

**Aus dem Department Translationale Forschung  
am Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz  
der Universität Würzburg  
Leitung: Professor Dr. med. Christoph Maack**

Frequenzabhängigkeit der IP<sub>3</sub>-induzierten Calciumregulation  
in murinen ventrikulären Kardiomyozyten

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von  
Jana Sophia Werner  
aus Regen

Würzburg, November 2022



Referent: Prof. Dr. med. Christoph Maack

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

*Meinen Eltern*

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Herzinsuffizienz .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Definition, Ursachen und Pathophysiologie.....	2
1.2	Elektromechanische Kopplung.....	3
1.2.1	Anatomische Grundlagen .....	3
1.2.2	Physiologie der elektromechanischen Kopplung.....	4
1.2.3	Modulation der elektromechanischen Kopplung.....	6
1.3	Mitochondrien und der zelluläre Energiehaushalt .....	7
1.4	Mitochondrialer Calciumhaushalt .....	10
1.4.1	Signalmolekülfunktionen.....	10
1.4.2	Mitochondriale Calciumaufnahme.....	11
1.4.3	Mitochondrialer Calciumefflux.....	16
1.5	IP <sub>3</sub> -Signalweg .....	17
1.6	Nukleärer Calciumtransient.....	18
1.7	Einfluss von Calcium auf Genexpression in Kardiomyozyten .....	20
1.8	Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz .....	21
1.9	Zielsetzung .....	23
2	Material und Methoden .....	25
2.1	Tierversuchsvotum .....	25
2.2	Materialien .....	25
2.2.1	Geräte .....	25
2.2.2	Chemikalien und Substanzen .....	26
2.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.2.4	Puffer und Lösungen .....	29
2.2.4.1	Kardiomyozytenisolation.....	29
2.2.4.2	Konfokalmikroskopie.....	30
2.2.4.3	PCR.....	31
2.2.4.4	Proteinanalytik.....	31
2.3	Isolation adulter Kardiomyozyten .....	32
2.3.1	Versuchstiere.....	32
2.3.2	Methoden zur Charakterisierung der Versuchstiere .....	33

2.3.2.1	Genotypisierung mittels PCR.....	33
2.3.2.2	Real-time-PCR .....	34
2.3.2.3	Proteinanalytik.....	35
2.3.3	Myozytenisolation .....	37
2.4	Live-Cell-Imaging am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.....	39
2.4.1	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop.....	39
2.4.2	Aufbau der Messanlage.....	42
2.4.3	Messprotokoll .....	42
2.4.4	Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten .....	43
2.4.5	Messung von mitochondrialem Calcium.....	44
2.5	Statistische und graphische Auswertung .....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Molekularbiologische Analyse des MCU KO-Tiermodells.....	46
3.2	Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern .....	47
3.3	Mitochondriale Calciumaufnahme bei 1 Hz Stimulation .....	49
3.4	Zytosolische Calciumtransienten bei 1 Hz Stimulation .....	52
3.4.1	Systolisches Calcium im Zytosol.....	54
3.4.2	Diastolisches Calcium im Zytosol.....	55
3.5	Nukleäre Calciumtransienten bei 1 Hz Stimulation.....	56
3.5.1	Systolisches Calcium im Kern.....	58
3.5.2	Diastolisches Calcium im Kern .....	59
3.6	Steigerung der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz .....	59
3.7	Mitochondriale Calciumaufnahme bei 4 Hz Stimulation .....	62
3.8	Zytosolische und nukleäre Calciumtransienten bei 4 Hz Stimulation.....	64
3.8.1	Zytosolische Calciumtransienten bei 4 Hz Stimulation .....	65
3.8.2	Nukleäre Calciumtransienten bei 4 Hz Stimulation .....	67
3.9	Arrhythmische Kontraktionsmuster bei 4 Hz .....	69
4	Diskussion .....	72
4.1	Zusammenfassung .....	72
4.2	Stimulation mit dem IP <sub>3</sub> R-Agonisten Angiotensin II bei gestörter mitochondrialer Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme.....	74
4.3	β-adrenerge Stimulation mit Isoproterenol .....	77
4.4	Vergleich der Stimulation mit dem IP <sub>3</sub> R-Agonisten Angiotensin II und dem β-adrenergen Agonisten Isoproterenol.....	79
4.5	Frequenz .....	81

4.5.1	Frequenzwechsel .....	81
4.5.2	Arrhythmien .....	82
4.5.3	$\beta$ -adrenerge Stimulation bei 4 Hz .....	84
4.5.4	IP <sub>3</sub> -Stimulation bei 4 Hz .....	85
4.6	Limitationen .....	87
5	Ausblick .....	88
6	Zusammenfassung .....	92
7	Literaturverzeichnis.....	94
Appendix		
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf	

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

### 1.1.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind sowohl weltweit als auch in Deutschland die häufigste Todesursache (WHO, 2017, Statistisches Bundesamt, 2017). Im Jahr 2016 starben nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 17,9 Mio. Menschen an ihnen. Das entspricht einem Anteil von 31% der globalen Todesfälle (WHO, 2017). Dieser Anteil steigt; die WHO prognostiziert für das Jahr 2030 rund 24,2 Mio. Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen (Mackay and Mensah, 2004). In Deutschland lag der Anteil der kardiovaskulären Erkrankungen an den Todesursachen im Jahr 2015 bei 38,5% (Statistisches Bundesamt, 2017). Bezogen auf die einzelnen Diagnosen steht dabei die Herzinsuffizienz an dritter Stelle der Todesursachen und unter den kardiovaskulären Erkrankungen kommt ihr besondere Bedeutung zu (Statistisches Bundesamt, 2017). Denn während es stetige und deutliche Verbesserungen der Prognose der meisten anderen Entitäten kardiovaskulärer Erkrankungen gibt, fällt die Bilanz bei der Herzinsuffizienz nüchterner aus (Braunwald, 2013). In Deutschland ist Herzinsuffizienz mit 455.700 Behandlungsfällen pro Jahr die häufigste Hauptdiagnose für einen krankheitsbedingten stationären Krankenhausaufenthalt (Statistisches Bundesamt, 2016). Der Krankheitsverlauf ist progressiv und zeichnet sich durch häufige Hospitalisierungen und eine weiterhin schlechte Überlebensprognose aus. Zwar verbesserte sich die Mortalität der Herzinsuffizienz in den letzten Jahrzehnten, doch dieser Trend verlangsamt sich zusehends (Groenewegen et al., 2020). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose wird immer noch auf nur etwa 57% geschätzt (Jones et al., 2019).

Die Herzinsuffizienz ist zudem eine häufige Erkrankung – weltweit geht man von einer Prävalenz von 1-2% aus (Groenewegen et al., 2020). Die Schätzungen für Deutschland sind vergleichbar. Eine große Studie mit Daten von 6 Mio. gesetzlich Versicherten bezifferte sie im Jahr 2006 auf 1,7% (Ohlmeier et al., 2015). Eine Untersuchung von Daten von über 3 Mio. gesetzlich Versicherten aus den Jahren 2009-2013 ergab eine Prävalenz von rund 4% (Störk et al., 2017). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz steigt altersabhängig an und gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Alter, von den über 70-Jährigen sind mehr als 10% betroffen, von den über 80-jährigen mehr als 25% (Störk et al., 2017, Ohlmeier et al., 2015).

