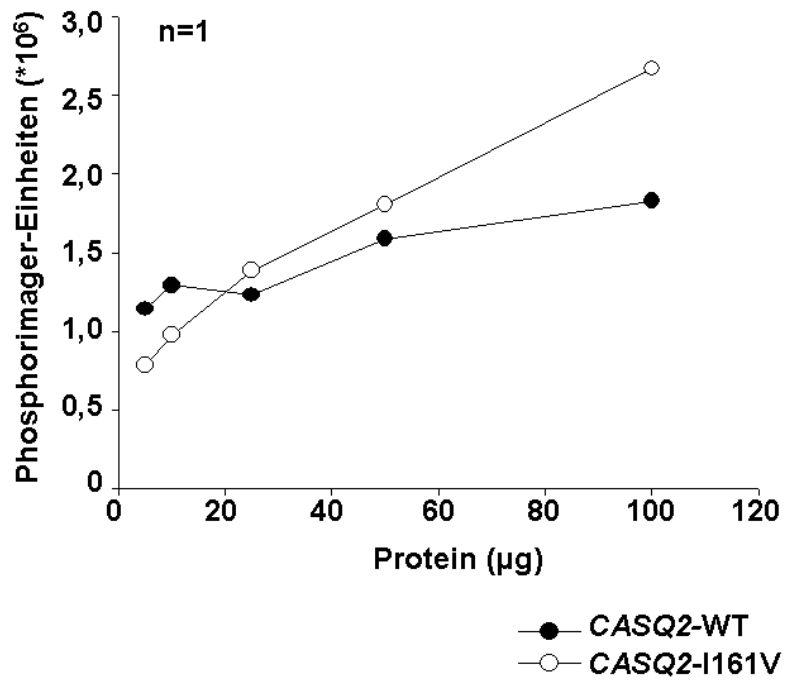
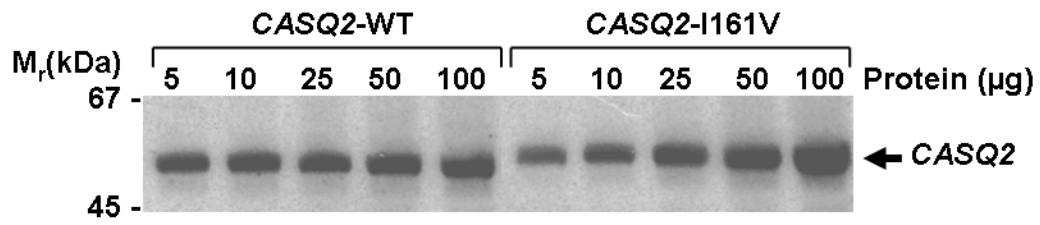
Diese Ergebnisse belegen die im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführte Generierung der neu entdeckten *CASQ2*-Mutation I161V aus humaner *CASQ2*-cDNS mithilfe der gerichteten Mutagenese. Der Nachweis über die erfolgreiche Proteinexpression von Wildtyp-*CASQ2* und künstlich hergestelltem mutiertem *CASQ2* in Sf21-Zellkulturen nach deren baculoviraler Infektion, konnte in diesem Rahmen mittels Western Blot-Verfahren erbracht werden. So wurden die Voraussetzungen für erste funktionelle Untersuchungen der *CASQ2*-Mutation I161V geschaffen.

4.5. Ca²⁺-abhängige Kalziumbindung von rekombinantem *CASQ2-I161V* und *CASQ2-WT*

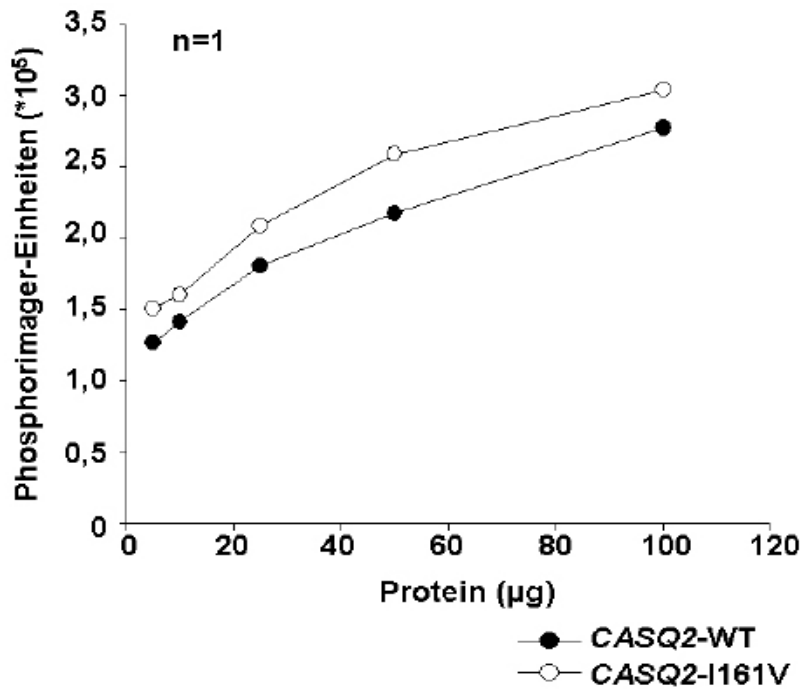
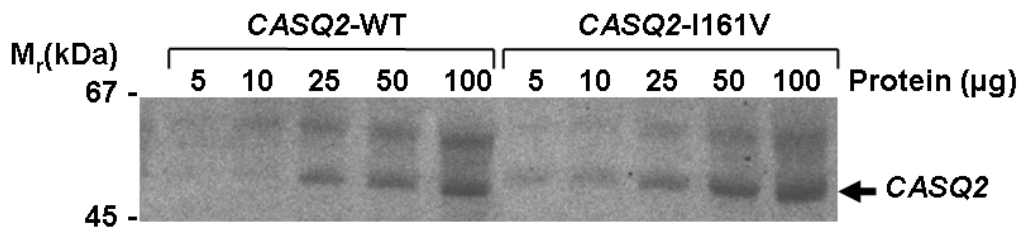
4.5.1. Etablierung des Versuchsablaufs

Zur Bestimmung der Ca²⁺-abhängigen Kalziumbindung wurde zunächst der Versuchsablauf etabliert. Im Rahmen dieses Vorversuches, bei dem es sich um eine einzelne Bestimmung handelte (n=1), wurden jeweils 5 unterschiedliche Proteinmengen (5-100 µg Protein) für *CASQ2-WT* und *CASQ2-I161V* (aus Sf21-Insektenzellen) auf ein 8 %iges Porzio-Gel aufgetragen und danach mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrozellulosemembran und Anfärbung der geblotteten Proteine mit Ponceau S-Farbstoff erfolgte die Identifikation der Zielproteine (*CASQ2-WT/CASQ2-I161V*) bei 55 kDa mittels LMW-Größenstandard. Dieser Membranstreifen wurde dann für eine 15-minütige Inkubation mit radioaktiver ⁴⁵CaCl₂-Lösung eingesetzt (vgl. 3.4.4.5.; „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assay). Da die Ca²⁺-Bindung von *CASQ2* Ca²⁺-abhängig ist (Abb. 21), wurde für die Durchführung der Ca²⁺-Inkubation die ⁴⁵Ca²⁺-Endkonzentration auf 1 mM festgelegt. Ungebundenes ⁴⁵Ca²⁺ wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgewaschen und die Membran bis zu fünf Tage in einer Phosphorimager-Kassette exponiert. Die Abb. 21 dokumentiert den Versuchsablauf dieses initialen Versuchs anhand von 2 Autoradiogrammen, die den Immunoblot und den „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assay zeigen. Sowohl die Proteinexpression als auch die Ca²⁺-Bindung wurden jeweils quantifiziert und als Diagramm dargestellt.

A



B



C

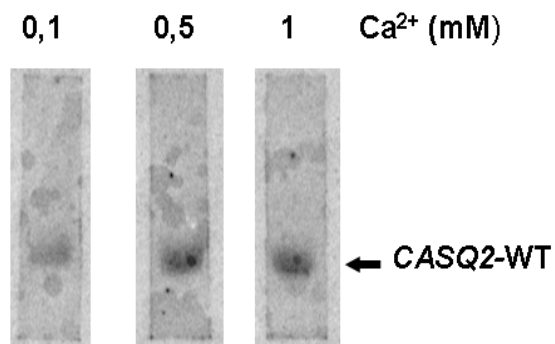


Abb. 21: Initialer Versuch zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von CASQ2-WT/CASQ2-I161V

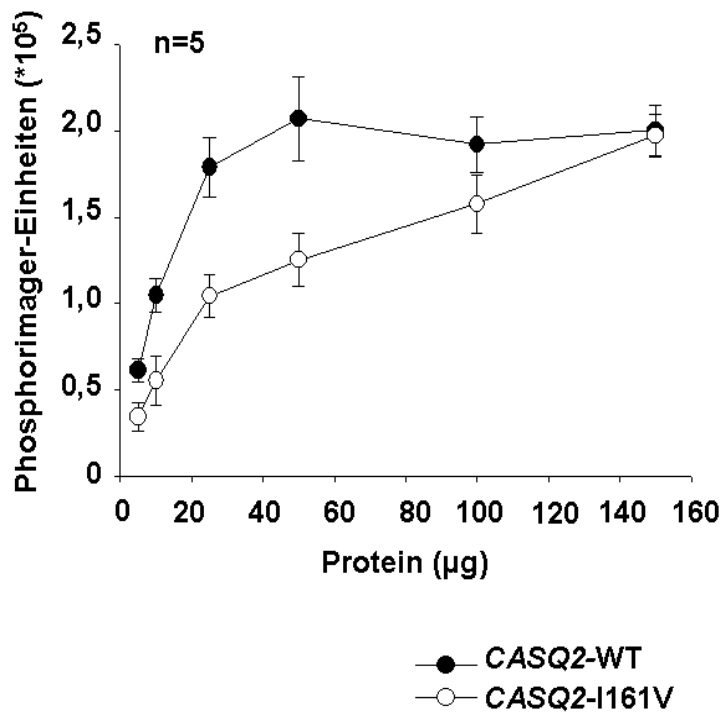
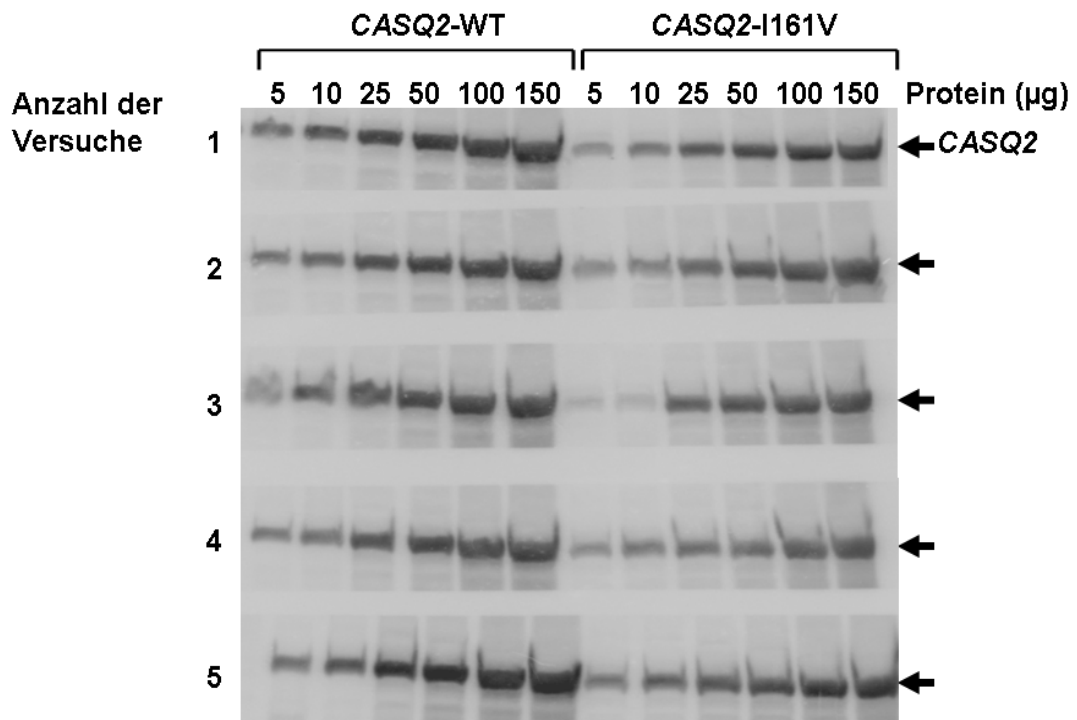
Diese Abb. dokumentiert den Versuchsablauf des initialen Versuchs (n=1) zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von CASQ2-WT/CASQ2-I161V anhand eines Immunoblots **(A)** und eines „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assays **(B)**. Der Immunoblot erfolgte im Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Porziogel. Jeweils 5 unterschiedliche Proteinmengen (5-100 µg Protein) für Insektenzellhomogenate, infiziert mit CASQ2-WT- und CASQ2-I161V-Baculoviren, wurden hierfür in ansteigender Menge in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-CASQ2-Antikörper (¹²⁵I-Protein A-gekoppelt) inkubiert. CASQ2 konnte auf einer Höhe von 55 kDa nachgewiesen werden (Molmassenstandard (M_r) am linken Bildrand). Im Rahmen des anschließend durchgeführten „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assays erfolgte eine 15-minütige Inkubation desselben Membranstreifens mit einer 1 mM ⁴⁵CaCl₂-Lösung. Schließlich demonstrieren 3 weitere „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assays die Ca²⁺-Abhängigkeit der Ca²⁺-Bindung von CASQ2 **(C)**. Jeweils 100 µg für Insektenzellhomogenate, infiziert mit CASQ2-WT-Baculoviren (Hund), wurden hierfür im Western Blot-Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-CASQ2-Antikörper (¹²⁵I-Protein A-gekoppelt) inkubiert. Die anschließend durchgeführte ⁴⁵Ca²⁺-Inkubation erfolgte mit einer 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM ⁴⁵CaCl₂-Lösung.

Anhand dieses initialen Versuchs zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit konnte gezeigt werden, dass die Versuchsanordnung, wie hier etabliert, funktionell ist. Die zunehmende Proteinexpression sowie die zunehmende Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V konnte jeweils durch ein Diagramm dargestellt werden. Anhand von 3 weiteren „ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Overlay“-Assays konnte ferner die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2* (Hunde-Wildtyp-*CASQ2*) demonstriert werden. Die Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT stieg nach Inkubation mit einer 1 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung gegenüber einer 0,5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung nicht weiter an.

4.5.2. Ca^{2+} -abhängige Kalziumbindung

Dem initialen Versuch zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit folgten 5 unabhängige Bestimmungen ($n=5$), wobei der Versuchsablauf dem des Vorversuches entsprach. Pro unabhängiger Bestimmung wurden jeweils 6 unterschiedliche Proteinmengen (5-150 μg Protein) für Insektenzellhomogenate, infiziert mit *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V-Baculoviren, in ansteigender Menge in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-*CASQ2*-Antikörper (^{125}I -Protein A-gekoppelt) inkubiert. Dieselbe Membran wurde im Anschluss daran mit einer 1 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung inkubiert. Nach Exposition in einer Phosphorimager-Kassette entstanden die in der folgenden Abb. 22 dargestellten Autoradiogramme. Sowohl die Proteinexpression als auch die Ca^{2+} -Bindung wurden entsprechend dem Vorversuch quantifiziert und als Diagramm dargestellt.

A



B

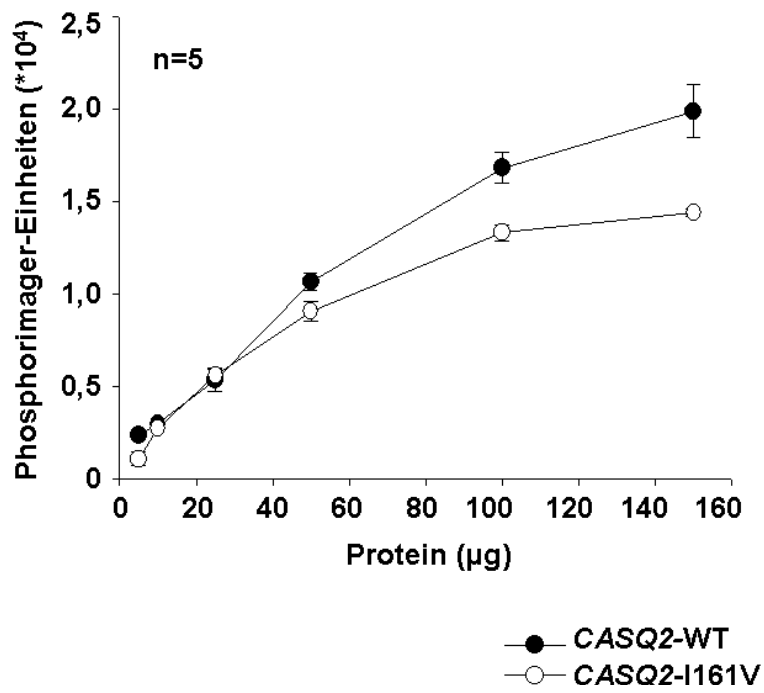
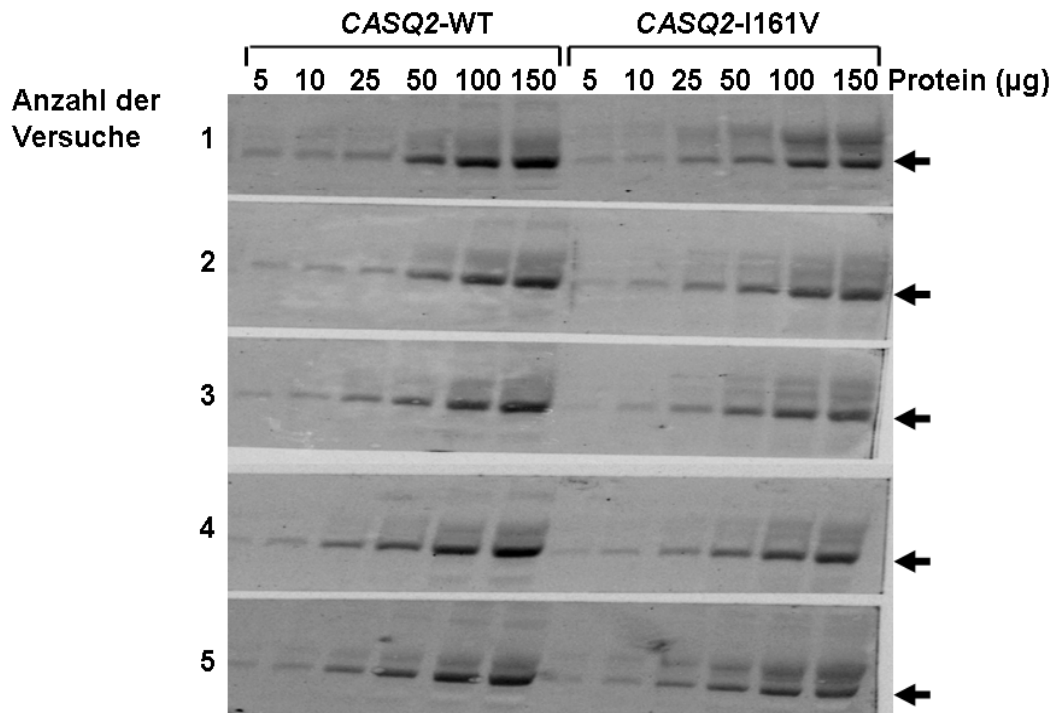