### **1.1.2 Definition, Ursachen und Pathophysiologie**

Die Herzinsuffizienz ist ein Syndrom. Sie ist definiert als die Unfähigkeit des Herzens, den Körper mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen und damit den Bedarf des Stoffwechsels zu decken (Tanai and Frantz, 2015). Klinisch präsentiert sich das Syndrom mit typischen Symptomen wie z.B. Luftnot, Leistungsminderung und Volumenüberladung mit peripheren Ödemen (Ponikowski et al., 2016). Dem zugrunde liegen strukturelle und/oder funktionelle kardiale Veränderungen, z.B. eine eingeschränkte Pumpfunktion, eine pathologische Hypertrophie oder Arrhythmien. Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind breit gefächert, sie wird als Endstrecke unterschiedlicher kardialer und extrakardialer Erkrankungen gesehen (Groenewegen et al., 2020). Die häufigste Ursache ist eine ischämische Herzkrankheit durch akute oder chronische myokardiale Ischämie z.B. bei koronarer Herzkrankheit oder nach Myokardinfarkt (Gheorghiade et al., 2006, Lala and Desai, 2014). Zu weiteren Ursachen zählen Bluthochdruck, Kardiomyopathien u.a. genetischer oder toxischer Genese, Herzklappenerkrankungen, aber auch extrakardiale Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Infektionen (Ponikowski et al., 2016). Häufig haben Patienten mehrere Erkrankungen, die zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen, oder weisen Risikofaktoren auf, welche sowohl die Herzinsuffizienz als auch häufige Komorbiditäten begünstigen. In einer populationsbasierten Studie aus England hatten 87% der herzinsuffizienten Patienten mindestens drei Komorbiditäten, am häufigsten traten Hypertension (76%) und KHK (50%) auf (Conrad et al., 2018). Eine große Metaanalyse schätzt den Anteil der KHK mit 65% sogar noch höher ein (Gheorghiade et al., 2006). Weitere wichtige Risikofaktoren sind Adipositas, Diabetes mellitus und Rauchen (Groenewegen et al., 2020). In Zukunft wird mit einer steigenden Anzahl an Patienten mit Herzinsuffizienz gerechnet, da sich einerseits das Überleben mit vielen, die Herzinsuffizienz begünstigenden Grunderkrankungen verlängert hat und andererseits eine zunehmende Alterung der Gesellschaft zu beobachten ist (Groenewegen et al., 2020). Damit einhergehend werden die Bedeutung für die medizinische Versorgung und die Kosten für das Gesundheitssystem wachsen (Neumann et al., 2009).

Pathophysiologisch ist bei der Herzinsuffizienz das Herzzeitvolumen (absolut oder relativ) reduziert oder die Durchblutung des Organismus eingeschränkt (Tanai and Frantz, 2015). In der Folge wird – unabhängig von der Krankheitsgenese – ein komplexes Netzwerk von Kompensationsmechanismen aktiviert, um die Herzleistung aufrechtzuerhalten und dadurch eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Körpers zu gewährleisten. Diese Mechanismen laufen auf kardialer, vaskulärer und



neurohumoraler Ebene ab und resultieren u.a. in ventrikulärer Hypertrophie, Tachykardie, erhöhtem peripheren Gefäßwiderstand und renaler Flüssigkeits- und Salzretention. Dadurch werden die Herzleistung und Durchblutung zunächst verbessert (Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz). Langfristig erweisen sich diese maladaptiven Prozesse allerdings als dysfunktional und führen zu ventrikulärer Dilatation, Volumenüberladung, Arrhythmien und reduzierter Organperfusion. So kommt es klinisch zur Dekompensation der Herzinsuffizienz (Braunwald, 2013, Tanai and Frantz, 2015). Im Krankheitsverlauf kommt es zu komplexen strukturellen und funktionellen Veränderungen des Herzens als Antwort auf eine Schädigung. Diese werden als kardiales Remodeling zusammengefasst (Tanai and Frantz, 2015). Diese Prozesse werden auf den verschiedenen Stufen – Makro- und Mikrostruktur, Zell- und Molekülebene – untersucht. In den letzten Jahrzehnten erzielte die Forschung große Fortschritte beim Verständnis der Herzinsuffizienz. Trotzdem bleiben viele Fragen zur Pathophysiologie der Erkrankung unbeantwortet, und weiterhin besteht die Notwendigkeit, durch neue Erkenntnisse Prävention, Diagnostik und Therapie zu verbessern.

## **1.2 Elektromechanische Kopplung**

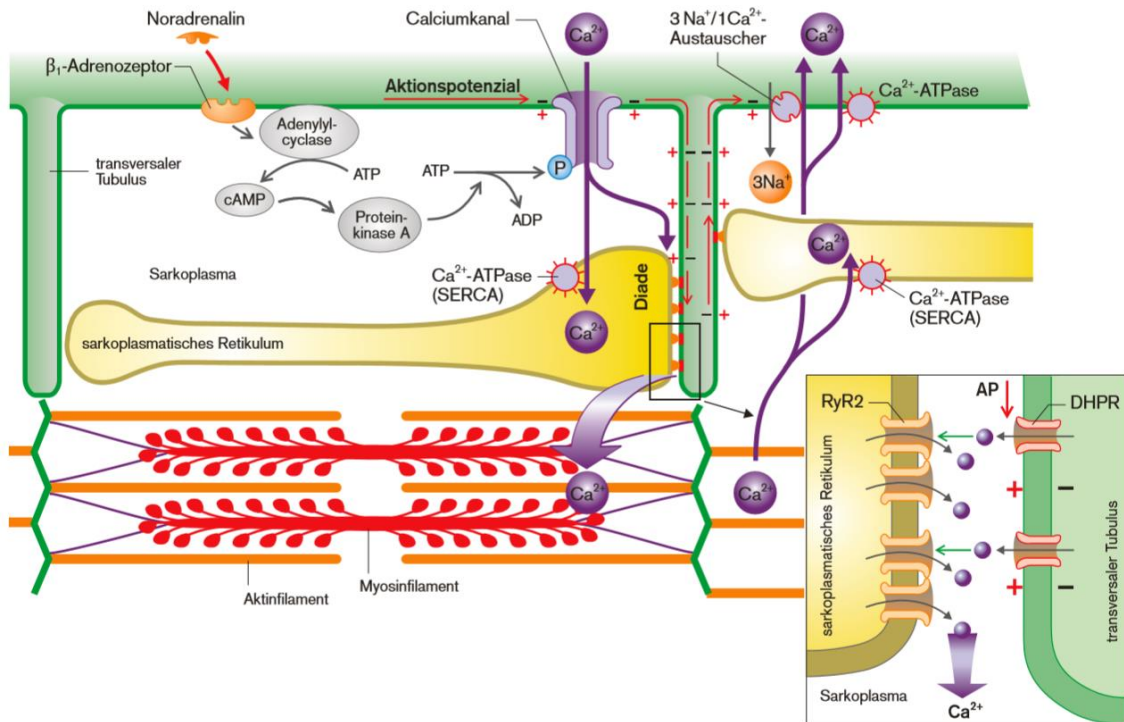
### **1.2.1 Anatomische Grundlagen**

Eine Herzmuskelzelle (auch: Kardiomyozyt) hat eine zylindrische Form von ca. 25-30  $\mu\text{m}$  Breite und 100  $\mu\text{m}$  Länge (Größenangaben für murine ventrikuläre Kardiomyozyten). Herzmuskelzellen bilden ein verzweigtes Netzwerk und sind End-zu-End über sog. Glanzstreifen mechanisch und funktionell miteinander verbunden (Bernstein and Morley, 2006, Bers, 2001). Den kontraktilen Apparat bilden hunderte parallel gelagerte Myofibrillen, die an den Glanzstreifen verankert sind und säulenförmig aus aneinandergereihten Sarkomeren gebildet werden. Sarkomere wiederum bestehen aus Myofilamenten, deren regelmäßige Anordnung ein lichtmikroskopisch erkennbares Querstreifungsmuster ergibt (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Bei einer Kontraktion kommt es zur simultanen Verkürzung der Sarkomere indem die Myofilamente ineinandergleiten. Zwischen den Myofibrillen liegen Mitochondrien in großer Anzahl. Sie nehmen ca. 35% des Zellvolumens ein (Pape et al., 2019, Bers, 2001). Die Myofibrillen sind vom sarkoplasmatischen Retikulum (SR) umgeben, einem Netzwerk membranbegrenzter Hohlräume, welches als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher dient. In der Membran des SR liegen Proteine integriert, u.a. die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) und kardiale Ryanodin-Rezeptoren (RyR2). Das SR gliedert sich in die längs zu den Myofibrillen

verlaufende Tubuli (L-Tubuli) und die zirkulär verlaufenden terminalen Zisternen. Die terminalen Zisternen liegen eng assoziiert zu den T-Tubuli, transversale Einstülpungen des Sarkolemm (Zellmembran der Herzmuskelzelle). In der sarkolemmalen Membran der T-Tubuli treten verstärkt spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auf (Bers, 2001). Die funktionellen Einheiten aus terminalen Zisternen des SR und T-Tubuli werden Diaden genannt, der ca. 10 nm breite Raum zwischen SR und Sarkolemm diadische Spalte. Die Diaden bieten mit der engen räumlichen Verbindung von SR, T-Tubuli und Myofilamenten die strukturelle Voraussetzung der elektromechanischen Kopplung (Pape et al., 2019, Bers, 2001).

### **1.2.2 Physiologie der elektromechanischen Kopplung**

Schrittmacherzellen des Herzens, spezialisierte Kardiomyozyten, generieren Aktionspotentiale, welche über das Erregungsleitungssystem zum Myokard gelangen. Die elektrische Erregung wird in den Zellen des Myokards in eine mechanische Kontraktion übersetzt. Bei den dabei notwendigen Mechanismen, die als elektromechanische Kopplung (excitation-contraction coupling, ECC) zusammengefasst werden, kommt  $\text{Ca}^{2+}$  eine entscheidende Rolle zu (Bers, 2002). Die Abbildung 1 (Abb. 1) zeigt schematisch die im Folgenden erklärten Abläufe des ECC.



**Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung im Herzmuskel**

Die T-Tubuli als tiefe Einstülpungen des Sarkolemm stehen mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum in engem Kontakt und bilden sog. Diaden (siehe Vergrößerung). Das ankommende Aktionspotenzial öffnet die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, auch Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) genannt, und es kommt zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induziert wiederum  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) aus dem SR, die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt an und durch Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}$  mit den Myofilamenten kommt es zur Kontraktion. Die für die anschließende Relaxation notwendige Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt einerseits durch Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR über die SERCA und andererseits durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen.  $\beta_1$ -Adrenozeptorstimulation beeinflusst die elektromechanische Koppelung durch ein komplexes Phosphorylierungsmuster. Abkürzungen: ADP/ATP = Adenosin-di/tri-phosphat, AP = Aktionspotenzial, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, DHPR = Dihydropyridinrezeptoren, SERCA = SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Abbildung nach (Pape et al., 2019) © Georg Thieme Verlag KG

Die elektrische Erregung breitet sich über das Sarkolemm aus, es kommt zur Depolarisation der Zellmembran. In der Folge öffnen sich spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (auch Dihydropyridinrezeptoren genannt), u.a. in der T-Tubuli-Membran lokalisiert, und  $\text{Ca}^{2+}$  strömt aus dem Extrazellulärraum ein ( $I_{\text{Ca}}$ ). Die aufgrund der Diaden-Architektur in nächster Nähe liegenden RyR2 des SR werden durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $I_{\text{Ca}}$ ) aktiviert, sodass durch die RyR2  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt wird. Bei dieser sog.  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release, CICR) steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der diadischen Spalte zwischen SR und Sarkolemm weit über den Spitzenwert der globalen, freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ ) von 1-2  $\mu\text{mol/l}$ . In Modellen wurden für die diadische Spalte maximale Werte von 10  $\mu\text{mol/l}$  bis 7  $\text{mmol/l}$  innerhalb weniger Millisekunden nach Öffnung der RyR2 berechnet. Die diadische Spalte ist ein Beispiel für räumlich und zeitlich unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Zytosol, die als

Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomäne bezeichnet wird (Maack and O'Rourke, 2007, Rizzuto and Pozzan, 2006). Gemeinsam führen CICR aus dem SR und der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von extrazellulär zur Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> von 100 nmol/l diastolisch auf 1-2 µmol/l systolisch (Bers, 2002). Je nach Spezies tragen diese beiden Mechanismen mit unterschiedlichen Anteilen zur Erhöhung des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> bei: Beim Menschen stammt ca. 70% des Ca<sup>2+</sup> aus dem SR, 30% aus dem Extrazellulärraum. Bei Maus und Ratte ist der Anteil des SR mit ca. 90% noch größer (Bers, 2001). Der Ca<sup>2+</sup>-Anstieg führt zur Bindung von Ca<sup>2+</sup> an das myofilamentäre Protein Troponin C, durch eine Konformationsänderung wird das Ineinandergleiten der Myofilamente (der sog. Querbrückenzyklus) und damit die Kontraktion der Zelle möglich (Bers, 2008, Pape et al., 2019). Damit Ca<sup>2+</sup> wieder von seinen myofilamentären Bindungsstellen abdiffundieren und es zur Relaxation kommen kann, muss [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> wieder sinken. Daran sind mehrere direkt oder indirekt energieverbrauchende Transportprozesse beteiligt. Über die SERCA wird Ca<sup>2+</sup> ATP-abhängig wieder ins SR aufgenommen. Nach extrazellulär wird Ca<sup>2+</sup> über den sarkolemmalen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) und – zu geringerem Anteil – die sarkolemmale Ca<sup>2+</sup>-ATPase transportiert. Der Beitrag der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme an der diastolischen Ca<sup>2+</sup>-Elimination und ihr Einfluss auf das ECC wird unterschiedlich eingeschätzt und diskutiert (O'Rourke and Blatter, 2009, Kohlhaas and Maack, 2013, Williams et al., 2013). Mittlerweile ist die vorherrschende Meinung, dass das Ausmaß der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme das ECC kaum beeinflusst (Bertero and Maack, 2018a, Williams et al., 2013).