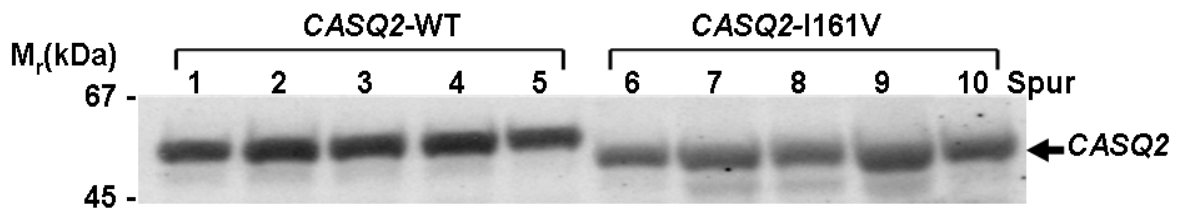
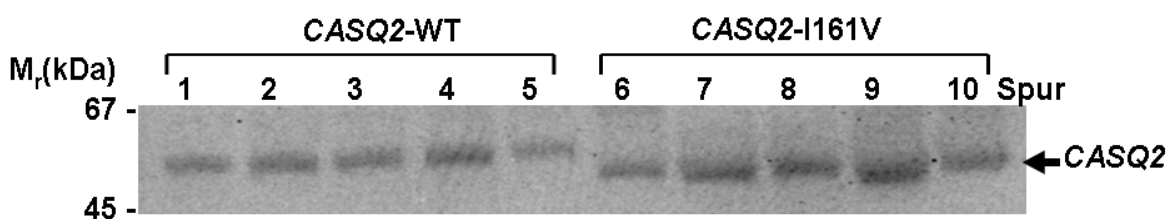
Abb. 22: Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca²⁺-Bindung von CASQ2-WT/CASQ2-I161V

Die Abb. 22 dokumentiert den Versuchsablauf von 5 unabhängigen Versuchen (n=5) zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von CASQ2-WT/CASQ2-I161V. Die 5 Immunoblots **(A)** erfolgten im Western Blot-Verfahren. Für die 8 %igen Polyacrylamidgele wurden die infizierten Sf21-Insektenzellen aus 5 verschiedenen baculoviralen Infektionen in jeweils ansteigender Proteinkonzentration (5-150 µg Protein) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-CASQ2-Antikörper (¹²⁵I-Protein A-gekoppelt) inkubiert. Die zunehmende Proteinexpression von CASQ2-WT und CASQ2-I161V wurde durch ein Diagramm summarisch dargestellt. Die „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assays **(B)** erfolgten im Anschluss daran mit denselben Membranstreifen. Die Ca²⁺-Bindung steigt sowohl für CASQ2-WT als auch für CASQ2-I161V entsprechend der zunehmenden Proteinbeladung an, was auch hier durch ein Diagramm summarisch veranschaulicht wird.

Die Durchführung der in Abschnitt 4.5. beschriebenen Versuchsreihen (4.5.1., 4.5.2.) erfolgte jeweils unter Einsatz von unterschiedlichen Homogenatmengen. Dies diente der Festlegung eines „linearen Bereichs“ der einzelnen Bestimmungen (vgl. 3.4.4.7.). Der lineare Bereich umfasste den Bereich, in dem entsprechend einer zunehmenden Proteinbeladung eine zunehmende Proteinexpression bzw. eine zunehmende Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V festzustellen war. Sowohl anhand des etablierenden Vorversuchs als auch anhand der 5 Folgeversuche konnte ein solcher linearer Messbereich graphisch festgelegt werden. Das Diagramm der Abb. 22 a demonstriert beispielsweise den linearen Anstieg der Proteinkonzentration von *CASQ2*-WT bis zu einer Proteinmenge von ca. 50 μg . Ein linearer Anstieg der Proteinkonzentration von *CASQ2*-I161V besteht im Vergleich dazu bis zu einer Proteinmenge von 150 μg . Durch dieses Erkenntnis war es möglich, eine quantitative Aussage bezüglich der Proteinexpression bzw. der Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V zu erheben (Abschnitt 4.6. ff.).

4.6. Quantitative Bestimmung der Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V

Die quantitative Bestimmung der Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V erfolgte durch einen direkten Vergleich. Dieser wurde mithilfe von 5 unabhängigen Versuchen ($n=5$) durchgeführt. Für die Versuchsanordnung wurde pro Probe eine Proteinmenge von jeweils 25 μg ausgewählt. Diese Proteinmenge war gemäß der in Abschnitt 4.5. (4.5.1. und 4.5.2.) gewonnenen Ergebnisse im linearen Bereich in jeder Messung. Nach SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Identifikation von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V mittels Western Blot-Verfahren unter Benutzung eines spezifischen anti-*CASQ2*-Antikörpers (Abb. 23). Die anschließend durchgeführte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation erfolgte mit demselben Gel unter Zugabe von 1 mM CaCl_2 (Abb. 23).

A**B****Abb. 23: Direkter Vergleich der Ca²⁺-Bindungsfähigkeit von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V**

Zwei Autoradiogramme ein und desselben Polyacrylamidgels zeigen einen Immunoblot (**A**) und ein „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assay (**B**). Der Immunoblot erfolgte im Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Polyacrylamidgel. Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 25 µg Protein. Dargestellt ist jeweils der Bereich von 45-67 kDa (Molmassenstandard (M_r) in kDa am linken Bildrand). Der spezifische anti-*CASQ2*-Antikörper erkannte *CASQ2* bei 55 kDa. Es erfolgten 5 unabhängige Versuche (n=5) aus 5 verschiedenen baculoviralen Infektionen von Sf21-Insektenzellen. Es wurden 5 Proben für *CASQ2*-WT (Spuren 1-5) und 5 Proben für *CASQ2*-I161V (Spuren 6-10) aufgetragen. Der „⁴⁵Ca²⁺-Overlay“-Assay erfolgte im Anschluss daran mit demselben Membranstreifen.

Mit Hilfe der ImageQuant®-Software (vgl. 3.4.4.8.) erfolgte nach Abzug des Hintergrunds die Ermittlung der Signalstärken für *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V mit anschließender Auswertung der Phosphorimager-Einheiten sowie die graphische Darstellung der daraus ermittelten Ratio. Die Ratio, die in der folgenden Abb. 24 dargestellt ist, gibt die Ca^{2+} -Bindung als Verhältnis von Bindung zur Proteinexpression an.

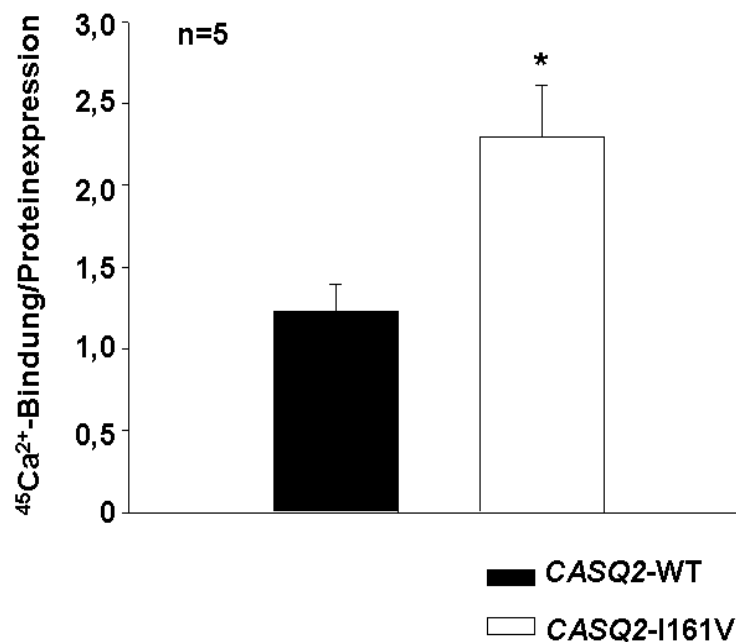


Abb. 24: Ca^{2+} -abhängige Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V

Die Ca^{2+} -Bindung, dargestellt als Verhältnis von Bindung zur Proteinexpression, ist für *CASQ2*-I161V im Vergleich zu *CASQ2*-WT erhöht.

* $p < 0,05$ vs. *CASQ2*-WT

Der in Abschnitt 4.6. beschriebene quantitative Nachweis der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V führte zur Bestimmung der Ratio, dem Verhältnis von Ca^{2+} -Bindung zu Proteinexpression. Sie ist für *CASQ2*-I161V ($2,29 \pm 0,32$) im Vergleich zu *CASQ2*-WT ($1,23 \pm 0,17$) um 53 % erhöht. Diese Erhöhung wurde als statistisch signifikant bewertet. ($p < 0,05$ vs. *CASQ2*-WT).

4.7. Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V an TRD/Etablierung eines „Pull-Down“-Assays

Ein wichtiger Bindungspartner des *CASQ2* am Ca^{2+} -Freisetzungsapparat des junktionalen SR ist das TRD (Zhang et al. 1997; Gyorke et al. 2004). Um eine mögliche Änderung im Bindungsverhalten zum TRD von mutiertem *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form feststellen zu können, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines „Pull-Down“-Assays (vgl. 3.4.5.). Bei diesem Assay wurde im Sinne eines Köder-Beute-Prinzips eine definierte Menge eines gereinigten Fusions-Proteins als Köderprotein eingesetzt. Hier wurde an Glutathion S-Transferase (GST) fusioniertes TRD des Hundes (GST-TRD) als Köderprotein eingesetzt. Dieses Fusionsprotein wurde über eine Bindung seines GST-Restes an eine Glutathion-Agarose-Matrix immobilisiert, wodurch eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen (z.B. *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V) ermöglicht wurde.

4.7.1. Herstellung der Proben und immunologischer Nachweis von *CASQ2*-WT, *CASQ2*-I161V und GST-TRD

CASQ2-WT und *CASQ2*-I161V, die ebenso wie das Fusionsprotein GST-TRD als Sf21-Insektenzellhomogenate zur Verfügung standen, wurden hierfür zunächst nach festgelegtem Protokoll in Lösung gebracht. Dies wurde durch die Zugabe von 3 %igem CHAPS (6.1.) erreicht. Durch Zentrifugation der Homogenate wurde ein klarer solubilisierter Überstand gewonnen. Die verbliebenen Pellets stellten eine wichtige Kontrollprobe für unlösliche Proteine dar. Der Nachweis der exprimierten Zielproteine in Überständen und Pellets erfolgte nach quantitativer Analyse mittels Lowry-Standard im Western Blot-Verfahren in 8 %igen Porziosgelen. Die folgenden Immunoblots der Abb. 25 erbringen den immunologischen Nachweis für die erfolgreiche Expression und Solubilisierung der rekombinanten Proteine, wobei die entsprechenden Pellets als Kontrollproben mit aufgetragen wurden.

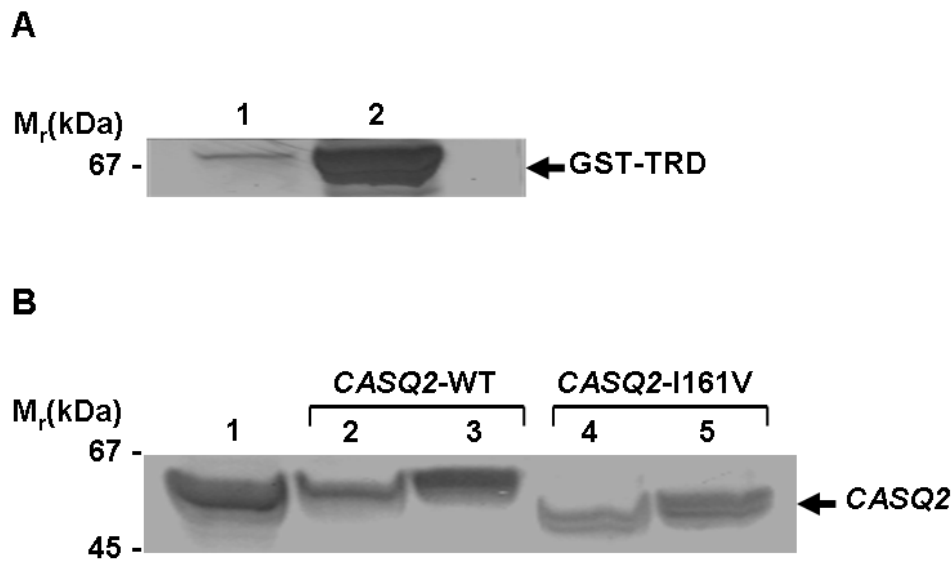


Abb. 25: Immunologischer Nachweis der Expression und Solubilisierung von *CASQ2*-WT, *CASQ2*-I161V und GST-TRD

Western Blots zum immunologischen Nachweis von GST-TRD (**A**), *CASQ2*-WT, und *CASQ2*-I161V (**B**). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Überstände und Pellets erfolgte jeweils in 8 %igen Porziogelen. Pro Spur wurden jeweils 50 μ g Protein aufgetragen. Der Nachweis von GST-TRD erfolgte mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper auf einer Höhe von 67 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins (GST: 27 kDa, TRD: 40 kDa). Der Nachweis von *CASQ2* erfolgte mit einem spezifischen anti-*CASQ2*-Antikörper auf einer Höhe von 55 kDa. Der Molmassenstandard (M_r) in kDa befindet sich am linken Bildrand. Gelbeladung (**A**): (1) im Überstand befindliches, gelöstes GST-TRD; (2) im Sf21-Zellpellet zurückgebliebenes GST-TRD. Gelbeladung (**B**): (1) *CASQ2*-WT-Kontrollprobe (Rohhomogenat); (2) in Lösung gebrachtes *CASQ2*-WT; (3) im Sf21-Zellpellet zurückgebliebenes *CASQ2*-WT; (4) in Lösung gebrachtes *CASQ2*-I161V; (5) Zellpellet mit nicht gelöstem *CASQ2*-I161V.

4.7.2. Immobilisierung von GST-TRD an Glutathion-Agarose-Beads

Die Austestung der Immobilisation von GST-TRD an Glutathion-Agarose-Beads erfolgte im Rahmen eines Einzalexperiments ($n=1$) mit 5 unterschiedlichen Proteinmengen (10-150 μg) von GST-TRD, die jeweils an 100 mg dieser Beads gebunden wurden. Der Einsatz von unterschiedlichen Homogenatmengen diente der Festlegung eines linearen Bereiches der einzelnen Bestimmungen (vgl. 3.4.4.7.). Der lineare Bereich umfasste den Bereich, in dem entsprechend einer zunehmenden Proteinbeladung eine zunehmende Bindung von GST-TRD an die Beads festzustellen war. Abb. 26 zeigt den immunologischen Nachweis der erfolgreichen Immobilisation. In ansteigender Proteinbeladung wurden die Proben hierfür in einem 8 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper inkubiert. Durch Auswertung der Signale konnte die Abhängigkeit der Bindung von der eingesetzten Proteinmenge bestimmt und graphisch dargestellt werden. Die ersten Waschüberstände wurden mit auf das Gel aufgetragen, um nicht gebundenes Protein detektieren zu können.