### **1.2.3 Modulation der elektromechanischen Kopplung**

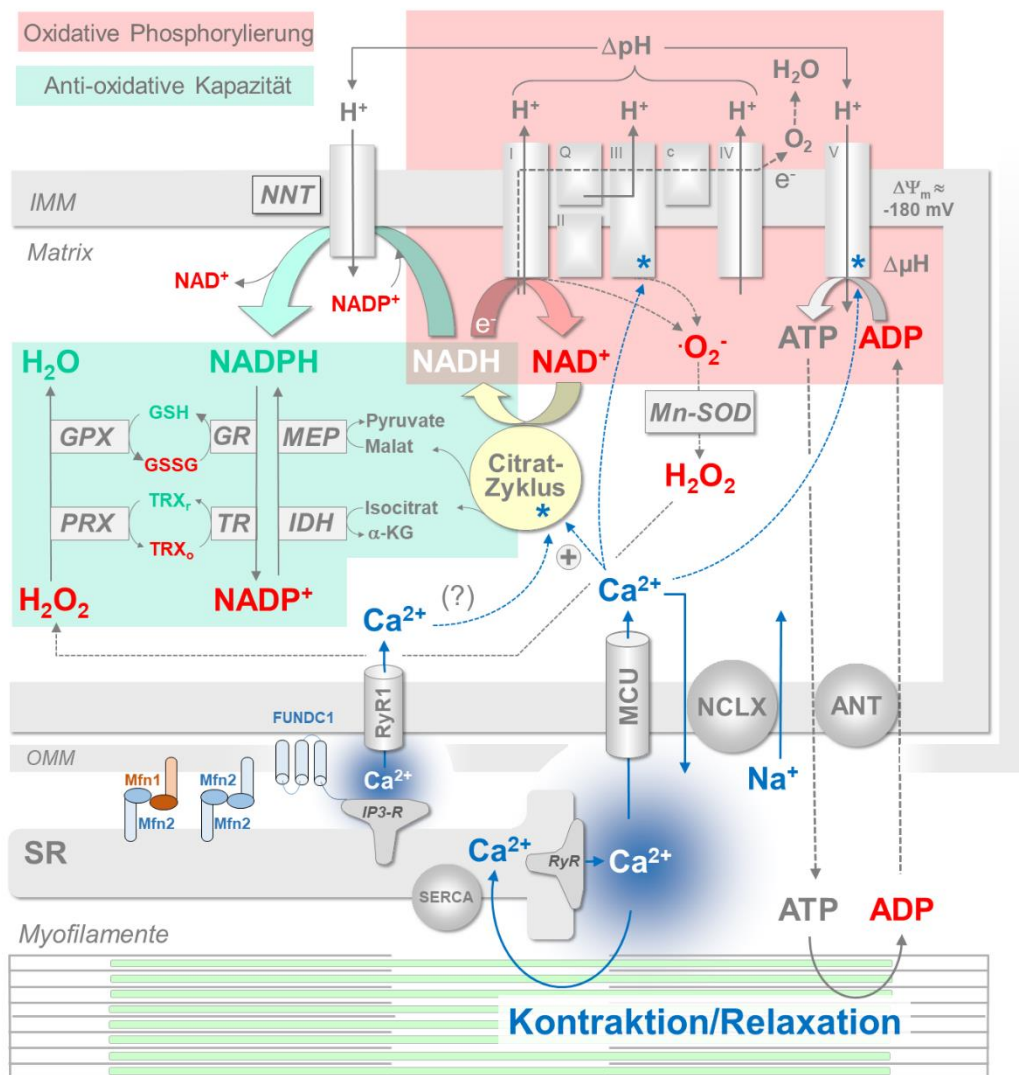
Die Steuerung der Kontraktionskraft des Herzens kann zum einen durch Modulation der Dauer und/oder Amplitude des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten erfolgen. Zum anderen kann die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Myofilamente beeinflusst werden (Pape et al., 2019, Bers, 2002). Bei den meisten Säugetierarten nimmt die Kontraktionskraft mit steigender Herzfrequenz (in einem physiologischen Bereich) zu, man spricht von einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung (Bers, 2001, Antoons et al., 2002). Bei jedem Kontraktionszyklus entspricht die von extrazellulär aufgenommene Ca<sup>2+</sup>-Menge (Influx) der wieder abgegebenen Ca<sup>2+</sup>-Menge (Efflux). Das gilt für Kardiomyozyten, die sich in einem steady state (Gleichgewichtszustand) befinden (Eisner et al., 2017, Bers, 2002). Ein Ungleichgewicht zwischen Influx und Efflux kann vorübergehend, z.B. bei Veränderung der Herzfrequenz, bestehen und verändert den Ca<sup>2+</sup>-Transienten und damit die Kontraktion. Bei einer Erhöhung der Herzfrequenz übersteigt der Ca<sup>2+</sup>-Influx zeitweise den Efflux und resultiert in einem höheren Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR. In der Folge

wird auch bei jedem Zyklus des ECC mehr  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol freigesetzt, die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nimmt zu und damit die Kontraktionskraft pro Schlag (Trafford et al., 1997, Antoons et al., 2002). Mit der Frequenz steigt auch das diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  und führt einerseits zu stärkerem Efflux über den NCX und andererseits inaktiviert es L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Letztere werden zudem durch die schon erwähnte höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR inaktiviert. Insgesamt führt dies zu einem geringerem Influx (Eisner et al., 2017). Durch diese Mechanismen wird das Influx-Efflux-Gleichgewicht nach Frequenzerhöhung bei gleichzeitig gesteigertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR und erhöhter Kontraktionskraft wiederhergestellt. In vivo steigt die Herzfrequenz durch Aktivierung des Sympathikus (positiv chronotrope Wirkung). In Belastungssituationen wird die Herzarbeit durch die sympathisch vermittelte Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin physiologisch angepasst. Die Katecholaminwirkung wird über Bindung an  $\beta$ -Adrenorezeptoren vermittelt (Abb. 1). Dabei werden intrazellulär G-Proteine und in der Folge Adenylatcyclasen aktiviert, der Botenstoff cAMP wird synthetisiert und dieser wiederum aktiviert cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA). Die PKA moduliert über komplexe Phosphorylierungsprozesse verschiedene, am ECC beteiligte Proteine. In Kardiomyozyten wird der sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gesteigert, gleichzeitig wird der Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten über die NCX- und SERCA-Aktivität beschleunigt. Die Amplitude des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR nehmen zu. Daraus resultieren eine verstärkte Kontraktionskraft (positiv inotrop) und eine beschleunigte Relaxation (positiv lusitrop) (Bers, 2001, Pape et al., 2019).