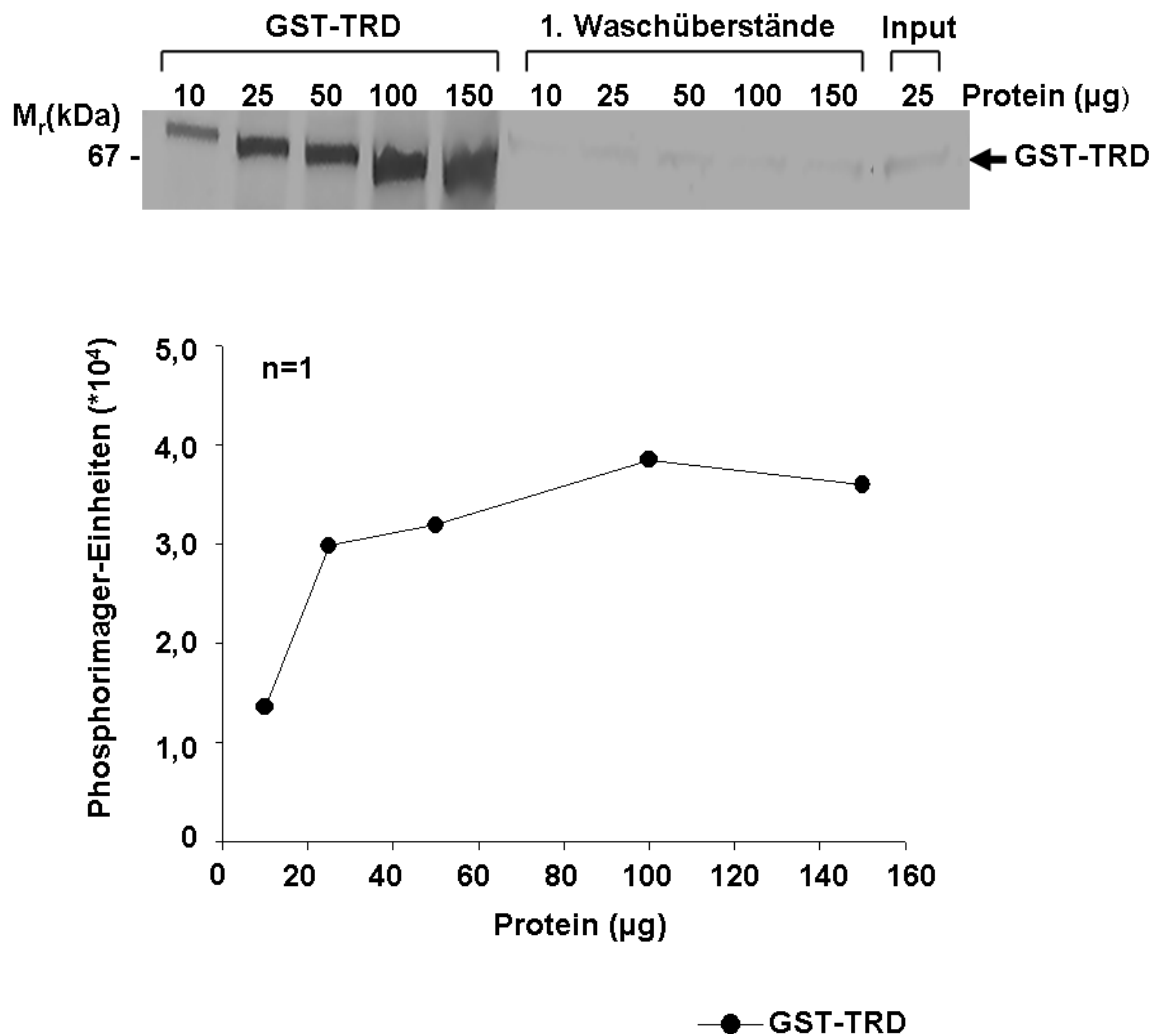


Abb. 26: Bindung von GST-TRD an Glutathion-Agarose

Dargestellt ist der immunologische Nachweis der Immobilisierung von GST-TRD an Glutathion-Agarose mittels Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Analyse-gel. Der visuelle Nachweis mit NBT und BCIP erfolgte im Rahmen eines Einzelex-periments (n=1). 5 verschiedene Proteinmengen (10-150 µg GST-TRD) wurden an jeweils 100 mg Glutathion-Agarose-Beads gebunden. Die 1. Waschüberstän-de der jeweiligen Proben wurden in gleicher Reihenfolge aufgetragen. Ferner wurde eine sogenannte „Input“-Probe, entsprechend 25 µg ungebundenem Aus-gangsprotein, als Kontrollprobe geladen. Der untere Teil der Abb. zeigt die Ab-hängigkeit der Bindung von GST-TRD an die Glutathion-Agarose von der ein-gesetzten Proteinmenge nach Auswertung der Phosphorimager-Signale anhand eines Diagramms.

4.7.3. Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V an GST-TRD

In einem 2. Schritt wurde in jeweils ansteigender Proteinkonzentration das in Lösung befindliche und von den Sf21-Zellen produzierte *CASQ2*-WT (10-150 µg) und *CASQ2*-I161V (15-750 µg) an jeweils 25 µg des immobilisierten und gereinigten GST-TRD gebunden. Diese Proteinmenge war gemäß des in Abb. 26 dargestellten Diagramms im linearen Bereich der Messung (vgl. 4.7.2.). Der „Pull-Down“-Assay erfolgte zunächst in Anwesenheit von 0 mM Ca^{2+} . Abb. 27 demonstriert das Bindungsverhalten von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V an GST-TRD anhand eines Western Blots. Neben den Proben für *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V wurden „Input“-Proben geladen, die 50 µg *CASQ2*-WT bzw. 75 µg *CASQ2*-I161V ungebundenes Ausgangsprotein (Homogenat) enthielten. Weiterhin durchliefen zwei exemplarische Kontrollproben (K) für *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V die Kontrollreaktion des Assays (vgl. Abb. 14, S. 57). Hierbei erfolgten Inkubation, Waschen und Elution der *CASQ2*-Proben ohne vorherige Bindung an GST-TRD direkt mit dem immobilisierten Glutathion.

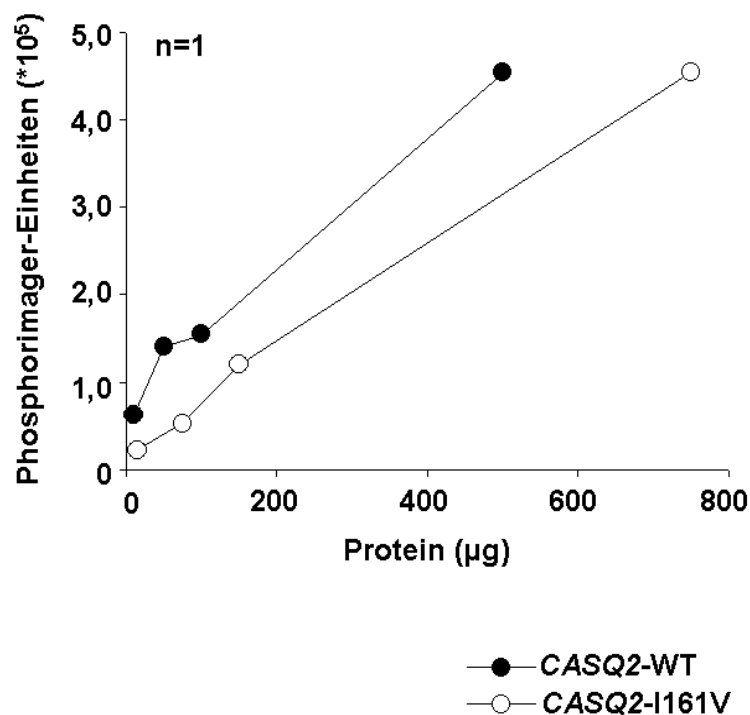
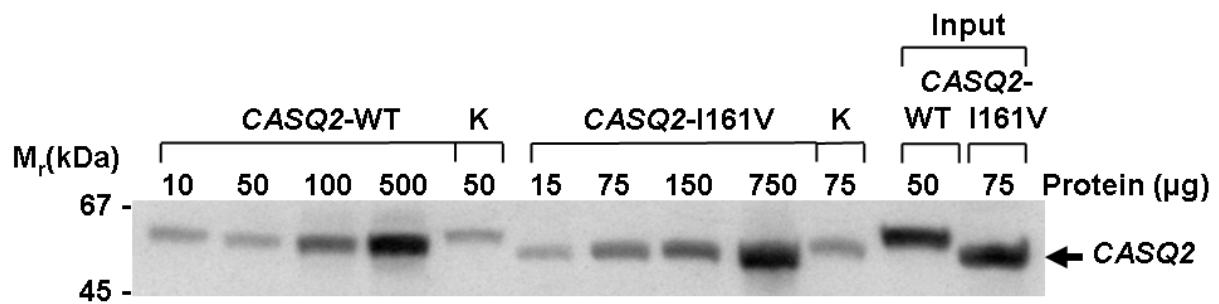


Abb. 27: Bindungsverhalten von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V an GST-TRD

Gezeigt wird ein Western Blot nach einem „Pull-Down“-Assay. In dem 8 %igen Analysegele nach Porzio erfolgte der immunologische Nachweis der Bindung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V an GST-TRD im direkten Vergleich. Der sekundäre Nachweis erfolgte mittels ^{125}I -Protein A. Für das Einzelerperiment (n=1) wurden Proben für *CASQ2*-WT mit jeweils 10, 50, 100 und 500 μg Protein geladen. Die Beladung für *CASQ2*-I161V betrug 15, 75, 150 und 750 μg Protein, was nach rechnerischer Anpassung zu *CASQ2*-WT entsprechende Proteinmengen

darstellte. Ferner wurden „Input“-Proben geladen, die 50 µg *CASQ2*-WT bzw. 75 µg *CASQ2*-I161V ungebundenes Ausgangsprotein enthielten. Die mit „K“ bezeichneten Proben für *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V durchliefen den Assay im Rahmen der Kontrollreaktion (vgl. Abb. 14, S. 57). Hierbei wurde jeweils eine exemplarische Probe für *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V ohne vorherige Bindung an GST-TRD direkt mit dem immobilisierten Glutathion inkubiert, gewaschen und eluiert. Man erkennt hier ebenfalls eine Bande in der für *CASQ2* charakteristischen Laufhöhe. Die Ca²⁺-Bindung an GST-TRD steigt nach Auswertung der Phosphorimager-Einheiten sowohl für *CASQ2*-WT als auch für *CASQ2*-I161V entsprechend der zunehmenden Proteinbeladung an. Dies wird durch ein Diagramm veranschaulicht.

Die Abschnitte 4.7. ff. konnten die erfolgreiche Etablierung eines „Pull-Down“-Assays zeigen. Das Versuchsergebnis (Abb. 27) zeigt, dass die Versuchsanordnung, wie hier durchgeführt, funktioniell ist. Die Bindung zu TRD von mutiertem *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form steigt mit zunehmender Proteinbeladung jeweils linear an. Die Untersuchungen sollten mit weiteren Messungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion komplettiert werden. Ferner sollten zwecks Optimierung der Versuchsanordnung modifizierte Bedingungen (z.B. Erhöhung der Salzkonzentration des Elutionspuffers, häufigeres Waschen der Proben) getestet werden. Die Planung bzw. Vorbereitung für solche weiteren Messungen erfolgte im Rahmen der Arbeit. Der Immunoblot der Abb. 28 zeigt einen Western Blot, der die erfolgreiche Expression und Solubilisierung der rekombinanten Proteine *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161 (aus Sf21-Insektenzellhomogenaten) für 5 unabhängige „Pull-Down“-Assays demonstriert. Die Herstellung dieser Proben erfolgte entsprechend des in Abschnitt 4.7.1. beschriebenen Verfahrens. Die verbliebenen Pellets stellten wiederum eine wichtige Kontrollprobe für unlösliche Proteine dar. Aus diesem Grund wurde jeweils ein exemplarisches Pellet für *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161 mit auf das Gel aufgetragen. Abb. 28 zeigt, dass *CASQ2* auch in den Pellets nachgeweisbar ist. Somit konnte nicht das gesamte *CASQ2* solubilisiert werden. Der Nachweis der exprimierten Zielproteine in Überständen und Pellets erfolgte nach quantitativer Analyse mittels Lowry-Standard im Western Blot-Verfahren im 8 %igen Analysegel nach Porzio.

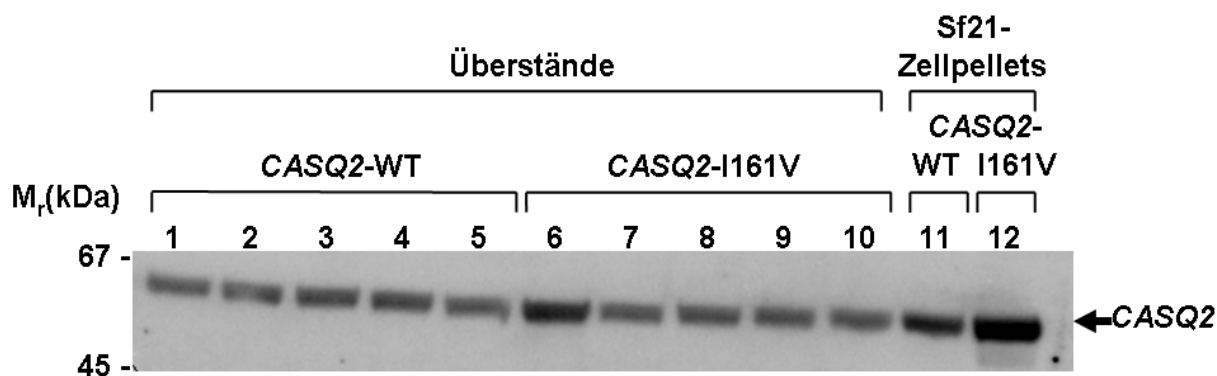


Abb. 28: Immunologischer Nachweis der Proteinexpression und Solubilisierung von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V für 5 unabhängige „Pull-Down“-Assays

Der immunologische Nachweis der Proteinexpression und Solubilisierung von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V für 5 unabhängige „Pull-Down“-Assays erfolgte im Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Porziogel. Pro Spur wurden jeweils 25 µg Protein aufgetragen. Der sekundäre Nachweis erfolgte mittels ¹²⁵I-Protein A. Die Proben für den Immunoblot waren entsprechend zu Abschnitt 4.7.1. aus Insektenzellhomogenaten in Lösung gebracht worden. Gelbeladung: (1-5): im Überstand befindliches, gelöstes *CASQ2* aus jeweils 5 Proben für *CASQ2*-WT; (6-10) im Überstand befindliches, gelöstes *CASQ2* aus jeweils 5 Proben für *CASQ2*-I161V; (11) Kontrollprobe für im Sf21-Zellpellet zurückgebliebenes *CASQ2*-WT; (12) Kontrollprobe für im Sf21-Zellpellet zurückgebliebenes *CASQ2*-I161V

4.8. Nativgel zur Beurteilung des Faltungszustands von mutiertem *CASQ2* und Wildtyp-*CASQ2*

CASQ2 oligomerisiert nach Bindung von Ca²⁺-Ionen (Park et al. 2003, 2004). Ob die I161V-Mutation zu einer veränderten Oligomerisation im Vergleich zur Wildtyp-Form führt, sollte anhand eines Nativgels beurteilt werden. Bei dieser Variante der Gelelektrophorese wurde auf jegliche denaturierende Bestandteile verzichtet (kein SDS oder DTT, kein Kochen der Proben; vgl. 3.4.3.ff.). Hierdurch sollte das Laufverhalten von nativem, d.h. natürlich gefaltetem *CASQ2* im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel beurteilt werden. Die Herstellung der Gele erfolgte hierfür nach Standardrezepturen für Laemmli-Nativgele (6.1.). Es

wurde das Laufverhalten von humanem unmutiertem *CASQ2*, humanem mutiertem *CASQ2* sowie von Wildtyp-Hunde-*CASQ2* nach einer 10-stündigen Gelelektrophorese unter 0 mM Ca^{2+} direkt verglichen. Hiermit sollten mögliche Unterschiede im Laufverhalten der verschiedenen *CASQ2*-Proben festgestellt werden. Als Lösungsmittel für die Sf21-Insektenzellhomogenate diente Histidin-Saccharose-Puffer (6.1.). Die folgende Abb. 29 zeigt ein Autoradiogramm des Nativgels nach sekundärer Detektion mit ^{125}I -Protein A.

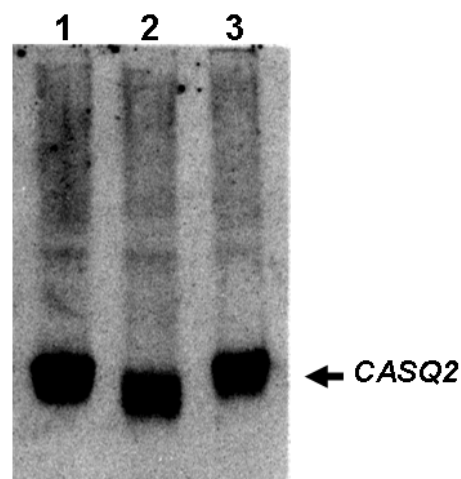


Abb. 29: Vergleich des Laufverhaltens von humanem unmutiertem *CASQ2* und humanem mutiertem *CASQ2* anhand eines Nativgels

Die Abb. zeigt ein Nativgel nach Durchlaufen einer 10-stündigen Gelelektrophorese unter 0 mM Ca^{2+} . Unmutiertes (1) und mutiertes *CASQ2* (2) wurden nacheinander aufgetragen. Als Kontrolle diente Wildtyp-*CASQ2* des Hundes (3). Insgesamt wurden jeweils 50 μg Protein pro Spur aufgetragen. Die autoradiographische Detektion erfolgte unter Benutzung von ^{125}I -Protein A in einem STORM-Phosphorimager.

Der Einsatz eines Nativgels diente somit der Beurteilung einer möglichen veränderten Oligomerisation der I161V-Mutation im Vergleich zum humanen Wildtyp-*CASQ2*. Als Kontrolle diente Wildtyp-*CASQ2* des Hundes. Das in Abb. 29 dargestellte Ergebnis entstand unter Einsatz von 0 mM Ca^{2+} und zeigt für alle 3 Proben erwartungsgemäß eine monomere Struktur (Park et al. 2003, 2004) bei geringfügigen Unterschieden der Laufhöhen von humanem *CASQ2* im Vergleich zum Wildtyp-*CASQ2* des Hundes.

4.9. Herstellung eines rekombinanten Adenovirus

4.9.1. Adenovirale Überexpression von *CASQ2*-WT und *CASQ2*-I161V

Die Herstellung der rekombinanten *CASQ2*-Adenovirus-DNS erfolgte in mehreren Teilschritten. Die I161V-Mutante des *CASQ2*, die im Rahmen der gerichteten Mutagenese (4.2.) aus humaner Wildtyp-*CASQ2*-cDNS künstlich hergestellt worden war, wurde hierfür zunächst aus dem pAlter-Vektor, in den die mutierte cDNS einkloniert worden war, mittels Restriktionsverdau (NotI, EcoRV) ausgeschnitten, in *E. coli* Top10F-Zellen transformiert und nach präparativer Aufarbeitung in entsprechende Schnittstellen des pBluescript II KS-Vektors einkloniert. Der erfolgreiche Klonierungsnachweis der I161V-Mutante (pBs-*CASQ2*-I161V) erfolgte zeitgleich mit der humanen *CASQ2*-WT-cDNS (pBs-*CASQ2*-WT), die ebenfalls in dem pBluescript-Vektor vorlag (vgl.3.3.1.). Nach Restriktionsverdau mittels NotI und EcoRV, Transformation in *E. coli* JM109-Zellen und präparativer Aufarbeitung erfolgte die Auftrennung der Fragmente von pBs-*CASQ2*-WT und pBs-*CASQ2*-I161V mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Die folgende Abb. 30 zeigt die Fotografie einer Restriktionsanalyse von pBs-*CASQ2*-WT und pBs-*CASQ2*-I161V im 1 %igen Agarosegel.

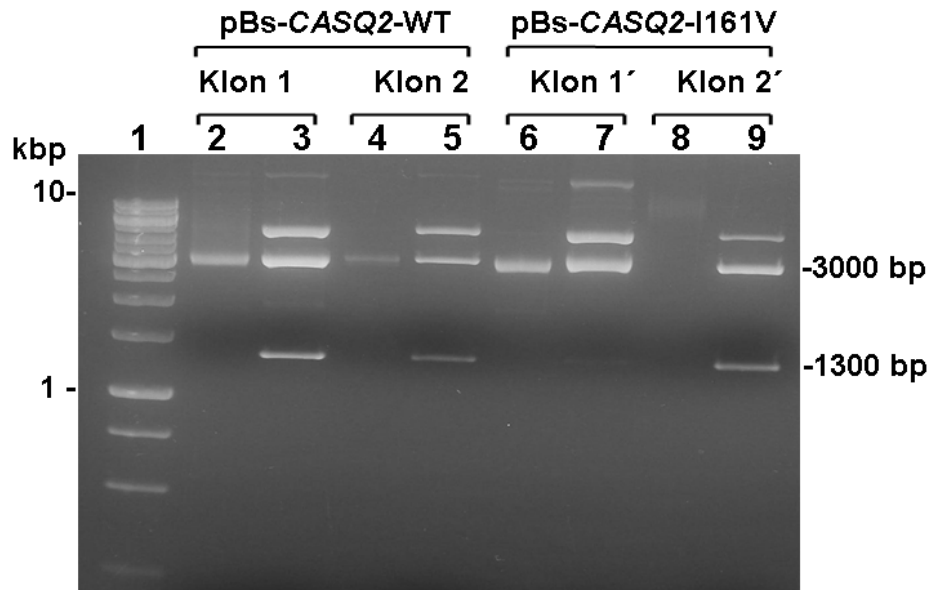


Abb. 30: Restriktionsanalyse von pBs-*CASQ2*-WT und pBs-*CASQ2*-I161V

Dargestellt ist die Fotografie einer Agarose-Gelelektrophorese, die die erfolgreiche Klonierung von jeweils 2 verschiedenen Klonen von pBs-*CASQ2*-WT und pBs-*CASQ2*-I161V zeigt. Die cDNS von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V war zuvor aus dem pAlter-Vektor mithilfe der Restriktionsenzyme EcoRV und NotI ausgeschnitten und in die EcoRV/NotI-Schnittstellen des pBluescript-Vektors inkloniert worden. Die unverdauten Proben von pBs-*CASQ2*-WT (**2 und 4**) und pBs-*CASQ2*-I161V (**6 und 8**) sind im Wechsel mit den verdauten Proben von pBs-*CASQ2*-WT (**3 und 5**) bzw. pBs-*CASQ2*-I161V (**7 und 9**) zu vergleichen. Diese sind an der zusätzlichen Bande bei ca. 1300 bp zu erkennen (humanes *CASQ2*: 1197 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNS-Leiter (**1**). Die Größenangabe in Kilo-Basenpaaren (kbp) befindet sich am linken Bildrand.

Nach erneutem Restriktionsverdau mit NotI und EcoRV, Transformation in *E. coli* JM109-Zellen und anschließender Minipräparation erfolgte die Einklonierung in entsprechende Schnittstellen des Shuttlevektors pAdTrack-CMV (pAdTrack-*CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V). Für eine anschließende homologe Rekombination mit der pAdEasy-1 Adenovirus-DNS (He et al. 1998) erfolgte die Linearisierung der aufgearbeiteten pAdTrack-*CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V Plasmide mit dem Restriktionsenzym PmeI. Bei diesem Enzym handelt es sich um einen sog. single

cutter. Dies bedeutet, dass nach Verdau der Proben mit diesem Enzym eine linearisierte Plasmid-DNS entsteht, die anhand einer einzelnen Bande im Agarosegel identifiziert werden kann. Die folgende Abb. 31 zeigt die Fotografie der Kontrollelektrophorese von pAdTrack-CASQ2-WT und pAdTrack-CASQ2-I161V nach Restriktionverdau mit PmeI und DNS-Aufreinigung.

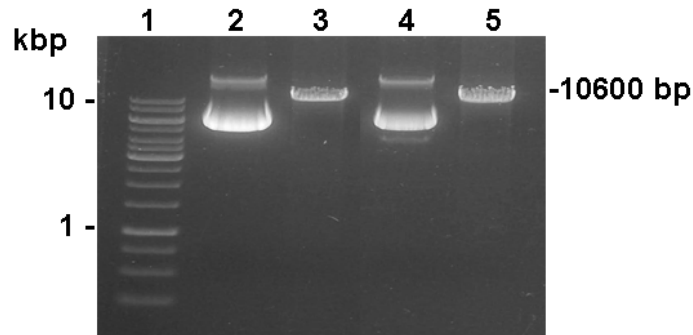


Abb. 31: Kontrollelektrophorese von pAdTrack-CASQ2-WT und pAd-Track-CASQ2-I161V nach Restriktionverdau mit PmeI und DNS-Aufreinigung

Gezeigt wird die Fotografie einer Gelelektrophorese von präparativ aufgearbeiteter Plasmid-DNS. Aufgetragen wurde neben einer unverdauten (2) pAd-Track-CASQ2-WT und einer unverdauten (4) pAd-Track-CASQ2-I161V Kontrollprobe die entsprechend mit PmeI linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNS pAd-Track-CASQ2-WT (3) und pAd-Track-CASQ2-I161V (5). Der Nachweis erfolgte im 1 %igen Agarosegel. Als Größenstandard diente eine 1 kb DNS-Leiter (1). Die Größenangabe in Kilo-Basenpaaren (kbp) befindet sich am linken Bildrand.

Mittels Hitzeschock erfolgte die anschließende Kotransformation in chemisch kompetent gemachte *E. coli* BJ5183-Zellen mit linearisierter pAdTrack-CASQ2-WT/CASQ2-I161V-DNS und zirkulärer pAdEasy-Virus-DNS. Abb. 32 zeigt die Fotografie des gelelektrophoretischen Nachweises der präparativ aufgearbeiteten pAdEasy-Virus-DNS nach Kontrollverdau mit BamHI und EcoRI. Der Verdau mit diesen Restriktionsenzymen erzeugt ein charakteristisches Spektrum.

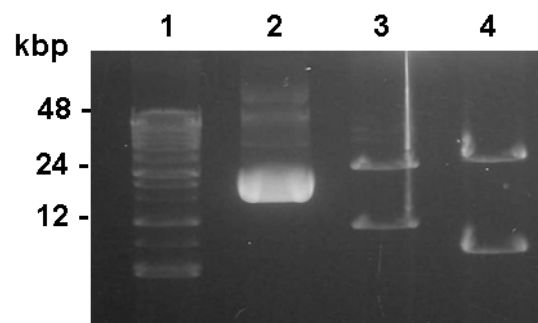


Abb. 32: Kontrollverdau von pAdEasy-Virus-DNS nach Restriktion mit BamHI und EcoRI.

Die DNS wurde unverdaut (**2**), dann jeweils verdaut mit BamHI (**3**) und EcoRI (**4**) auf das 0,3 %ige Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente eine Lamda-DNS-Leiter (**1**). Die Größenangabe in Kilo-Basenpaaren (kbp) befindet sich am linken Bildrand.

Durch die Hitzeschocktransformation und homologe Rekombination entstanden schließlich die rekombinanten Adenoviren pAdEasy-CASQ2-WT und pAdEasy-CASQ2-H161V. Durch einen Restriktionsverdau mit PacI konnte die rekombinante Adenovirus-DNS linearisiert und so die rechte und linke invertierte terminale Wiederholungssequenz, die für die Amplifikation des Virus erforderlich ist, zugänglich gemacht werden (vgl. Abb. 11 und 12, S. 42 und 43). Normalerweise rekombinieren der rechte und der linke Arm beider Vektoren miteinander, wodurch nach Restriktionsverdau mit PacI ein Fragment mit einer Größe von 3000 bp entsteht. In diesem Fall rekombinierten die Expressionsvektoren jedoch in der Weise, dass der rechte Arm und der bakterielle Replikationsursprung (Ori) aus dem Shuttle-Vektor mit der adenoviralen DNS rekombinierte, wodurch man entsprechend ein Fragment von 4500 bp anstelle der erwarteten 3000 bp nach Verdau mit PacI erhielt (Abb. 33). Dies bedeutet, dass es zu einer alternativen Möglichkeit der homologen Rekombination kam. Abb. 33 zeigt außerdem eine Fotografie des Verdau mit PacI.

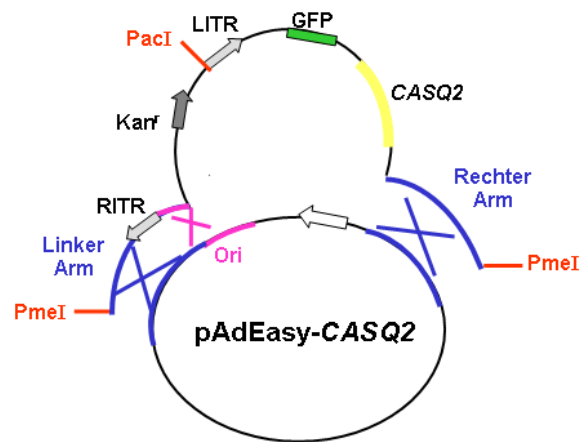
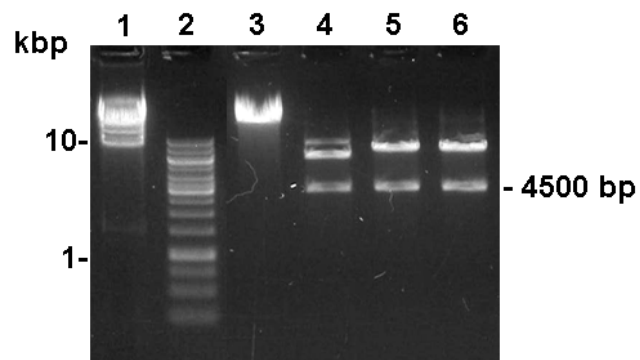
A**B**

Abb. 33: Kontrollverdau der rekombinanten Adenoviren-DNS, pAdEasy-CASQ2-WT und pAdEasy-CASQ2-1161V

Gezeigt wird eine schematische Abb. zur alternativen homologen Rekombination von pAdEasy-1 und dem Shuttle-Vektor pAdTrack-CASQ2 (**A**). Hierbei rekombinieren der rechte Arm und der bakterielle Replikationsursprung (Ori) aus dem Shuttle-Vektor mit der adenoviralen DNS, wodurch man ein Fragment von 4500 bp anstelle der erwarteten 3000 bp nach Restriktionsverdau mit PacI erhält. Zum Nachweis diente ein 0,7 %iges Agarosegel (**B**). pAdEasy-1 (**2**), pAdEasy-CASQ2-WT (**4**) und pAdEasy-CASQ2-1161V (**5 und 6**) wurden nach Verdau mit dem

Restriktionsenzym PacI auf das Gel aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde eine Lambda DNS-Leiter **(1)** und eine 1 kb-DNS-Leiter **(2)** mit aufgetragen. Die Größenangabe in Kilo-Basenpaaren (kbp) befindet sich am linken Bildrand. GFP: EGFP-Reportergen; Amp^r: Ampicillin-Resistenz; Kan^r: Kanamycin-Resistenz; LITR: Linke invertierte terminale Wiederholungssequenz; RITR: Rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz; PacI: Restriktionsenzym PacI; *CASQ2*: kodierende Sequenz des Calsequestrins; Ori: Replikationsursprung des pAdEasy-1-Vektors

4.9.2. Amplifikation der rekombinanten Adenoviren in HEK293-Zellen

Die Amplifikation von pAdEasy-*CASQ2*-WT und pAdEasy-*CASQ2*-I161V erfolgte nach Transfektion in humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen), da diese in der Lage sind, die Genprodukte der deletierten Bereiche ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) von pAdEasy-1 zu komplettieren und infektiöse, aber replikationsdefiziente Viren (Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V) zu bilden. Die einzelnen Amplifikationsschritte erfolgten hierbei mit den entstandenen adenoviralen Überständen der jeweils vorherigen Infektion (vgl. 3.3.3.6.). Hiermit wurden die HEK293-Zellen jeweils infiziert und so das Virus in mehreren Schritten amplifiziert. Zur Charakterisierung einer erfolgreichen Virusproduktion diente einerseits die Betrachtung von Ad5-*CASQ2*-I161V-transfizierten HEK293-Zellen unter UV-Licht. Eine grüne Fluoreszenz zeigte hierbei eine Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) an und war ein Zeichen für eine erfolgreiche Virusproduktion (Abb. 34). Zusätzlich erfolgte eine immunzytochemische Analyse der erfolgreichen Virusproduktion durch die Markierung von *CASQ2* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3. Hierfür wurden die adenoviral infizierten HEK293-Zellen zunächst mit Methanol fixiert und mit PBS-Puffer (6.1.) gewaschen. Nach Inkubation mit einem spezifischen anti-*CASQ2*-Antikörper erfolgte schließlich die sekundäre Detektion des *CASQ2* mit dem Cy3-konjugierten Antikörper. Nach Kontrastfärbung mit DAPI konnten die Zellen unter UV-Licht betrachtet werden. Eine rote Fluoreszenz zeigte hierbei die erfolgreiche Expression von *CASQ2* an (Abb. 34). Durch eine doppelte Fluoreszenz entstand schließlich ein Mischbild (Abb. 34). Dieses zeigte neben der Expression des GFP auch das mit Cy3 markierte *CASQ2* an. Eine gelb-orangefarbene Fluoreszenz galt als Beweis dafür, dass sowohl das GFP als auch das *CASQ2* kolokalisieren.

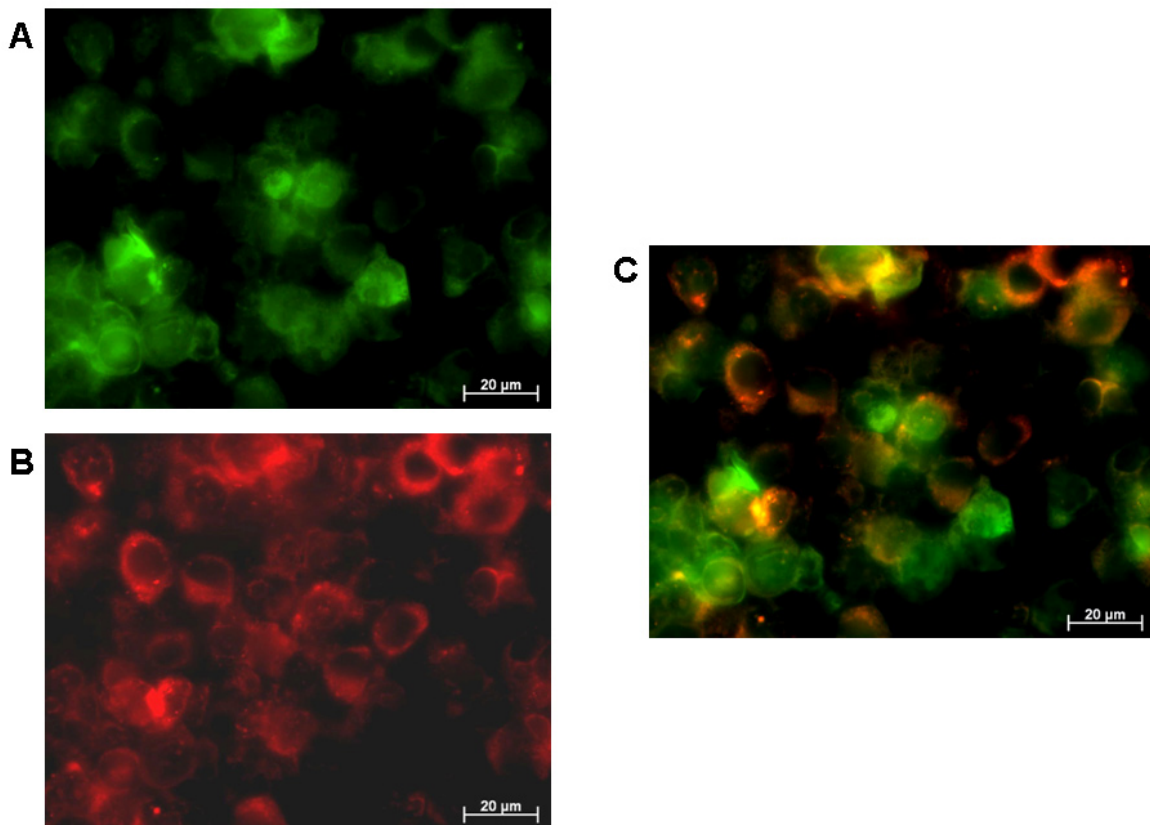


Abb. 34: Adenovirale Infektion von HEK293-Zellen

Diese Aufnahmen zeigen Ad5-*CASQ2*-I161V-infizierte HEK293-Zellen bei Betrachtung im Lichtmikroskop unter UV-Licht. Die infizierten HEK293-Zellen waren zuvor für 48 h in virushaltigem Medium kultiviert worden. In diesem Stadium produzieren die Zellen das grün fluoreszierende Protein (GFP), das als Marker für eine erfolgreiche Virusproduktion diente (**A**). Zusätzlich erfolgte die Markierung von *CASQ2* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (**B**), der sich bei Betrachtung im Lichtmikroskop unter UV-Licht durch eine rote Fluoreszenz auszeichnet. Schließlich ist ein Mischbild dargestellt (**C**). Die gelb-orangefarbene Fluoreszenz zeigt neben der Expression des GFP auch das mit Cy3 markierte *CASQ2* an.

4.9.3. Immunologischer Nachweis der Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V in HEK-Zellen

Der immunologische Nachweis der Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V erfolgte mittels Western Blot-Verfahren (Abb. 35). Hierdurch erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der erfolgreichen Virusproduktion.

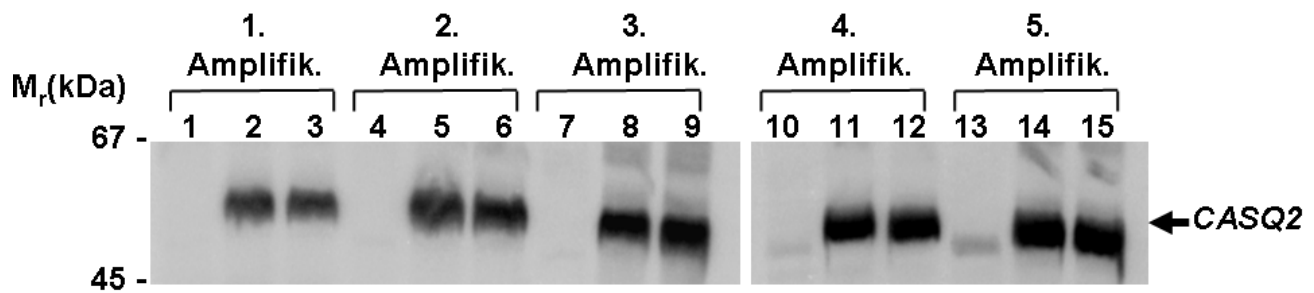


Abb. 35: Immunologischer Nachweis der Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V in HEK293-Zellen.