### **1.3 Mitochondrien und der zelluläre Energiehaushalt**

In Herzmuskelzellen verbrauchen die Prozesse der ECC große Energiemengen, welche zum Großteil (ca. 95%) in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien bereitgestellt wird. Dabei entfallen ca. 60-70% auf Kontraktionsarbeit, 30-40% auf Ionenkanäle und -pumpen und 1-2% auf strukturerhaltende Prozesse (Bertero and Maack, 2018b, Stanley et al., 2005). Pro Herzschlag verbraucht eine Zelle ca. 2% seines gesamten ATPs, innerhalb weniger Sekunden wird der ATP-Pool erneuert (Maack and O'Rourke, 2007, Balaban, 2002). Unter physiologischen Bedingungen wird die Resynthese an die Rate der ATP-Hydrolyse angepasst, sodass die ATP-Konzentration möglichst konstant gehalten wird (Balaban, 2009a). Mitochondrien kommt daher als Energieproduzenten in Herzmuskelzellen eine bedeutende Rolle zu. Das wird auch durch die hohe Anzahl an

Mitochondrien und ihre strategische Lokalisation nahe energieverbrauchender Prozesse (Myofilamente, SR, T-Tubuli) deutlich. Mitochondrien sind (je nach Zelltyp) schlauchförmige oder ovale Zellorganellen, deren Wand aus zwei Membranen besteht: Eine äußere, glatte Membran (OMM) und eine innere, stark gefaltete Membran (IMM). Dazwischen liegt der intermembranäre Raum. Die IMM umschließt die mitochondriale Matrix, und ihre Oberfläche ist durch Auffaltungen (Cristae) deutlich vergrößert (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). In der Matrix werden energiereiche Substrate zur ATP-Synthese umgesetzt. Beim Abbau von Fettsäuren, Glucose und Laktat entstehen in mehreren Schritten, zuletzt im Citratzyklus, die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Flavinadenindinucleotid (FADH<sub>2</sub>). Über sequenzielle Redoxreaktionen der Atmungskette, welche an der IMM lokalisiert ist, werden die Reduktionsäquivalente in der Anwesenheit von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O oxidiert. Die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen über die IMM zu transportieren. So werden der Protonengradient ( $\Delta\text{pH}$ ) und das Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) über der IMM aufgebaut, welche gemeinsam als sog. proton motive force ( $\Delta\mu_H$ ) Treibkraft für die ATP-Synthase sind. Entlang des elektrochemischen Gradienten strömen Protonen über die ATP-Synthase zurück in die Matrix und ermöglichen die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) (Stanley et al., 2005, Cortassa et al., 2003, Balaban, 2009a). Der mitochondriale Energiestoffwechsel ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.



### Abbildung 2: Mitochondrialer Energiestoffwechsel und antioxidative Kapazität

Im Rahmen der elektromechanischen Kopplung wird  $Ca^{2+}$  über den RyR aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt und nach der Kontraktion über die SERCA wieder aufgenommen. SR und Mitochondrium sind an Kontaktstellen eng miteinander verbunden, daran beteiligt sind die in der SR-Membran bzw. OMM verankerten Proteine Mfn1/2 und FUNDC1. Die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium erfolgt über den mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporter (MCU) und den mitochondrialen Ryanodin-Rezeptor (RyR1). In der mitochondrialen Matrix werden  $Ca^{2+}$ -abhängig Schlüsselenzyme des Citratzyklus, der Komplex III der Atmungskette und die ATP-Synthase (Komplex V) aktiviert (jeweils mit \* markiert). Das vom Citratzyklus regenerierte NADH dient einerseits der oxidativen Phosphorylierung (hellrot hinterlegt) und andererseits der Regeneration der antioxidativen Kapazität, welche zur Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies benötigt wird (grün hinterlegt).

Abkürzungen: I-V = Komplexe der Atmungskette I-V,  $\alpha$ -KG =  $\alpha$ -Ketoglutarat, ANT = Adenin-Nukleotid-Translokator, FUNDC1 = FUN14 domain containing 1, GPX = Glutathionperoxidase; GR = Glutathionreduktase, GSH/GSSG = reduziertes/oxidiertes Glutathion, IMM = innere Mitochondrienmembran, IDH = Isocitratdehydrogenase, MEP = Malatdehydrogenase, Mfn1/2 = Mitofusin 1/2, Mn-SOD =  $Mn^{2+}$ -abhängige Superoxiddismutase, NnT = mitochondriale NAD(P)-Transhydrogenase, NCLX =  $N^+/Ca^{2+}/Li^+$  permeable Austauscher, OMM = äußere Mitochondrienmembran, PRX = Peroxiredoxin, RyR = Ryanodin-Rezeptor, SERCA = SR  $Ca^{2+}$ -ATPase, TRXr/TRXo = reduziertes/oxidiertes Thioredoxin, TR = Thioredoxinreduktase.

Abbildung mit Genehmigung übersetzt nach (Bertero and Maack, 2018a) © 2018 American Heart Association, Inc. Wolters Kluwer Health, Inc. and its Societies take no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.

Unter physiologischen Bedingungen kann der Energiebedarf des Herzens stark schwanken. Dem wird mit der unmittelbaren Anpassung der Energieproduktion begegnet, um das intrazelluläre Verhältnis von ATP/ADP und das Redoxstatus-Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Experimentell wird gezeigt, dass ADP- und ATP-Level auch bei Erhöhung der physiologischen Herzarbeit annähernd stabil bleiben (Balaban, 2002, Katz et al., 1989). Wichtige Regulatoren des Energiehaushalts sind ADP und Calcium (Territo et al., 2000, Bertero and Maack, 2018b, Balaban, 2009b). Bei erhöhter Herzarbeit kommt es vermittelt durch  $\beta$ adrenerge Stimulation zu gesteigertem ATP-Verbrauch. Das dabei vermehrt anfallende ADP stimuliert die ATP-Synthase-Aktivität. Dies wiederum führt zum beschleunigtem Elektronenfluss über die Atmungskette und zur vermehrten Oxidation von NADH und  $FADH_2$ . Gleichzeitig erhöhen sich die Amplitude des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten (siehe dazu auch 1.2.3 Modulation der elektromechanischen Kopplung) und die mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme. Im Mitochondrium führt  $Ca^{2+}$  zur Aktivierung wichtiger Schlüsselenzyme des Krebszyklus, sodass die Reduktionsäquivalente beschleunigt regeneriert werden (Denton et al., 1980, Denton, 2009). Zugleich aktiviert  $Ca^{2+}$  den Komplex III der Atmungskette und die ATP-Synthase (Territo et al., 2000, Glancy and Balaban, 2012).  $Ca^{2+}$  spielt hier also eine doppelte Schlüsselrolle, einerseits beschleunigt es den Elektronenfluss über die Atmungskette (pull) und andererseits führt es zur Regeneration der Reduktionsäquivalente (push), ein Umstand der parallel activation genannt wird (Abb. 2 und (Kohlhaas et al., 2017, Balaban, 2002)). Angesichts der zentralen regulatorischen Funktion von  $Ca^{2+}$  im Energiehaushalt ist es wichtig, die Mechanismen und die Kinetik des mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Haushalts zu verstehen.

## **1.4 Mitochondrialer Calciumhaushalt**

### **1.4.1 Signalmolekülfunktionen**

$Ca^{2+}$  fungiert in Kardiomyozyten in vielfältiger Weise als Signalmolekül. Es reguliert elektrophysiologische Vorgänge und ist zentraler Vermittler des ECC (siehe 1.2.2 Physiologie der elektromechanischen Kopplung). Des Weiteren beeinflusst  $Ca^{2+}$  die nukleäre Transkription (dazu ausführlicher in 1.7 Einfluss von Calcium auf die Genexpression in Kardiomyozyten), den Metabolismus, den Energiehaushalts und den Zelltod (Balaban, 2009b, Bers, 2008, Wu et al., 2006).

In Mitochondrien trägt  $Ca^{2+}$  dazu bei, die Energieproduktion an den aktuellen Bedarf anzupassen und die antioxidativen Kapazität zu regenerieren (Kohlhaas et al., 2017).



Daneben kann eine exzessive Aufnahme mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung sowie oxidativer Stress und anorganische Polyphosphate zur Aktivierung der mPTP (mitochondrial permeability transition pore) führen. Die Öffnung des mPTP gefährdet die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) und der Energieproduktion, was den Zelltod zu Folge haben kann (Seidlmayer et al., 2015, Dedkova and Blatter, 2013).

#### 1.4.2 Mitochondriale Calciumaufnahme

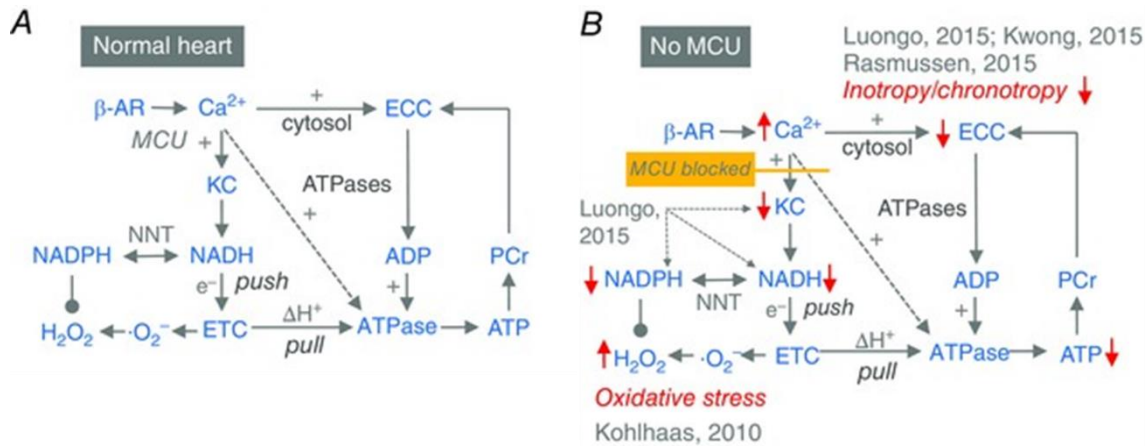
Die genauen Mechanismen der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, deren (patho-)physiologische Relevanz sowie der Einfluss auf das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  sind noch nicht vollständig verstanden und daher Diskussionsgegenstand (O'Rourke and Blatter, 2009, Williams et al., 2013). Umstritten ist insbesondere die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (pulsatil/schnell vs. kumulativ/langsam) (Dedkova and Blatter, 2013, Maack and O'Rourke, 2007, Hüser et al., 2000).

Die OMM passiert  $\text{Ca}^{2+}$  durch den unselektiven Kanal VDAC (voltage dependant anion channel). Über die IMM erfolgt die Aufnahme entlang des elektrochemischen Gradienten mit der Treibkraft des Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m \approx -180 \text{ mV}$ ). Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die IMM werden verschiedene Mechanismen beschrieben. Als primärer Mechanismus anerkannt und am besten charakterisiert ist der Mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU). Er wird auch MCU-Komplex genannt, welcher den makromolekularen Komplex mit porenbildenden und regulatorischen Untereinheiten umfasst. Während seine physiologischen Eigenschaften schon länger bekannt waren, konnte 2011 die molekulare Struktur der porenbildenden Einheiten identifiziert werden (De Stefani et al., 2011, Baughman et al., 2011). In den Folgejahren wurden die regulatorischen Untereinheiten besser charakterisiert (Sancak et al., 2013, Oxenoid et al., 2016). Trotz der großen Erkenntnisse bleibt die genaue molekulare Zusammensetzung des MCU-Komplexes nicht vollständig geklärt (Kwong, 2017). Der MCU besitzt eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität und Transportkapazität, seine Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  ist allerdings niedrig. Die angegebenen Werte für die halbmaximale Aktivierung unterscheiden sich zwar (bei Giacomello et al.  $K_d = 20\text{-}50 \mu\text{mol/l}$ , bei Kirichok et al.  $K_d \approx 19 \text{ mmol/l}$  angegeben), jedoch liegen sie alle deutlich über den bei jedem Herzschlag physiologischerweise erreichten globalen zytosolischen Werten von ca.  $1\text{-}2 \mu\text{mol/l}$  (Kirichok et al., 2004, Giacomello et al., 2010). Wie trotz dieses scheinbaren Widerspruchs  $\text{Ca}^{2+}$  über den MCU aufgenommen werden kann, wird mit dem Konzept der mitochondrialen Mikrodomänen erklärt (siehe 1.2.2 Physiologie der elektromechanischen Kopplung)

(Rizzuto and Pozzan, 2006, Dorn and Maack, 2013, Kohlhaas and Maack, 2013). In diesen spezialisierten Arealen liegen Mitochondrien und SR dicht gelagert, stellenweise ist der trennende Spalt nur ca. 15-20 nm breit (Chen et al., 2012). Zudem enthält die IMM an den Kontaktstellen mit OMM und SR eine hohe Dichte an MCU-Komplexen (De La Fuente et al., 2016). Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem SR kommt es lokal zu hohen, deutlich über den globalen zytosolischen Werten (1-2  $\mu\text{mol/l}$ ) liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (10-30  $\mu\text{mol/l}$ ). Diese führen, trotz der niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des MCU, zur mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Giacomello et al., 2010, Peskoff and Langer, 1998).