Die Abb. demonstriert die Amplifikation von Viren in HEK293-Zellen anhand von Western Blots. Pro Spur wurden jeweils 50 µg Protein auf die 8 %igen Porziosgele aufgetragen. Der zum immunologischen Nachweis verwendete Antikörper richtete sich gegen das *CASQ2*, das auf einer Laufhöhe von 55 kDa (Molmassenstandard (M_r) am linken Bildrand) identifiziert wurde. Als sekundäres Nachweisreagenz diente ^{125}I -Protein A. Gezeigt sind die einzelnen Amplifikationsschritte (1. Amplifik.-5. Amplifik.) als Zeichen der zunehmenden Viruskonzentration/Proteinexpression in den HEK-Zellen. Als Kontrollprobe dienten native HEK-Zellen. Hier sieht man keine Bande in der für *CASQ2* charakteristischen Laufhöhe. Die Gelbeladung ist identisch für die einzelnen Amplifikationsschritte. Die Spuren 1, 4, 7, 10 und 13 zeigen die jeweiligen HEK-Zellen-Kontrollproben, die Spuren 2, 5, 8, 11 und 14 die jeweiligen Proben für Ad5-*CASQ2*-WT und die Spuren 3, 6, 9, 12 und 15 die jeweiligen Proben für Ad5-*CASQ2*-I161V.

4.9.4. Adenovirale Infektion von neonatalen Maus-Kardiomyozyten

Neonatale Maus-Kardiomyozyten wurden nach einem modifizierten Protokoll von Kliche et al. (2006) isoliert, kultiviert und mit einer MOI von 25-200 in serumhaltigem Kulturmedium infiziert. Der immunologische Nachweis der Proteinexpression in den Maus-Kardiomyozyten erfolgte mittels Western Blot-Verfahren in einem 8 %igen Porzio-Analysegele (Abb. 36).

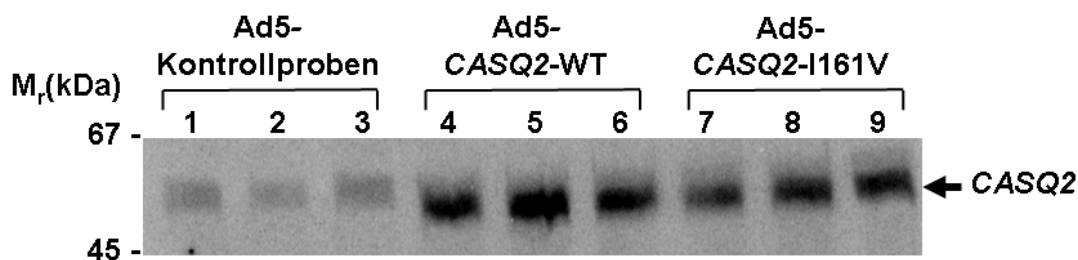


Abb. 36: Immunologischer Nachweis der Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V in neonatalen Maus-Kardiomyozyten

Die Abb. erbringt den Nachweis der erfolgreichen Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V in neonatalen Maus-Kardiomyozyten anhand eines Western Blots. Pro Spur wurden jeweils 50 µg Protein auf das 8 %ige Porziogel aufgetragen. Der zum immunologischen Nachweis verwendete Antikörper richtete sich gegen das *CASQ2*, das auf einer Laufhöhe von 55 kDa (Molmassenstandard (M_r) am linken Bildrand) identifiziert wurde. Als sekundäres Nachweisreagenz diente ^{125}I -Protein A. Gelbeladung: **(1-3)** Ad5-Kontrollproben aus jeweils 3 unterschiedlichen Infektionen; **(4-6)** Ad5-*CASQ2*-WT aus jeweils 3 unterschiedlichen Infektionen; **(7-9)** Ad5-*CASQ2*-I161V aus jeweils 3 unterschiedlichen Infektionen.

Die Abschnitte 4.9. ff. belegen die im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführte adenovirale Überexpression von humanem *CASQ2*-I161V. In diesem Zusammenhang wurden zunächst die erfolgreichen Klonierungen von *CASQ2*-WT/*CASQ2*-I161V in den pBluescript-Vektor und in den pAdTrack-Vektor anhand von Kontrollverdauen demonstriert. Weitere Kontrollverdauungen zeigten die pAdEasy-Virus-DNS und die homologe Rekombination dieser pAdEasy-Virus-DNS mit dem rekombinanten Shuttle-Vektor pAdTrack. So konnte die erfolgreiche Herstellung der rekombinanten Adenovirus (Ad5-)DNS gezeigt werden. Zur Charakterisierung einer erfolgreichen Virusproduktion diente einerseits die Betrachtung von Ad5-*CASQ2*-WT/Ad5-*CASQ2*-I161V-transfizierten HEK-Zellen unter UV-Licht. Der zusätzliche Nachweis über die erfolgreiche Expression der rekombinanten Adenoviren in HEK-Zellen erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Schließlich konnte der immunologische Nachweis der Proteinexpression von Ad5-*CASQ2*-WT und Ad5-*CASQ2*-I161V in neonatalen Maus-Kardiomyozyten nach deren adenoviraler Infektion anhand eines Western Blots demonstriert werden.

5. Diskussion

Die hereditäre CPVT ist charakterisiert durch stressinduzierte Synkopen, ventrikuläre Extrasystolen und polymorphe ventrikuläre Tachykardien, die in Kammerflimmern bis hin zum plötzlichen Herztod degenerieren können. Kennzeichnend sind u.a. Störungen im Rahmen der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase, deren Folgen eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung und daraus resultierende späte Nachdepolarisationen (DADs) sind. Oft liegt eine getriggerte Aktivität zugrunde (Leenhardt et al. 1995; Mohamed et al. 2007). Mutationen im *CASQ2*-Gen gelten als Ursache der sog. CPVT-2, eine in der Regel rezessiv vererbte Form dieser Erkrankung, die, unabhängig von der Lokalisation oder Art der Mutation im *CASQ2*-Gen, CPVTs in unterschiedlich starker Ausprägung hervorrufen. Die Mortalität liegt bei 30-50 % bis zum 30. Lebensjahr (Fisher et al. 1999, Terentyev et al. 2006).

Bislang konnten die genauen subzellulären Mechanismen dieser potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung nicht vollständig aufgedeckt werden, jedoch verfolgen klinische und experimentelle Studien die Hypothese, dass Calsequestrin neben seiner Aufgabe als Hauptspeicherprotein für Ca^{2+} -Ionen zu dienen, zudem eine essentielle Regulatorfunktion im Rahmen des intrazellulären Ca^{2+} -Handlings besitzt, indem es eine Hemmung des RyR-Rezeptors unter erhöhter intraluminaler Ca^{2+} -Beladung des SR bewirkt (z.B. nach β -adrenerger Stimulation). Es werden verschiedene zugrunde liegende Mechanismen diskutiert, die eine veränderte Aktivität und/oder Speicherkapazität des mutierten *CASQ2* bewirken. Unterschiedliche *CASQ2*-Genmutationen führen beispielsweise zu einer erniedrigten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit im Vergleich zu Wildtyp-*CASQ2* (Viatchenko-Karpinski et al. 2004; di Barletta et al. 2006; Kirchhefer et al. 2010). Ferner wird vermutet, dass *CASQ2*-Genmutationen die Ca^{2+} -Freisetzung beeinträchtigen (Knollmann et al. 2006; Terentyev et al. 2006, 2008). In der Folge solcher Störungen kann sich die Funktion des SR- Ca^{2+} -Freisetzungskomplexes, der neben CSQ aus dem RyR-Rezeptor sowie den Ankerproteinen TRD und JCN besteht, verändern. In diesem Zusammenhang weisen einige *CASQ2*-Genmutationen ein verändertes Bindungsverhalten zum TRD gegenüber ihrer Wildtyp-Form auf (Kobayashi und Jones, 2000; Houle et al. 2004; Kim et al. 2007; Valle et al. 2008).

Unabhängig von der Art der mutationsbedingten Störung führen *CASQ2*-Mutationen letztendlich zu einer verzögerten RyR-Inaktivierung und zur Entstehung spontaner diastolischer Ca^{2+} -Transienten und DADs, die im Rahmen der CPVT als pathognomonisch gelten (Viatchenko-Karpinski et al. 2004; Houle et al. 2004; di Barletta et al. 2006).

Für ein besseres Verständnis der unterschiedlichen subzellulären Mechanismen im Rahmen der CPVT besteht die Aufgabe der medizinischen Forschung darin, neue *CASQ2*-Mutationen zu identifizieren und zu charakterisieren, insbesondere um neue therapeutische Ansätze für die betroffenen Patienten testen zu können. Die hier vorliegende medizinische Dissertation beschäftigte sich daher mit der neu identifizierten Punktmutation I161V im humanen *CASQ2*-Gen. Diese Mutation führt bei einer klinisch symptomatischen Familie zu CPVTs unterschiedlicher Ausprägung innerhalb der einzelnen Genträger.

5.1. Beziehung zwischen dem Genotyp der I161V-Mutation und dem klinischen Phänotyp

Die klinische Manifestation der durch die *CASQ2*-I161V-Mutation hervorgerufenen Arrhythmien ließ sich anhand der uns vorliegenden Patientenakten (Patientenakten des Klinikums Braunschweig, Medizinische Klinik 2; Patientenakten des Universitätsklinikums Münster, Medizinische Poliklinik C, 2005/2008) herausarbeiten. So leidet insbesondere die hauptbetroffene Patientin P. R. an Rhythmusstörungen, die sie subjektiv als Herzstolpern und Herzrasen wahrnimmt. Die Symptome, die regelmäßig von Schwindel und damit einhergehenden Prä-/Synkopen begleitet werden, bestehen seit der Jugend der Patientin und treten mit zunehmendem Alter häufiger in Erscheinung. Auffällig ist eine starke Zunahme der Symptome in psychisch stressigen Lebenslagen der Patientin bzw. während emotionaler Anspannung, wobei ein plötzliches Auftreten in den unterschiedlichsten alltäglichen Situationen (z.B. beim Führen eines Pkw) berichtet wird. Die Patientin weist ein funktionell und strukturell unauffälliges Herz auf, ohne Anhalt für das Vorliegen von angeborenen Syndromen wie z.B. Brugada-Syndrom, Long-QT-Syndrom oder Short-QT-Syndrom. Anhand einer während einer Episode von symptomatischem Herzrasen entstandenen EKG-Aufzeichnung

der Patientin (Klinikum Braunschweig, 2005; vgl. Abb. 15, S. 61) zeigte sich ein CPVT-typisches pathologisches Korrelat aus nicht anhaltenden polymorphen Extrasystolen.

Vergleicht man die hier zusammengefasste klinische Manifestation der durch die *CASQ2*-I161V-Mutation hervorgerufenen Arrhythmien mit dem klassischen Bild einer klinisch manifesten CPVT, wie es einleitend beschrieben wurde (vgl. 1.1.), bestehen auffällige Parallelen. So bestehen die Symptome der Patientin seit dem Jugendalter und treten regelmäßig unter Stress auf. Ferner liegt ein funktionell und strukturell unauffälliges Herz sowie ein EKG-typisches Korrelat vor. Allerdings fallen auch einige deutliche Unterschiede auf:

1. Das klinische Bild der durch die *CASQ2*-I161V-Mutation hervorgerufenen Arrhythmien aggraviert mit zunehmendem Alter der Patientin stetig. Dies steht im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutationen im *CASQ2*-Gen, bei denen das klinische Bild im Kindes-/Jugendalter der Patienten jeweils am stärksten ausgeprägt war bzw. sich im Laufe des Lebens regelmäßig eher zunehmend rückbildete (Lahat et al. 2001, 2004; Postma et al. 2002; Kirchhefer et al. 2010). Welche Ursachen diesem Unterschied zugrunde liegen, ist derzeit unklar.

2. Aus den Patientenakten geht hervor, dass die hauptbetroffene Patientin in einigen Fällen in der Lage ist, die durch die I161V-Mutation hervorgerufenen Symptome mittels eines vagalen Manövers (z.B. Eiswasser trinken) positiv zu beeinflussen oder sogar in Regression zu bringen. Ferner scheinen körperliche Belastungen wie Sport und andere aktive Freizeitaktivitäten präventiv zu wirken. Interessanterweise widerspricht dies ebenfalls der eigentlichen Theorie über die *CASQ2*-Genmutationen, bei der ventrikuläre Tachykardien und Synkopen sowohl im Zusammenhang mit emotionaler Erregung als auch mit körperlicher Anstrengung stehen (Leenhardt et al. 1995; Swan et al. 1999; Priori et al. 2002).

Man kann bei der durch die I161V-Mutation hervorgerufenen klinischen Manifestation also nicht von einer klassischen CPVT sprechen. Die Tatsache, dass körperliche Aktivität präventiv zu wirken scheint, könnte beispielsweise durch eine Senkung der (basalen) Herzfrequenz, wie sie durch chronische sportliche Aktivität bzw. auch durch ein vagales Manöver hervorgerufen wird, erklärt werden. Möglicherweise könnte hierin ein Anhaltspunkt für eine mögliche positive Beein-

flussung des durch die I161V-Mutation hervorgerufenen Krankheitsverlaufs vorliegen - eine Hypothese, für die es derzeit allerdings noch keine ausreichenden Antworten gibt und die interessante Forschungsansätze bieten könnte, insbesondere im Hinblick auf die Suche nach therapeutischen Optionen im Rahmen der Erkrankung.

Eindeutig scheint dagegen die hereditäre Genese der Erkrankung zu sein, denn neben der hauptbetroffenen Patientin P. R. zeigen sowohl die Schwester als auch die Mutter stressinduzierte Episoden von Herzrasen und Herzstolpern, wobei im Gegensatz zu der Patientin bisher weder bei der Schwester noch bei der Mutter Prä/Synkopen bekannt wurden. Den genetischen Nachweis der I161V-Mutation erbrachten DNS-Analyse-Assays (Schulze-Bahr et al. 2001; Neu et al. 2010). Hierbei wurde das zu analysierende *CASQ2*-Gen in Internet-zugänglichen Datenbanken gesucht und deren cDNS mittels der genomischen DNS der Patientin abgeglichen. Es wurden Intron-spezifische Genprimer entwickelt, die zur Amplifikation und anschließenden Sequenzierung der DNS notwendig waren. So wurde die komplette kodierende Sequenz des *CASQ2*-Gens untersucht. Die Ergebnisse der Messungen zeigten, dass sowohl die hauptbetroffene Patientin als auch deren Mutter eine heterozygote (nur ein Allel betroffen) Veränderung im *CASQ2*-Gen aufweisen, bei gleichzeitig negativem Ergebnis für andere bekannte Mutationen im *CASQ2*- und *RyR*-Gen.

Die Tatsache, dass bei der ebenfalls von stressinduzierten Rhythmusstörungen betroffenen Schwester der Patientin aus hier nicht bekannter Ursache kein Mutationsnachweis gelang, erschwert allerdings die Einordnung der I161V-Mutation in ein bestimmtes Vererbungsmuster. So lassen der zur Verfügung stehende Stammbaum, der insgesamt nur 3 betroffene Personen innerhalb von 2 Generationen benennt (vgl. Abb. 16, S. 62), und die zurzeit vorhandenen genetischen Informationen über *CASQ2*-I161V noch keine eindeutige Aussage über das Vererbungsmuster zu. Betrachtet man die bisher beschriebenen Mutationen im *CASQ2*-Gen (z.B. D307H; Lahat et al. 2001), so werden diese in der Regel über einen autosomal-rezessiven Erbgang (nur homozygote Mutationsträger mit klinischer Manifestation) vererbt (<http://www.fsm.it/cardmoc>). Zunehmend werden aber auch *CASQ2*-Mutationen beschrieben, die eine heterozygote Veränderung im *CASQ2*-Gen aufweisen. Dies weist eher auf eine autosomal-dominante Vererbung hin. So könnten beispielsweise die *CASQ2*-Genmutationen R33Q und

K206N autosomal-dominant vererbt werden. (Postma et al. 2002; Kirchhefer et al. 2010). Auch *CASQ2*-I161V weist eine heterozygote Veränderung im *CASQ2*-Gen auf und könnte somit autosomal-dominant vererbt werden. In der Tatsache der unterschiedlich starken Ausprägung der symptomatischen Rhythmusstörungen zwischen den Generationen (die Mutter ist im Gegensatz zu der hauptbetroffenen Patientin P. R. kaum von Rhythmusstörungen betroffen) könnte darüber hinaus ein Hinweis auf eine unterschiedliche Penetranz zwischen den Generationen oder sogar ein multifaktorieller Hintergrund, also ein Zusammenspiel verschiedenster Einflüsse (z.B. Genetik, Lebensgewohnheiten, Umwelt) vorliegen. Dieses Zusammenspiel wurde bereits im Zusammenhang mit der *CASQ2*-Genmutation R33Q (Postma et al. 2002) vermutet. Weitere Untersuchungen (z.B. Zytogenetik, Molekulargenetik, Ahnenforschung) zum Vererbungsmodus der I161V-Mutation könnten interessante und neue Erkenntnisse bringen, sollten aber nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

5.2. Expression von *CASQ2*-I161V/*CASQ2*-WT in einem geeigneten Zellsystem

Zur initialen Charakterisierung der neu identifizierten *CASQ2*-Mutation I161V wurde ein geeignetes Expressionssystem für mutiertes humanes *CASQ2*, für die Wildtyp-Form von humanem *CASQ2* sowie für den Interaktionspartner TRD benötigt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Expression der *CASQ2*-Mutation in Sf21-Insektenzellen. Bei der Sf21-Insektenzelllinie handelt es sich um ein eukaryotisches, langjährig etabliertes Expressionsmedium mit unkomplizierter Handhabung, wobei die rekombinante Proteinexpression durch Baculoviren erfolgt (Miller et al. 1998). Die Baculoviren sind selbst nicht in der Lage, Wirbeltiere zu infizieren, so dass selbst potentiell kanzerogene oder toxische Proteine ohne höhere Sicherheitsvorkehrungen exprimiert werden können (King und Possee et al. 1992; Luckow und Summers et al. 1988; Miller et al. 1998). Die in Sf21-Insektenzellen exprimierten Proteine sind durch posttranslationale Modifikationen häufig noch funktionell aktiv. Ferner ist das rekombinante Protein in der Insektenzelle oft in der subzellulären Struktur lokalisiert, wo es auch im nativen Gewebe vorkommt (Ailor und Betenbaugh et al. 1999). *CASQ2*, welches normalerweise im SR der Kardiomyozyten zu finden ist, sollte also auch in der Insektenzelle in

SR-ähnliche Speichervesikel sezerniert werden. Ein entscheidender Vorteil der Sf21-Insektenzelllinie liegt darin, dass große Mengen rekombinantes Protein exprimiert werden können, wie sie für die geplanten Versuche notwendig sind.

Zuerst wurde die Expression von mutiertem und Wildtyp humanem *CASQ2* in Sf21-Insektenzellen nachgewiesen, wobei die menschliche cDNS von mutiertem und Wildtyp *CASQ2* nach Einklonierung in verschiedene Transfervektoren (pVL1393, pAchlTA) durch homologe Rekombination in das Baculovirusgenom eingebracht wurde. Ein erster Hinweis auf eine erfolgreiche homologe Rekombination in Insektenzellen durch Kotransfektion war bereits im Lichtmikroskop anhand einer typischen Vakuolisierung der Zellen erkennbar. Der gezielte Nachweis der Proteine erfolgte schließlich mittels Western Blot-Verfahren und entsprechenden Antikörpern gegen *CASQ2*. Entsprechende Sequenzierungen sicherten die Ergebnisse der Klonierungen zusätzlich auf Nukleotidebene ab. Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit der immunologische Nachweis der Expression von GST-TRD erbracht. Dieses durch Sf21-Insektenzellen exprimierte Fusionsprotein wurde hierfür im Western Blot-Verfahren mit einem spezifischen Anti-GST-Antikörper inkubiert und auf einer Höhe von 67 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins (GST: 27 kDa, TRD: 40 kDa), identifiziert.

5.3. Die I161V-Mutation im kardialen *CASQ2*-Gen und ihre funktionellen Auswirkungen auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase

Die in den Sf21-Insektenzellen überexprimierten Proteine wurden für Funktionsuntersuchungen zu Homogenaten verarbeitet und quantitativ bestimmt. Im Rahmen der Versuche zur funktionellen Charakterisierung von *CASQ2*-I161V konnte demonstriert werden, dass die Mutation zu einer veränderten Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Handlings führen könnte. So konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die I161V-Mutation zu einer erhöhten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit führt. Dieses konnte mittels „ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Overlay“-Assay gezeigt werden. Die Proteine wurden hierbei zunächst entsprechend ihrer Massen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Im Anschluss daran wurden die Membranen in einem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer inkubiert. Hierbei wurde eine Versuchsanordnung gewählt, bei der überschüssiges Ca^{2+} zur Verfügung stand (hier Verwendung von 1 mM CaCl_2), da die Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2* Ca^{2+} -abhängig ist (vgl. Abb. 21 C, S. 72). Berücksichtigt man die Limitie-

rung dieses Assays, die sich durch die Verwendung denaturierter Proteine ergibt (Benutzung von SDS und DTT), stellt diese Methode eine gut etablierte Möglichkeit zur Untersuchung der Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit von Proteinen dar (Czubryt et al. 1996).

Die kardiale Ca^{2+} -Homöostase wird u.a. durch die Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit des *CASQ2* bestimmt (Wang et al. 1998; Park et al. 2004). Diese wird hauptsächlich durch das C-terminale Ende des Proteins vermittelt, welches zu mehr als 50% aus negativ geladenen Aminosäuren besteht (Yano-Zarain-Herzberg et al. 1994). Am C-terminalen Ende werden für die Ca^{2+} -Bindung die AS 352-367 verantwortlich gemacht (Wang et al. 1998). Neben der spezifischen AS-Sequenz reguliert die Polymerisation des *CASQ2* die Ca^{2+} -Bindung dieses Proteins (Park et al. 2003). Diese wird u.a. durch die AS 337-357 (Gatti et al. 2001) vermittelt. Binden Ca^{2+} -Ionen an das *CASQ2*-Monomer, kommt es zunächst zu einer Dimerisierung, die bei weiterer Ca^{2+} -Bindung zu einer Polymerbildung des *CASQ2* führt (Hayakawa et al. 1994; Gatti et al. 2001).

Diese Charakteristika von *CASQ2* machen deutlich, dass Genmutationen zu potentiellen Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase führen können. In der Tat führt die Genmutation D307H beispielsweise zu einer erniedrigten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit im Vergleich zu Wildtyp-*CASQ2* (Viatchenko-Karpinski et al. 2004). Dies konnte mittels Herstellung eines die Mutation *CASQ2*-D307H tragenden rekombinanten Adenovirus und Expression in adulten Ratten-Kardiomyozyten gezeigt werden. Daraus resultiert ein erniedrigter Ca^{2+} -Gehalt im Zytosol mit in der Folge erniedrigten und verkürzten Amplituden Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Transienten (Viatchenko-Karpinski et al. 2004). Untersuchungen mit der *CASQ2*-Genmutation G112+5X (di Barletta et al. 2006) zeigten ähnliche Ergebnisse. Diese Mutation führt zu einem trunkierten Protein und beeinträchtigt somit die für die Ca^{2+} -Bindungskapazität wichtige Polymerisationsfähigkeit des *CASQ2*. Kürzlich konnten Untersuchungen mit der *CASQ2*-Genmutation K206N zeigen, dass eine gestörte Polymerisationsfähigkeit und erniedrigte Ca^{2+} -Bindungskapazität des mutierten *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form möglicherweise im Zusammenhang mit einer mutationsbedingt aufgetretenen zweiten N-Glykolisierungsstelle ($\text{K}^{206} \rightarrow \text{N-X-S/T}$) stehen könnte (Kirchhefer et al. 2010). Die Annahme, dass die Polymerisation im Rahmen der Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-I161V ebenfalls mutationsbedingt gestört sein könnte, bestätigt sich der-

zeit nicht. Dies konnte ein Nativgel zeigen, mit dem das natürliche Laufverhalten von humanem mutiertem *CASQ2*, humanem Wildtyp-*CASQ2* und Wildtyp-Hunde-*CASQ2* nach Durchlaufen einer 10-stündigen Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen (kein SDS, DTT oder Kochen der Proben) direkt verglichen wurde. Unter Einsatz von 0 mM Ca^{2+} stellten sich sowohl humanes mutiertes *CASQ2* und humanes nicht-mutiertes *CASQ2* als auch Wildtyp-Hunde-*CASQ2* als monomere Struktur dar (Park et al. 2003, 2004). Geringfügige Unterschiede in der Laufhöhe, wie sie in diesem Zusammenhang für das Wildtyp-Hunde-*CASQ2* beobachtet wurden, sind der größeren Anzahl von AS des Wildtyp-Hunde-*CASQ2* gegenüber humanem *CASQ2* geschuldet (Wildtyp-Hunde-*CASQ2* besitzt 11 AS mehr als humanes *CASQ2*; vgl Abb. 5, S. 13).

In einem Folgeprojekt sollte eine systematische Untersuchung der Mechanismen, die zu der erhöhten Ca^{2+} -Bindung von *CASQ2*-I161V führen, erfolgen. Dies wäre z.B. unter Benutzung eines die Mutation tragenden Tiermodells möglich. Außerdem sollten in einem integrativen Ansatz die Ankerproteine TRD und JCN näher untersucht werden. So ist es vorstellbar, dass eigenständige Mutationen in diesen beiden Genen eine CPVT auslösen könnten. Durch eine genetische Untersuchung von Patienten, die an idiopathischer CPVT leiden, könnte dieses Ziel erreicht werden.

5.4. Effekte der I161V-Mutation auf die SR- Ca^{2+} -Freisetzung

CASQ2 fungiert nicht nur als Ca^{2+} -Speicherprotein (Mitchell et al. 1988), sondern dient zudem als funktioneller Inhibitor der Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR bei erhöhter SR-luminaler Ca^{2+} -Konzentration (Gyorke et al. 2004). Erhöht sich das SR-luminale Ca^{2+} , lässt der hemmende Einfluss des *CASQ2* auf den RyR durch Besetzung der entsprechenden Bindungsstellen mit freien Ca^{2+} -Ionen nach. An der mechanischen und funktionellen Interaktion mit dem RyR sind die Proteine TRD und JCN unmittelbar beteiligt (Kobayashi et al. 1995; Zhang et al. 1997). Daher war es im Rahmen dieser Arbeit von großem Interesse, die Grundlagen für Untersuchungen zur Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von *CASQ2* mit TRD und/oder JCN zu schaffen. Hierzu erfolgten etablierende Messungen zur Durchführung eines „Pull-Down“-Assays. In Sf21-Insektenzellen überexprimiertes mutiertes und nicht-mutiertes *CASQ2* wurde hierfür zu Protein-Homogenaten verarbeitet

und quantitativ bestimmt. Bei der Durchführung des Assays diente an Agarose-Beads kovalent gebundenes Glutathion der Kopplung mit an GST gebundenem TRD (GST-TRD). An dieses Fusionsprotein wurde das mutierte und nicht-mutierte *CASQ2* gebunden. Nach dem Waschen und der Elution durch Glutathion oder durch Kochen erfolgte die Analyse der Interaktion von *CASQ2* mit TRD mittels SDS-PAGE. Erste Versuche unter Anwesenheit von 0 mM Ca^{2+} während des Bindungsversuchs konnten zeigen, dass die Versuchsanordnung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, funktionell ist. Die Bindung zu TRD von mutiertem *CASQ2* gegenüber seiner Wildtyp-Form stieg mit zunehmender Proteinbeladung jeweils linear an.

Die ersten vorliegenden Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass *CASQ2*-I161V zu einer veränderten Interaktion mit TRD führt. Diese Untersuchungen sollten mit weiteren Messungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion komplettiert werden. Ferner sollten modifizierte Bedingungen im Rahmen der Versuchsanordnung getestet werden, da die Kontrollreaktion des Assays zeigte, dass eine geringfügige unspezifische Bindung von *CASQ2*-I161V und *CASQ2*-WT an die Beads besteht. Im Rahmen von Folgeversuchen könnte beispielsweise eine Erhöhung der Salzkonzentration des Elutionspuffers vorgenommen werden. Hierdurch können unspezifische Bindungen reduziert werden. Ferner könnte ein häufigeres Waschen der Proben diese mögliche Fehlerquelle beheben. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Vorbereitung solcher Folgeversuche. Es wurden Proben für *CASQ2*-I161V und *CASQ2*-WT aus Sf21-Insektenzellen hergestellt, die für 5 unabhängige „Pull-Down“-Assays verwendet werden können.

Interessanterweise finden sich für einzelne *CASQ2*-Mutationen unterschiedliche Veränderungen im Bindungsverhalten zu TRD. So zeigte die *CASQ2*-Mutation D307H, die in COS-Zellen, einer Fibroblasten-Zelllinie, exprimiert worden war, eine geringere Bindung zu TRD gegenüber Wildtyp-*CASQ2* (Houle et al. 2004). Dies könnte durch eine veränderte Tertiärstruktur erklärt werden. Im Gegensatz dazu wies sowohl die *CASQ2*-Mutation R33Q als auch die Mutation L167H eine stärkere Bindung zu TRD gegenüber Wildtyp-*CASQ2* bei 0 mM Ca^{2+} gegenüber 1 mM Ca^{2+} auf (Kim et al. 2007; Valle et al. 2008). Dies zeigte wiederum die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zwischen einzelnen *CASQ2*-Mutationen und TRD an, so dass für *CASQ2*-I161V weitere Messungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion unter Anwesenheit von 1 mM gegenüber 0 mM Ca^{2+} erfolgen

sollten. Untersuchungen zum Bindungsverhalten der *CASQ2*-Mutation G112+5x konnten keine Bindung an TRD feststellen. Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass aufgrund dieser Mutation das für die Ca^{2+} -Bindung verantwortliche C-terminale Ende des *CASQ2* verloren gegangen war. Hierdurch ist eine Verankerung an TRD, für die die AS 200-224 verantwortlich gemacht werden (Kobayashi und Jones, 2000), unmöglich.

5.5. Adenovirale Überexpression von *CASQ2-I161V* und *CASQ2-WT*

Die Möglichkeit der Herstellung von rekombinanten Adenoviren (*Ad5-CASQ2-I161V* und *Ad5-CASQ2-WT*) in HEK-Zellen bietet eine langjährig etablierte (Vogelstein et al. 1998) und bewährte Möglichkeit für eine Untersuchung von Fremdgenen, z.B. in neonatalen Maus-Kardiomyozyten (Viatchenko-Karpinski et al. 2004; Babu et al. 2006; Gergs et al. 2007; Kirchhefer et al. 2010). Die verwendeten humanotropen Adenoviren sind dem Serotyp Ad5 zuzuordnen, wobei insgesamt etwa 50 weitere unterschiedliche Serotypen bekannt sind. Der Vorteil von Ad5-Viren besteht darin, dass sie zur sogenannten Onkogenitätsgruppe C und somit zur Gruppe nicht-onkogener Adenoviren (Gruppe A=stark onkogen, Gruppe B=schwach onkogen) gehören, die für den Menschen primär ungefährlich ist. Durch eine Deletion ihrer Gene $\Delta E1$ und $\Delta E3$ sind sie zwar infektiös, aber ohne eine Helferzelllinie (wie HEK293-Zellen), die diese $\Delta E1$ - und $\Delta E3$ -Gene stattdessen besitzt, nicht replikationsfähig (Chartier et al. 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unter Benutzung des AdEasy-Systems (He et al. 1998) rekombinante Adenoviren (Ad5) generiert (Benihoud et al. 1999), die *CASQ2-I161V* und *CASQ2-WT* im Genotyp tragen. Ad5-Viren sind in der Lage, 1,8 -2,0 kb große Fremd-DNS und somit mehr als das Doppelte der Länge ihres eigenen Wildtyp-Genoms zu verpacken (Bett et al. 1993). Aus diesem Grund sind sie für die Integration des *CASQ2*-Fremdgens optimal geeignet. Dessen direkte Einklonierung in den AdEasy-1-Vektor ist aufgrund sowohl fehlender singulärer Schnittstellen als auch der Größe der DNS (35 kb) schwierig. Daher wurde die kodierende Sequenz des zu exprimierenden *CASQ2* zunächst in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pAdTrack-CMV (9220bp) eingebracht. Die homologe Rekombination zwischen dem zu übertragenen Nu-

kleinsäureabschnitt (pAdTrack-*CASQ2*-I161V und pAdTrack-*CASQ2*-WT) und dem viralen Genom erfolgte durch den Einsatz einer effizienten Zelllinie, dem *E. coli*-Stamm BJ5183, mit dem das Einbringen von Fragmenten, die größer als 10 kb sind, erfahrungsgemäß keine Hindernisse bereitet. Die BJ5183-Zellen waren hierfür chemisch kompetent gemacht worden. Eine Bestätigung über die korrekte Integration der DNS-Abschnitte erfolgte durch automatische Sequenzierung. Die rekombinante adenovirale DNS wurde anschließend in HEK293-Zellen transfiziert, die die für die Replikationsfähigkeit der Adenoviren erforderlichen Δ E1- und Δ E3-Genabschnitte zur Verfügung stellten. Der Erfolg der Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde einerseits durch die Expression des grün fluoreszierenden Proteins kontrolliert. Ferner diente die Markierung von *CASQ2* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 dem Nachweis von *CASQ2*. Dieser rot fluoreszierende Farbstoff zeigt kaum unspezifische Bindung an biologisches Gewebe und eignete sich daher hervorragend für den spezifischen Nachweis von *CASQ2*. Neben der sichtbaren Fluoreszenz durch die GFP-Expression von Ad5-*CASQ2*-I161V und Ad5-*CASQ2*-WT sowie der Markierung von *CASQ2* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konnte der Nachweis einer zunehmenden Proteinexpression von *CASQ2*-I161V und *CASQ2*-WT zusätzlich im Western Blot-Verfahren erbracht werden.

Die entstandenen rekombinanten Adenoviren haben im Gegensatz zu transienten Transfektionssystemen den Vorteil, dass sie sehr stabil sind. Aus diesem Grund sind sie hervorragend für einen Gentransfer in adulte oder neonatale Ratten- oder Maus-Kardiomyozyten geeignet. Dies zeigten bereits Arbeiten mit den *CASQ2*-Mutationen D307H (Terentyev et al. 2004) oder K206N (Kirchhefer et al. 2010). Neonatale Maus-Kardiomyozyten haben entscheidende Vorteile gegenüber adulten Maus-Kardiomyozyten, da sie kaum endogenes *CASQ2* exprimieren. Ferner besteht im Gegensatz zu adulten Maus-Kardiomyozyten die Möglichkeit einer mehrtägigen Kultivierung (eigene unveröffentlichte Daten). Ein weiterer entscheidender Vorteil von neonatalen Maus-Kardiomyozyten besteht darin, dass diese im Vergleich zu adulten Maus-Kardiomyozyten auch bei längerer Kultivierung nicht entdifferenzieren. Mithilfe weiterer Untersuchungen könnte der Einfluss von *CASQ2*-I161V auf die Ca^{2+} -Transienten neonataler Maus-Kardiomyozyten untersucht werden.

5.6. Ausblick

Auch wenn es sich bei der hereditären CPVT um ein seltenes Krankheitsbild handelt, besteht doch im Falle ihres Auftretens eine potentielle Lebensbedrohung. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit einleitend thematisiert. Trotz der hohen Mortalität bis zum 30. Lebensjahr (Fisher et al. 1999; Terentyev et al. 2006) existiert bis heute, mit Ausnahme der individuellen Vermeidung von CPVT-auslösenden Triggerfaktoren, keine kausale Behandlungsmöglichkeit für diese Erkrankung. Ein Grund hierfür ist die bisher nicht ausreichend erforschte Pathophysiologie der CPVT, deren umfassendes Verständnis jedoch Voraussetzung für die Entwicklung geeigneter Behandlungsmodelle wäre. Als Therapie der Wahl werden zurzeit β -Rezeptorblocker (z.B. Nadolol, Metoprolol) eingesetzt, wodurch die Wirkung katecholaminerger Rezeptoragonisten, die im Rahmen des physischen und psychischen Stresses freigesetzt werden, abgeschwächt bzw. antagonisiert werden kann (Postma et al. 2005). Ihre Wirkung im Rahmen der CPVT ist leider nur symptomatisch und zudem, wie das einleitende klinische Fallbeispiel erschreckend anschaulich darstellte, nicht hinreichend geeignet, einen plötzlichen Herztod im Rahmen von CPVT zu verhindern (Priori et al. 2001; Wedekind et al. 2006). So ist die Patientin P. R. mit der *CASQ2*-Mutation I161V in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für einige Zeit mit dem β -Rezeptorblocker Metoprolol (Beloc Zok[®], 2 x 23,5 mg täglich) therapiert worden. Unter der Therapie entwickelte die Patientin jedoch eine Unverträglichkeit mit Symptomen wie Hypotonie, Schwindel und Schmerzen im Rahmen von vereinzelt aufgetretenen Extrasystolen (Patientenakten des Universitätsklinikums Münster, Medizinische Poliklinik C, 2005). Als alternative Therapie stehen nach heutigem Kenntnisstand aufgrund der Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase lediglich die sogenannten Ca^{2+} -Antagonisten (z.B. Verapamil) zur Verfügung, wobei hier ein therapeutischer Nutzen bisher nicht hinreichend bewiesen und somit fraglich ist.