Nähere Erkenntnisse zur weiterhin kontrovers diskutierten Funktion des MCU wurden durch verschiedene Modelle mit MCU-Deletion gewonnen. Entwickelt wurden Tiermodelle mit konstitutivem globalen Knock-out (KO) (Pan et al., 2013, Holmström et al., 2015), mit konditionalem herzspezifischen KO (cKO) (Kwong et al., 2015) bzw. mit Expression einer dominant-negativen MCU-Form (dnMCU) (Wu et al., 2015, Rasmussen et al., 2015). Gemeinsam ist den Modellen, dass keine schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium möglich ist und gleichzeitig bei Ruhebedingungen (niedrige Stimulationsfrequenz, keine katecholaminerge Stimulation) weder ein pathologischer Phänotyp noch Veränderungen des Energiehaushalts beobachtet werden. Dahingegen zeigt sich die kardiale Funktion *in vivo* und *in vitro* unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eingeschränkt. Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischem MCU-KO benötigten in einem Sprintversuch eine längere Aufwärmphase bevor sie die gleiche Leistung absolvierten wie die Kontrolltiere (Kwong et al., 2015). Erklärt wird das mit einer Abschwächung der inotropen nicht aber der chronotropen Reaktion. Konkret war die Anpassung der Drucksteigerung im Herzen und der Kontraktilität bei den cKO-Mäusen deutlich verzögert und glich sich nach 80 Minuten (min) den Werten der Kontrollen an (Luongo et al., 2015, Kwong et al., 2015). Die Herzfrequenz hingegen war bei beiden Gruppen vergleichbar (Luongo et al., 2015). Auch Tiere des dnKO-Modells mit dominantnegativer MCU-Form zeigten unter akuter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine abgeschwächte inotrope Reaktion und zusätzlich, und damit anders als die cKO-Mäuse, einen verringerten Herzfrequenzanstieg (Wu et al., 2015, Rasmussen et al., 2015). *In vitro* resultierte die  $\beta$ -adrenerge Stimulation bei cKO-Kardiomyozyten zunächst in einem geringeren mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt (Kwong) und einer reduzierten metabolischen Reaktion mit erniedrigtem Sauerstoffverbrauch und ATP-Gehalt. Während bei Kontrollzellen der Redox-Status von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ausgeglichen bleibt (Modell der parallelen Aktivierung, 1.3 Mitochondrien und der

zelluläre Energiehaushalt), verschiebt sich der Redox-Status bei Blockade des MCU hin zu vermehrter Oxidation, da die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Krebszyklus-Enzymaktivität zu weniger Reduktionsäquivalenten führt (weniger push im Modell) (Luongo et al., 2015). Gleichzeitig überwiegt der  $\beta$ -adrenerg erhöhte ATP-Verbrauch, der über die Atmungskette Reduktionsäquivalente verbraucht (mehr pull im Modell) (Kohlhaas et al., 2017). Diese Erklärung ist übereinstimmend mit Untersuchungen an Meerschweinchen-Kardiomyozyten, die bei Blockade des MCU mit Ru360 und  $\beta$ -adrenerger Stimulation ebenfalls einen zur Oxidation hin verschobenen Redoxstatus und damit einhergehenden oxidativen Stress zeigen (Kohlhaas et al., 2010). Die beschriebenen Veränderungen sind auf der Abb. 3 von Kohlhaas et al. (2010) übersichtlich dargestellt. Wichtig zu erwähnen ist, dass die beschriebenen bioenergetischen Unterschiede zwischen cKO-Zellen und Kontrollzellen nur anfänglich bestanden und sich nach längerer  $\beta$ -adrenerger Stimulation die Werte für mitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  (nach 30 min), für Sauerstoffverbrauch, Krebszyklus-Enzymaktivität und NADH-Produktion (jeweils nach ca. 80 min) angleichen. Die Autoren vermuten hier andere Adaptationsmechanismen und alternative Wege der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Luongo et al., 2015, Kwong et al., 2015). Auf Basis der Erkenntnisse argumentieren verschiedene Autoren nun, dass die MCU-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme die rasche Anpassung der mitochondrialen Energieproduktion an eine akute, nicht aber eine chronische Arbeitssteigerung bzw.  $\beta$ -adrenerge Stimulation im Sinne einer sympathischen fight or flight-Reaktion vermittele, wohingegen sie für die basale kardiale Funktion keine entscheidende Rolle spiele (Kwong et al., 2015, Luongo et al., 2015, Wu et al., 2015).



**Abbildung 3: Effekte einer gestörten mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme auf Redoxstatus und Energiehaushalt**

**A** Zur Anpassung der Energieproduktion steigert Ca<sup>2+</sup> physiologisch die NADH-Synthese durch Aktivierung des Krebszyklus, sodass mehr Reduktionsäquivalente für die ETC zur Verfügung stehen (push von Elektronen). Gleichzeitig steigern Ca<sup>2+</sup> und ADP die Aktivität der ETC (pull von Elektronen) zur Regenerierung des Protonengradienten, welche Treibkraft für die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase ist. **B** zeigt schematisch die veränderte Modulierung des Redoxstatus und der Atmungsaktivität bei Blockade des MCU, basierend auf experimentellen Ergebnissen von Luongo et al., 2015, Kwong et al., 2015, Kohlhaas et al., 2010, Rasmussen et al., 2015.

Abkürzungen: ATPases = ATP-verbrauchende Enzyme u.a. SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Myosin-ATPase und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, β-AR = β-adrenerger Rezeptor; EEC = Elektromechanische Kopplung, ETC = engl. electron transport chain (Atmungskette), KC = Krebszyklus, MCU = Mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Uniporter, NNT = Nicotinamid Nucleotide Transhydrogenase, PCr = Phosphocreatinin. Die roten Pfeile signalisieren Zu- bzw. Abnahme.

Abbildung mit Genehmigung aus (Kohlhaas et al., 2017) © 2017 The Authors. The Journal of Physiology © 2017 The Physiological Society.

Untersuchungen des mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Influx ergaben Hinweise auf mehrere Aufnahmewege mit unterschiedlichen kinetischen, biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften. Eine rechnerische Modellierung der Ca<sup>2+</sup>-Dynamik in isolierten Mitochondrien postuliert zwei Aufnahmewege (Tewari et al., 2014). Experimentell konnten sowohl bei isolierten humanen Mitochondrien (Michels et al., 2009) als auch bei isolierten Meerschweinchen-Mitochondrien (Wei et al., 2012) zwei verschiedene Aufnahmewege gezeigt werden, die sich u.a. in ihrer Ca<sup>2+</sup>-Affinität, ihrer Sensitivität gegenüber der Blockade mit Ru360 und ihrer Öffnungseigenschaften unterschieden. Wei et al. beschreiben zum einen den MCU<sub>mode1</sub>, welcher schon bei geringen Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen von 0,1-2 μmol/l einen schnellen Anstieg des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mito</sub> vermittelt. Zum anderen wird vom MCU<sub>mode2</sub> gesprochen, welcher bei größeren Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen von 2-15 μmol/l den Hauptanteil der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme übernimmt und zu einem langsameren Anstieg des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mito</sub> führt. MCU<sub>mode2</sub> wird schon bei geringer Konzentration von Ru360 geblockt (<100 nmol/l) und reagiert damit sensitiver auf Ru360 als MCU<sub>mode1</sub>. Die Autoren überlegen, dass MCU<sub>mode1</sub> die Modulierung des Energiehaushalts bei Veränderungen im physiologischen Bereich von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> vermittele, während der MCU<sub>mode2</sub> und ein mitochondriales Ca<sup>2+</sup>-Puffersystem bei