Die Suche nach einer kausalen Therapieoption steht damit nach wie vor im Fokus der pharmazeutischen Entwicklungen. Erste Ansätze einer kausalen Therapie existieren bereits. Diese werden an Zell- und/oder Tiermodellen getestet. So konnte für das 1,4-Benzothiazepin-Derivat JTV519 (K201) oder den Na^+ -Kanal-Blocker Tetracain, einem Lokalanästhetikum, eine Reduktion der RyR-

Öffnungswahrscheinlichkeit gezeigt werden (Yano et al. 2003; Venetucci et al. 2006). In der Folge könnten die für die CPVT typischen DADs verhindert werden. Eine weitere wichtige Rolle zur Verhinderung solcher DADs könnte eine Blockade des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers spielen (NCX), dessen Hauptaufgabe darin besteht, freie Ca^{2+} -Ionen im Austausch mit Na^{+} -Ionen zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellulärraum zu transportieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität dieses Transporters unter pathologischen Umständen (z.B. reverser Modus) zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle und zu einem vermehrtem Auftreten von DADs bzw. getriggerten Arrhythmien führt (Reuter et al. 2004; Bers et al. 2006; Sipido et al. 2006). Ferner könnte eine Inhibierung der CaMKII (Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) mithilfe des selektiven Antagonisten KN93, wie sie anhand eines RyR (R4496C) Knock-in Maus-Modells *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde, späte Nachdepolarisationen verhindern, ohne Einfluss auf die SR- Ca^{2+} -Speicher zu nehmen (Liu et al. 2007). *In vivo* gelang ferner eine symptomatische Therapie von Knock-in-Mäusen mit der *CASQ2*-Mutation D307H, deren CPVT-bedingte Arrhythmien nach einer Magnesium-Therapie (200mg/kg) sistierten (Alcalai et al. 2010).

Welche Rolle die *CASQ2*-Mutation I161V bei der Suche nach einer kausalen Therapieoption der CPVT spielt, bleibt abzuwarten. Tatsache ist, dass jede neue Erkenntnis in Bezug auf die subzellulären Mechanismen im Rahmen der Erkrankung die Chance für eine zukünftige, gezielte kausale Behandlungsstrategie erhöhen kann. Diese Promotionsarbeit führte zu solchen neuen Erkenntnissen. So konnte erstmals gezeigt werden, dass *CASQ2*-I161V zu einer erhöhten Ca^{2+} -Speicherfähigkeit gegenüber Wildtyp-*CASQ2* führt. Ferner konnten durch die Etablierung eines „Pull-Down“-Assays die Voraussetzungen für weitere Untersuchungen der biochemischen Effekte der I161V-Mutation auf die SR- Ca^{2+} -Freisetzung geschaffen werden. Durch die Expression der Mutation in HEK293-Zellen und neonatalen Maus-Kardiomyozyten besteht ferner nicht nur die Möglichkeit für gezielte Funktionsuntersuchungen, denkbar wäre sogar der zukünftige Einsatz der rekombinanten Adenoviren in der Gentherapie (Ali et al. 1994), die eine Möglichkeit darstellt, ein defizientes Gen zu ersetzen und so einen genetischen Defekt (wie die durch die I161V-Mutation hervorgerufene CPVT) zu korrigieren (Mohr und Geissler et al. 2002).

6. Anhang

6.1. Puffer und Medien

Alle Chemikalien wurden in Pro-analysi-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Alle radioaktiven Substanzen wurden von Hartmann Analytics, Braunschweig, oder von NEN-DuPont, Bad Homburg bezogen. Das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen.

Arbeiten mit Insektenzellen/HEK293-Zellen

HEK-Zellen-Medium:

| | |
|--|-----------|
| DMEM-Vollmedium | 500 ml |
| (Gibco Grundmedium) für HEK293-Zellen mit Glutamin | |
| Fetales Kälberserum (FCS) | 50 ml |
| Penicillin G | 100 µg/ml |
| Streptomycinsulfat | 100 µg/ml |

Kryomedium für HEK-Zellen:

| | |
|-------------------------------|--------|
| DMEM high Glucose (serumfrei) | 780 µl |
| FCS | 120 µl |
| FMSO | 100 µl |

Homogenisierungspuffer:

| | |
|------------|--------|
| Saccharose | 0,25 M |
| Histidin | 0,01 M |
| SDS | 1 % |
| (pH 7,4) | |

Insektenzellmedium:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Grace´s Medium | 500 ml |
| FCS | 50 ml |
| Penicillin G | 100 µg/ml |
| Streptomycin | 100 µg/ml |
| Für die Suspensionskultur zusätzlich: | |
| Pluronic F-68 | 0,1 % |

Transfektionspuffer A:

| | |
|------------------------------------|------|
| Grace´s Medium (Insektenzellen) | 90 % |
| FCS | 10 % |

Transfektionspuffer B:

| | |
|---------------------------|--------|
| HEPES (Insektenzellen) | 25 mM |
| CaCl ₂ | 125 mM |
| NaCl (pH 7,4) | 14 mM |

| | |
|--|------------------------------------|
| Baculovirus-DNS, BaculoGold | Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Company, Steinheim |
| Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM) | Sigma, Taufkirchen |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Gibco/Life Technologies, Karlsruhe |
| Grace´s Medium | Sigma-Aldrich Company, Steinheim |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Gibco/Life Technologies, Karlsruhe |
| Pluronic F-68 | Gibco/Life Technologies, Karlsruhe |
| Zelllinie Sf21 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Zelllinie 293 | Mikrobix |
| Transfektionspuffer A und B | BD Biosciences, San Diego, CA, USA |

Puffer und Medien für die Transfektion und Infektion von HEK293-Zellen sind dem Abschnitt „Arbeiten mit dem adenoviralen Expressionssystem“ zu entnehmen.

Arbeiten mit DNS**LB-Medium:**

| | |
|-------------|------------------|
| Trypton | 10 % (Gew./Vol.) |
| Hefeextrakt | 5 % (Gew./Vol.) |
| NaCl | 5 % (Gew./Vol.) |
| (pH 7,0) | |

LB-Agar:

| | |
|--------------|------------------|
| Agar-Agar | 15 % (Gew./Vol.) |
| in LB-Medium | |
| (pH 7,5) | |

10 x Kinase-Puffer:

| | |
|-------------------|-------|
| Tris | 0,5 M |
| MgCl ₂ | 0,1 M |
| (pH 7,5) | |

Lösung I (kompetente *E. coli*):

| | |
|-----------------|-------|
| MOPS (pH 7,0) | 10 mM |
| Rubidiumchlorid | 10 mM |

Lösung II (kompetente *E. coli*):

| | |
|-------------------|-------|
| MOPS (pH 6,5) | 10 mM |
| Rubidiumchlorid | 10 mM |
| CaCl ₂ | 50 mM |

Präzipitationspuffer:

| | |
|------------------------------|--------|
| Ammoniumacetat | 3,75 M |
| Polyethylen Glycol (MW 8000) | 20 % |

Puffer P1 (Resusp.-Puffer):

| | |
|------------------------|-----------|
| Tris HCL (pH 8,0) | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| RNase A | 100 µg/ml |
| Lagerung bei 2 bis 8°C | |

Puffer P2 (Lysispuffer):

| | |
|------|-----------------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS | 1 % (Gew./Vol.) |

Puffer P3 (Neutralis.-puffer):

| | |
|--------------------------|-------|
| Kaliumacetat (pH 5,5) | 3,0 M |
|--------------------------|-------|

10 x Ladepuffer:

| | |
|----------------|------------------|
| Bromphenolblau | 10 mg |
| Glycerol | 50 % (Vol./Vol.) |
| 1 x TBE | 50 % (Vol./Vol.) |

TAE-Puffer:

| | |
|----------------------|--------|
| Trisacetat (pH 8,0) | 40 mM |
| Na ₂ EDTA | 0,1 mM |

TE-Puffer

| | |
|------------------|--------|
| Tris | 50 mM |
| EDTA (pH 8,0) | 100 mM |

Ammoniumacetat

Merck, Darmstadt

Ampicillintrihydrat

Serva Electrophoresis GmbH,
Heidelberg

1 x Annealingpuffer

Promega, Mannheim

| | |
|---|---|
| Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase; AP) | Roche, Mannheim |
| Dithiothreitol (DTT) | CN Biomedicals Inc. Colorado, Aurora, USA |
| dNTP-Stamm 20 mM | AGS, Heidelberg |
| Ethidiumbromid | Sigma, Taufkirchen |
| Hefeextrakt | Difco/Becton Dickinson, Heidelberg |
| Lambda Mix Marker, 19 | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Oligo/dt-Primer p(dt)15 | Roche, Mannheim |
| RNase | Qiagen, Hilden |
| RNase-Inhibitor | AGS, Heidelberg |
| Trypton/Peptone 140 | Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe |
| 1 x Synthesepuffer | Promega, Mannheim |
| 5 U T4-DNS-Polymerase | Promega, Mannheim |
| 1 U T4-DNS-Ligase | Promega, Mannheim |

Arbeiten mit dem adenoviralen Expressionssystem

HEPES-Puffer:

| | |
|-------------------|--------|
| HEPES (pH 7,4) | 100 mM |
|-------------------|--------|

PBS-Puffer:

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,1 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| MgCl ₂ (pH 7,45) | 6,1 mM |

Puffer QBT:

| | |
|---------------|--------|
| NaCl | 750 mM |
| MOPS (pH 7,0) | 50 mM |
| Isopropanol | 15 % |
| Triton X-100 | 10 % |

Puffer QC:

| | |
|-------------------------|-------|
| NaCl | 1 M |
| MOPS | 50 mM |
| Isopropanol (pH 7,0) | 15 % |

Puffer QF:

| | |
|-------------------------|--------|
| NaCl | 1,25 M |
| Tris | 50 mM |
| Isopropanol (pH 8,5) | 15 % |

| | |
|--|----------------------------------|
| Cy3-konjugierter anti-rabbit IgG | Dianova GmbH, Hamburg |
| 4,6-Diamidino-2-Phenylindol- Dihydrochloride (DAPI) | Sigma-Aldrich, München |
| <i>E. coli</i> BJ5183-Zellen | Stratagene Europe, Amsterdam, NL |
| Massenstandard | MBI-Fermentas, St. Leon-Rot |
| Superfect | Qiagen, Hilden |

Die Herstellung von **LB-Medium, Puffer P1, P2, P3** ist dem Abschnitt „Arbeiten mit Insektenzellen/HEK293-Zellen“ zu entnehmen.

Arbeiten mit neonatalen Maus-Kardiomyozyten**Kulturmedium:**

| | |
|-------------------------|--------|
| DMEM | 43 ml |
| Fetales Kälberserum | 1 ml |
| Pferdeserum | 5 ml |
| Penicillin/Streptomycin | 0,5 ml |
| L-Glutamin | 0,5 ml |

Arbeiten mit Proteinen**Histidin-Saccharose-Puffer:**

| | |
|------------|--------|
| Saccharose | 0,25 M |
| Histidin | 0,01 M |

Porziogel-Puffer:

| | |
|------------------|---------|
| Tris | 0,2 M |
| Glyzin | 0,6 M |
| EDTA | 0,12 mM |
| SDS | 0,2 % |
| Glycerol | 10 % |
| Polyacrylamid 1% | 0,4 % |

Oberer Puffer:

| | |
|----------|-------|
| Tris | 0,5 M |
| SDS | 0,4 % |
| (pH 6,8) | |

Sammelgel 5 %:

| | |
|------------------------|---------|
| Acrylamid 38 % | 1 ml |
| H ₂ O | 5,8 ml |
| Oberer Puffer | 2,35 ml |
| TEMED | 6 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % | 95 µl |

Trenngel 7,5 %:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Acrylamid 38 % | 7,4 ml |
| H ₂ O | 4,6 ml |
| Glycerol/H ₂ O (1:1) | 6,25 ml |
| 1 x Porzio-Puffer | 18,75 ml |
| TEMED | 32,5 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % | 150 µl |

Porziogel 8 %:

| | |
|------------------------|---------|
| Acrylamid 38 % | 7,4 ml |
| H ₂ O | 9,9 ml |
| 2 x Porzio-Puffer | 17,5 ml |
| TEMED | 58 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % | 233 µl |

Elektrodenpuffer:

| | |
|----------|--------|
| Tris | 50 mM |
| Glycin | 125 mM |
| SDS | 1 % |
| (pH 8,8) | |

Transferpuffer:

| | |
|----------------------------------|-------|
| Na ₂ HPO ₄ | 42 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 8 mM |
| (pH 7,4) | |

Ponceau S-Lösung:

| | |
|--------------------|-------|
| Ponceau S | 0,2 % |
| Trichloressigsäure | 3 % |
| Sulfosalicylsäure | 3 % |

Puffer C:

| | |
|----------|--------|
| Tris | 13 mM |
| NaCl | 154 mM |
| Tween 20 | 0,1 % |
| (pH 7,4) | |

AP-Puffer:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ x 6H ₂ O | 5 mM |
| Triethanolamin | 100 mM |
| (pH 9,4) | |

Puffer A:

| | |
|----------|--------|
| Tris | 13 mM |
| NaCl | 154 mM |
| (pH 7,4) | |

TBS-Puffer:

| | |
|----------|--------|
| NaCl | 154 mM |
| Tris | 10 mM |
| (pH 7,4) | |

NBT:

| | |
|--------------------------|-----|
| Nitroblau-Tetrazolium | 5 % |
| in 70 % Dimethylformamid | |

BCIP:

| | |
|--|-----|
| 5-Bromo-4chloro-3indolyl-Phosphat-Toluidinsalz | 5 % |
| in 100% Dimethylformamid | |

CHAPS-Puffer 1 %:

| | |
|------------|-----------|
| Tris | 50 mM |
| NaCl | 1 mM |
| PMSF | 1 μ M |
| Benzamidin | 1 μ M |

Laemmli Laufpuffer 1 x (Nativgel):

| | |
|----------|--------|
| Tris | 200 mM |
| Glycin | 354 mM |
| (pH 8,9) | |

Laemmli Sammelgel (Nativgel):

| | |
|----------------------------|---------|
| Tris 0,1 M (pH 6,8) | 2,35 ml |
| Acrylamid/Rotiphorese 40 % | 0,95 ml |
| H ₂ O | 6,1 ml |
| APS 10 % | 95 µl |
| TEMED | 6 µl |

Laemmli Trenngel 8 % (Nativgel):

| | |
|---------------------------------|----------|
| Trenngelpuffer (kein SDS) | 18,75 ml |
| Acrylamid/Rotiphorese 40 % | 7,88 ml |
| Glycerol/H ₂ O (1:1) | 6,25 ml |
| H ₂ O | 4,62 ml |
| APS 10 % | 150 µl |
| TEMED | 32,5 µl |

Laemmli Trenngelpuffer (Nativgel):

| | |
|----------------------------|---------|
| Tris | 200 mM |
| Glycin | 600 mM |
| EDTA | 0,15 mM |
| H ₂ O | 2,7 ml |
| Glycerol | 0,15 mM |
| Polyacrylamid 1 % (pH 8,8) | 400 ml |

| | |
|-----------------------------|--|
| Dithiothreitol (DTT) | CN Biomedicals Inc., Colorado, Aurora, USA |
| ECF TM -Substrat | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Folin-Ciocalteu Reagenz | Sigma-Aldrich GmbH, München |
| Gluthation-Agarose-Beads | BD Biosciences, Heidelberg |
| Molmassenstandard | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Protein Assay-Stammlösung | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma, Deisenhofen |

6.2. Geräte und Bezugsquellen

| | |
|--|--|
| Autoklav Varioklav Typ 500 | H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim |
| Atoklav Tuttnauer Systemec Typ 3850 EL | Systemec GmbH, Wettenberg |
| Betazähler TRI-CARB 1600TR | Canberra Packard GmbH, Dreieich |
| Biophotometer | Eppendorf AG, Hamburg |
| Elektrophoresekammer | Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA |
| Hofer SE600- Elektrophoresekammer | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Geldokumentation Fluo-Link | MWG-Biotech AG, Ebersberg |
| Heizblock, Thermomixer, Modell 5436 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Inkubator Queue Stabil Therm Inkubatorschrank | Nalge Nunc International, Wiesbaden Rose Scientific Ltd, Einsbach |
| Invoice-HT Minitron Inkubator (Bakterienkultur) Typ UE 400 | Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach |
| JVC TK-C1380 | |
| Kühlbrutschrank Typ ICP 600 | Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach |
| Mikroskop Leica DMIL | Leica, Wetzlar |
| PCR-Gerät Gene Amp© PCR-System | PerkinElmer Analytical Instruments, Shelton, Connecticut, USA |
| PCR-Gerät, Mastercycler gradient | Eppendorf AG, Hamburg |
| pH Meter 761, Calimatic/Knick | Singer Elektronik Vertriebs GmbH, Aachen |
| Phosphorimager-Kassetten | Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA |
| Polytron PT-MR 3000 | Kinematica AG, Littau, Schweiz |

| | |
|-------------------------------|---|
| Reinstwasseranlage | TKA Wasseraufbereitungssysteme |
| TKA-LAB Typ HP4 | GmbH, Niederelbert |
| Rundschüttler, Modell 3015 | GFL, Burgwedel |
| Schüttelinkubator | Infors AG, Bottmingen, Schweiz |
| Schüttler Modell Unimax | Heidolph GmbH+Co. KG, Schwabach |
| 2010, RO-5 | |
| Spectrophotometer Uvikon 922 | Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz |
| Sterilbank, Lamin Air HB 2472 | Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf |
| Storm 860 | Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA |
| Thermomixer Modell 5436 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Tischzentrifuge Modell 5415 C | |
| mit Standardrotor F-45-18-11 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Transfereinheit Hoefler | Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA |
| Ultraschallstab VirSonic® | Virtis, New York, NY, USA |
| UV-Lichtanlage Docu Gel-V | |
| 8A400 | MWG, Ebersberg |
| Vakuum, SpeedVac® Plus AR, | Life Sciences International, Frankfurt |
| SC110 AR | |
| Varioklav Dampfsterilizer | Tuttnauer S1 Stec 3850 EL, Wittenberg |
| Waage Kern 470 | |
| Zentrifuge Centrikon T-124 | Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz |
| Zentrifuge Universal 16 | Hettich/Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf |
| Zentrifuge Varifuge 3.0 R | Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf |

6.3. Kits

Altered sites® II

in vitro Mutagenesis System Promega, Mannheim

DNS-Reinigungskits für M13-Phagen

(QIAprep™ M13-System) Qiagen, Hilden

DNA Purification System Promega, Mannheim

Invisorb Gel Extraction Kit 50 Invitex GmbH, Berlin

Wizard Plus Minipreps

Plasmid Maxi Kit 25 Qiagen, Hilden

6.4. Sonstige Arbeitshilfsmittel

Kulturschalen

NUNC GmbH & Co. KG,
Langenselbold

Pipetten (Costar Stripette)

Corning Incorporated, Corning,
NY, USA

Pipetten (Research)

Eppendorf AG, Hamburg

Protran® Nitrocellulose Membran

BA 85

Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

Röhrchen

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Zellkulturflaschen (Cellstar)

Greiner bio-one GmbH,
Frickenhausen

7. Literaturverzeichnis

Ailor E, Betenbaugh MJ (1999) Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol.* 10:142-145

Alcalai R, Wakimoto H, Arad M, Planer D, Konno T, Wang L, Seidman JG, Seidman CE, Berul CI (2010) Prevention of Ventricular Arrhythmia and Calcium Dysregulation in a Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Mouse Model Carrying Calsequestrin-2 Mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* [Epub ahead of print]

Ali M, Lemoine N, Ring C (1994) The use of DNS viruses as vectors for gene therapy. *GeneTherapy* 1(6):367-384

Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO (2004) Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 101:9199-9204

Babu GJ, Bhupathy P, Petrashevskaya NN, Wang H, Raman S, Wheeler D (2006) Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J Biol Chem.* 281:3972-3979.

Bauce B, Rampazzo A, Basso C, Bagattin A, Daliento L, Tiso N (2002) Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 40(2):341-349

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 10(5):440-447

Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Boston, MA: Kluwer Academic Press

Bers, DM (2002) Calcium and cardiac rhythms: Physiological and pathophysiological. *Circ. Res.* 90(1):14-17

Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993) Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol.* 67(10):5911-5921

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNS. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523

Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M (2007) Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *J Mol Cell Cardiol.* 42:903-911

Carafoli E, Longoni S (1987) The plasma membrane in the control of the signaling function of calcium. *Soc Gen Physiol Ser.* 42:21-29

Cerrone M, Colombi B, Santoro M, Di Barletta MR, Scelsi M, Villani L, Napolitano C, Priori SG (2005) Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodin receptor. *Circ Res.* 96(10):e77-82

Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Methali M (1996) Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol.* 70(7):4805-4810

Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Etensohn K, Pfeifer K, Akin B, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2007) Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak independent of luminal Ca²⁺ and trigger ventricular arrhythmias in mice. *Circ Res.* 14;101(6):617-626

Czubryt MP, Ramjiawan B, Gilchrist JS, Massaelli H, Pierce GN (1996) The presence and partitioning of calcium binding proteins in hepatic and cardiac nuclei. *J Mol Cell Cardiol.* 28(3):455-465

Di Barletta M, Viatchenko-Karpinski S, Nori A, Memmi M, Terentyev D, Turcato F, Valle G, Rizzi N, Napolitano C, Gyorke S, Volpe P, Priori SG (2006) Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with CPVT. *Circulation* 114(10): 1012-1019

Dirksen WP, Lacombe VA, Chi M, Kalyanasundaram A, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Zhou, Z, Vedamoorthy S, Li N, Chimvimonvat N, Carnes CA, Franzini-Armstrong C, Gyorke S, Periasamy M (2007) A mutation in calsequestrin, CASQ2D307H, impairs Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ handling and causes complex ventricular arrhythmias in mice. *Cardiovasc Res.* 75(1): 69-78

Fernández-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, Gómez AM (2009) Increased Ca²⁺ sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ res.* 104(2):201-209

Fisher JD, Krikler D, Hallidie-Smith KA. (1999) Familial polymorphic ventricular arrhythmias: a quarter century of successful medical treatment based on serial exercise-pharmacologic testing. *J Am Coll Cardiol.* 34(7):2015-2022

Frank KF, Mesnard-Rouiller L, Chu G, Young KB, Zhao W, Haghghi K, Sato Y, Kranias EG (2001) Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res Cardiol.* 96(6):636-44.1

Franzini-Armstrong C, Kenney LJ, Varriano-Marston E (1987) The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol.* 105(1): 49-56

Gatti G, Trifari S, Mesaeli N, Parker JM, Michalak M, Meldolesi J (2001) Head-to-tail oligomerization of calsequestrin: a novel mechanism for heterogeneous distribution of endoplasmatic reticulum luminal proteins. *J Cell Biol.* 154(3):525-534

Gellen B, Fernández-Velasco M, Briec F, Vinet L, LeQuang K, Rouet-Benzineb P, Bénitah JP, Pezet M, Palais G, Pellegrin N, Zhang A, Perrier R, Escoubet B, Marniquet X, Richard S, Jaisser F, Gómez AM, Charpentier F, Mercadier JJ (2008) Conditional FKBP12.6 overexpression in mouse cardiac myocytes prevents triggered ventricular tachycardia through specific alterations in excitation-contraction coupling. *Circulation* 117(14):1778-1786

George CH, Higgs GV, Lai FA (2003) Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ Res.* 93(6):531-540

George CH, Jundi H, Walters N, Thomas NL, West RR, Lai FA (2006) Arrhythmogenic mutation-linked defects in ryanodine receptor autoregulation reveal a novel mechanism of Ca^{2+} release channel dysfunction. *Circ Res.* 98(1): 88-97

Gergs U, Berndt T, Buskase J, Jones LR, Kirchhefer U, Müller FU, Schlüter KD, Schmitz W, Neumann J (2007) On the role of junctin in cardiac Ca^{2+} handling, contractility, and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(1):H728-34. Epub 2007 Mar 30.

Gershoni JM. (1988) Protein blotting: a manual. *Methods Biochem Anal.* 33:1-58.

Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNS. *Virology* 52(2): 456-457

Graham F, Smiley J, Russel W, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNS from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36(1):59-77

Guo W, Campbell KP (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270(16):9027-9030

Guo W, Jorgensen AO, Jones LR, Campbell KP (1996) Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J Biol Chem.* 271: 458-465

Gyorke I, Hester N, Jones LR, Gyorke S (2004) The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J.* 86(4):2121-2128

Hayakawa K, Swenson L, Baksh S, Wei Y, Michalak M, Derewenda ZS (1994) Crystallization of canine cardiac calsequestrin. *J Mol Biol.* 235(1):357-360.

He TC, Zhou S, da Costa LR, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2509-2514

Houle TD, Ram ML, Cala SE (2004) Calsequestrin mutant D307H exhibits depressed binding to its protein targets and a depressed response to calcium. *Cardiovasc Res.* 64 (2):227-233

Ikemoto N, Ronjat.M, Mészáros LG, Koshita M, (1989) Postulated Role of Calsequestrin in the Regulation of Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum *Biochemistry* 28(16):6764-6771

Ikemoto N, Antoniu B, Kang JJ, Mészáros LG, Ronjat M (1991) Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 30(21):5230-5237

Jiang DW, Xiao BL, Zhang L, Chen SRW (2002) Enhanced basal activity of a cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res.* 91(3):218-225

Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, Zhang L, Chen SR (2005) Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res.* 97(11):1173-1181

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26 kDA calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270(51):30787-30796

Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong S, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca^{2+} signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J. Clin Invest.* 101(7):1385-1393

Kim E, Youn B, Kemper L, Campbell C, Milting H, Varsanyi M, Kang C (2007) Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol.* 2;373(4):1047-1057

King VA, Possee RD (1992) The baculovirus expressing system, A laboratory Guide, Chapman Hall, London

Kirchhefer U, Wehrmeister D, Postma AV, Pohlentz G, Mormann M, Kucerova D, Müller FU, Schmitz W, Schulze-Bahr E, Wilde AA, Neumann J. (2010) The human CASQ2 mutation K206N is associated with hyperglycosylation and altered cellular calcium handling. *J Mol Cell Cardiol.* 49(1):95-105

Kliche K, Kuhn M, Hillebrand U, Ludwig Y, Stock C, Oberleithner H (2006) Direct aldosterone action on mouse cardiomyocytes detected with atomic force microscopy. *Cell Physiol Biochem.* 2006;18(4-5):265-274

Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissmann NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) CASQ2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca^{2+} release and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest.* 116(9):2510-2520

Kubalova Z, Györke I, Terentyeva R, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Williams SC, Györke S (2004) Modulation of cytosolic and intra-sarcoplasmic reticulum calcium waves by calsequestrin in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 1;561(Pt 2):515-524

Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR (2000) Localisation and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence of a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem.* 275(23):17639-17646

Kontula K, Laitinen PJ, Lehtonen A, Toivonen L, Viitasalo M, Swan H (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: recent mechanistic insights. *Cardiovasc Res.* 67(3):379-387

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685

Lahat H, Eldar M, Levy-Nissenbaum E, Bahan T, Friedman E, Khoury A, Lorber A, Kastner DL, Goldman B, Pras E (2001) Autosomal recessive catecholamine- or exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1p13-21. *Circulation.* 103 (23) : 2822-2827.

Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldmann B, Lancet D, Eldar M (2004) A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular Tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet.* 69(6):1378-1384

Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B, Donarum EA, Marino M, Tiso N, Viitasalo M, Toivonen L, Stephan DA, Kontula K (2001) Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*103(4):485-490

Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P (1995) Catecholaminergic polymorphic ventricular Tachycardia in children. A 7-Year follow-up of 21 Patients. *Circulation* 91(5):1512-1519

Lehnart SE, Wehrens XH, Laitinen PJ, Reiken SR, Deng SX, Cheng Z, Landry DW, Kontula K, Swan H, Marks AR (2004) Sudden death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak. *Circulation* 109(25):3208-3214

Liu N, Colombi B, Memmi M, Zissimopoulos S, Rizzi N, Negri S, Imbriani M, Napolitano C, Lai FA, Priori SG (2006) Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model. *Circ Res.* 99(3):292-298

Liu N, Colombi B, Napolitano C, Priori SG (2007) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor abolishes and prevents triggered activity in myocytes from RyR2R4496C+/knock-in mice. *Heart Rhythm.* (Suppl):S107-S108

Liu N, Ruan Y, Priori SG (2008) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis.* 51(1):23-30

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AI, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275

Luckow VA, Summers MD (1988) Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 167(1):56-71

MacLennan DH, Reithmeier RA (1998) Ion tamers. *Nat Struct Biol.* 5(6): 409-411

MacLennan DH (2000) Ca^{2+} signalling and muscle disease. *Eur J Biochem.* 267(17):5291-5297

Maniatis T, Munro S (1989) Expression cloning of the murine interferon gamma receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci USA. 86(23):9248-9252

Marks AR (2001) Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. J Mol Cell Cardiol. 33(4): 615-624

Marks AR (2002) Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. Front Biosci. 7:d970-977

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roemblit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell. 101(4):365-376

Miller LK (1989) Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors. Bioassays 11(4):91-95

Mintz E, Guillain F (1997) Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. Biochim Biophys Acta. 1318(1-2):52-70

Mitchell RD, Simmerman HKB, Jones LR (1988) Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. J Biol Chem. 263(3):1376-1381

Mohamed U, Napolitano C, Priori SG (2007) Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. J Cardiovasc Electrophysiol. 18(7):791-797

Mohr L, Geissler M (2002) Gene therapy: new developments. Review. Praxis (Bern 1994) 18;91(51-52):2227-2235

Neu A, Eiselt M, Paul M, Sauter K, Stallmeyer B, Isbrandt D, Schulze-Bahr E. (2010) A homozygous SCN5A mutation in a severe, recessive type of cardiac conduction disease. Hum Mutat. 31(8):E1609-1621

Park H J, Wu S, Dunker AK, Kang C (2003) Polymerisation of Calsequestrin. Implications for Ca^{2+} regulation. *J Biol Chem.* 278(18):16176-16182

Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK, Kang C (2004) Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem.* 279(17):18026-18033

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta.* 490(1):27-34

Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 91(8):e21-e26

Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alder M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MM, Guicheney P, Wilde AM (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet.* 42(11):863-870

Priori S, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R (2001) Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol.* 34:2035-2042

Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimone L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A (2002) Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 106(1):69-74

Qin J, Valle G, Nani A, Nori A, Rizzi N, Priori SG, Volpe P, Fill M (2008) Luminal Ca^{2+} regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol.* 131(4):325-334

Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, Bicciato S, Arcelli D, Spedito A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Protasi F, Volpe P, Priori SG (2008) Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calsequestrin: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res.* 103(3):298-306

Reuter HHT, Motter C, Philipson KD (2004) Mice overexpressing the cardiac-sodium-calcium exchanger: defects in excitation-contraction coupling. *J Physiol.* 554:779-89

Russel M, Kidd S, Kelley MR (1986) An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene.* 1986;45(3):333-338

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning.* Cold spring harbour Laboratory Press, New York, 2. Auflage

Scheinman M, M & Lam J, (2006) Exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with no structural cardiac disease. *Annu Rev Med.* 57, 473-484

Schulze-Bahr E, Schwarz M, Hauenschild S, Wedekind H, Funke H, Haverkamp W, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D A (2001) A novel long-QT 5 gene mutation in the C-terminus (V109I) is associated with a mild phenotype. *J Mol Med.* 2001 Sep;79(9):504-509

Shin DW, Ma J, Kim DH (2000) The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca^{2+} and interacts with triadin. *FEBS Lett.* 486(2):178-182

Sipido KR, Varro A, Eisner D (2006) Sodium calcium exchange as a target for antiarrhythmic therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 171:159-199.

Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Heikkilä P, Paavonen T, Kainulainen K, Kere J, Keto P, Kontula K, Toivonen L (1999) Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q42 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol.* 34(7):2035-2042

Terentyev D, Nori A, Santoro M, Viatchenko-Karpinski S, Kubalova Z, Gyorke I, Terentyeva R, Vedamoorthyrao S, Blom NA, Valle G, Napolitano C, Williams SC, Volpe P, Priori SG, Gyorke S (2006) Abnormal interactions of calsequestrin with the ryanodine receptor calcium release channel complex linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Circ Res.* 98(9):1151-8

Terentyev D, Kubalova Z, Valle G, Nori A, Vedamoorthyrao S, Terentyeva R, Viatchenko-Karpinski S, Bers DM, Williams SC, Volpe P, Gyorke S (2008) Modulation of SR Ca²⁺ release by luminal Ca²⁺ and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ mutations linked to sudden cardiac death. *Biophys. J.* 95(4):2037-2048

Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Vedamoorthyrao S, Oduru S, Gyorke I, Williams SC, Gyorke S (2008) Protein protein interactions between triadin and calsequestrin are involved in modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol.* 583 (Pt 1):71-80

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels on nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76,4350-4354

Valle G, Galla D, Nori A, Priori SG, Gyorke S, De Filippis V, Volpe P (2008) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia-related mutations R33Q and L167H alter calcium sensitivity of human cardiac calsequestrin. *Biochem J.* 413(2):291-303

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*. 13(4):213-317

Venetucci LA, Trafford AW, Díaz ME, O'Neill SC, Eisner DA (2006) Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca^{2+} release and increase Ca^{2+} transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res*. 98(10):1299-1305

Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Gyorke I, Terentyeva R, Volpe P, Priori SG, Napolitano C, Nori A, Williams SC, Gyorke S (2004) Abnormal calcium signaling and sudden cardiac death associated with mutation of calsequestrin. *Circ Res*. 94(4):471-477

Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol*. 153:3-11

Viskin S, Belhassen B (1998) Polymorphic ventricular tachyarrhythmias in the absence of organic heart disease: classification, differential diagnosis, and implications for therapy. *Prog Cardiovasc Dis*. 41(1):17-34

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(2): 615-619

Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M, Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of the calcium channel/Foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338(6211):167-170

Wang SR, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH (1998) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol*. 5(6):476-483

Wedekind H, Schulze-Bahr E, Debus V, Breithardt G, Brinkmann B, Bajanowski T (2006) Cardiac arrhythmias and sudden death in infancy: implication for medico-legal investigation. *Int J Legal Med.* 121(4):245-257

Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Roseblit N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ, Marks AR. (2003) FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 113(7):829-840

Yano K, Zarain-Herzberg A (1994) Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *MolCell Biochem.* 135(1):61-70

Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, Suetsugu M, Hisaoka T, Obayashi M, Ohkusa T, Kohno M, Matsuzaki M (2003) FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 107(3):477-484.

Zell R, Fritz HJ (1987) DNS mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl cytosine residues. *EMBO J* 6(6):1809-1815

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane *J Biol Chem.* 272(37):23389-23397

Ich danke

Herrn Univ.-Prof Dr. med. W. Schmitz und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und für die stetigen Anregungen während der Erarbeitung der Dissertation.

Herrn Univ.-Prof Dr. med. E. Schulze-Bahr für die Überlassung der klinischen Daten über die *CASQ2*-Mutation I161V

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Uwe Kirchhefer für die intensive Betreuung der experimentellen Arbeiten, die stetige Diskussionsbereitschaft, die kritische, sorgfältige und schnelle Durchsicht des Manuskripts und für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima.

meinen „Mit-Doktorandinnen“ Frau Diana Wehrmeister und Frau Maren Blosa für die stets vorhandene Bereitschaft zu Diskussionen und für die freundschaftliche Hilfsbereitschaft.

Frau Nicole Hinsen Hofen und allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Erlernung der experimentellen Methoden, aber auch für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima.

meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem Ehemann Michael. Sie alle haben mich mit ihrer Geduld und Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit begleitet und so maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

meiner kleinen Tochter Lynn Marie danke ich dafür, dass Sie mich jeden Tag zum Lächeln bringt.