pathologisch hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werten im Zytosol als  $\text{Ca}^{2+}$ -Senke und damit als Schutzmechanismus dienen (Wei et al., 2012). Es wird zudem diskutiert, ob diese unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmewege mit verschiedenen Modi des MCU erklärt werden können oder ob es andere Aufnahmemechanismen gibt. Letzteres wird durch zunehmende Evidenz unterstützt und gilt als wahrscheinlicher (Bertero and Maack, 2018a, Dedkova and Blatter, 2013, Bondarenko et al., 2013). Im Folgenden soll deshalb auf weitere mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmemechanismen eingegangen werden.

Der mitochondriale Ryanodin-Rezeptor 1 (mRyR1) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der IMM (Beutner et al., 2001, Ryu et al., 2011). Er ähnelt in seinen Eigenschaften dem Ryanodin-Rezeptor 1 (RyR1) des Skelettmuskels und hat bei geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spezifität eine hohe Leitfähigkeit, zeigt maximale Aktivität bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (10-100  $\mu\text{mol/l}$ ) und wird durch höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen inaktiviert (Beutner et al., 2005, Altschafel et al., 2007, Ryu et al., 2011). Bertero und Maack äußern Bedenken, ob angesichts der hohen Leitfähigkeit und der geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität eine signifikante  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium möglich ist, ohne die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zu gefährden (Bertero and Maack, 2018a). Dagegen verweisen O-Uchi et al. auf das schnelle,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierungs-/Inaktivierungsprofil des mRyR1 und auf seine geringe Expression, welche nur zu lokalisierten Depolarisationen des Membranpotentials führe. O-Uchi et al. argumentieren weiter, dass die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Enzyme in der Matrix wiederum zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials beitrage (O-Uchi et al., 2012). Beutner et al. untersuchen neonatale Mäuse mit KO des mRyR1 und stellen bei deren kardialen Mitochondrien eine deutlich reduzierte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette fest, wohingegen in der Kontrollgruppe die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 den Sauerstoffverbrauch steigert (Beutner et al., 2005). Die Autoren postulieren für den mRyR1 eine Rolle bei der Anpassung des mitochondrialen Stoffwechsels an den Energiebedarf, dem sog. excitation-metabolism-coupling. Die physiologischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten des ECC führten zu schneller mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1, woraufhin  $\text{Ca}^{2+}$  im Mitochondrium als Signalmolekül fungiere, um u.a. Enzyme des Krebszyklus und die ATP-Synthese zu aktivieren (Ryu et al., 2011, Beutner et al., 2005). In Einklang damit stehen die Ergebnisse von O-Uchi et al., die bei kardialen H9c2-Myoblasten mit Überexpression des mRyR1 eine verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und gesteigerte ATP-Produktion beschreiben (O-Uchi et al., 2013). Auch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe von Seidlmayer et al. geben Hinweise darauf, dass der mRyR1 als Vermittler zwischen dem basalen Energiebedarf und dem

mitochondrialen Metabolismus dient, indem er  $\text{Ca}^{2+}$ , welches  $\text{IP}_3$ -induziert aus dem SR ausgeschüttet wird, ins Mitochondrium aufnimmt und in der Folge die ATP-Synthese steigert (siehe 1.5  $\text{IP}_3$ -Signalweg) (Seidlmayer et al., 2016). Die genaue Funktion und Bedeutung des mRyR1 ist aber weiterhin kontrovers und erfordert weitere Untersuchungen (Bertero and Maack, 2018a, Dedkova and Blatter, 2013, O-Uchi et al., 2012).

Der medikamentöse Inhibitor des mRyR1 ist Dantrolen. Dantrolen wirkt als Inhibitor von Ryanodinrezeptoren. Einerseits blockiert es den RyR1, der sich vor allem in der Skelettmuskulatur befindet (Ellis et al., 1976). So erklärt sich auch die klinische Anwendung als muskelrelaxierendes Medikament, z.B. bei Maligner Hyperthermie. Andererseits blockiert Dantrolen auch den mRyR1, der – wie eben erläutert – eng verwandt mit dem RyR1 ist und sich in der IMM von Kardiomyozyten befindet. Ein relevanter Effekt von Dantrolen auf das ECC ist hingegen nicht anzunehmen: Seidlmayer et al. haben an Kardiomyozyten von 10-16 Wochen alten Mäusen gezeigt, dass Dantrolen die Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern von ventrikulären Kardiomyozyten nicht verändert (Seidlmayer et al., 2016). Diese Ergebnisse decken sich mit Studien an Kardiomyozyten von Mäusen vergleichbaren Alters, die darüber hinaus zeigen, dass Dantrolen auch bei höheren Stimulationsfrequenzen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nicht verändert (Domeier et al., 2014).

Als weitere Wege der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme werden u.a. der rapid-mode-of- $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (RaM) (Sparagna et al., 1995), der Letm1 (leucine-zipper-EF-hand-containing-transmembrane protein 1), ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher (Jiang et al., 2009) und der TRPC3 (transient receptor potential canonical 3) diskutiert (Feng et al., 2013).

### **1.4.3 Mitochondrialer Calciumefflux**

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über die IMM erfolgt über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-Li}^+$ -Austauscher (NCLX), der ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion aus der mitochondrialen Matrix im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ - (oder  $\text{Li}^+$ -) Ionen aus dem Zytosol transportiert (Palty et al., 2010, Marinelli et al., 2014). Die Treibkraft für den Austausch ist der elektrochemische Gradient für  $\text{Na}^+$ . Dieser Gradient wird durch den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aufrechterhalten, welcher unter Ausnutzung des Protonengradienten über der IMM ein  $\text{Na}^+$ -Ion aus dem Mitochondrium ausschleust. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über den NCLX ist energieaufwendig, denn er führt zum Abbau des Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) und des Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ), da der Austausch elektrogen (3  $\text{Na}^+$  vs. 2  $\text{Ca}^{2+}$ ) ist. Die Kinetik des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux ist

wesentlich langsamer als der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, sodass es bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation zur Kumulation und damit zur Erhöhung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  kommt. Im Mitochondrium spielt  $\text{Ca}^{2+}$  u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts (siehe 1.3 Mitochondrien und der zelluläre Energiehaushalt) (Maack et al., 2006, Lu et al., 2013). Anders ist die Situation bei erhöhter zytosolischer  $\text{Na}^+$ -Konzentration, die z.B. für pathophysiologische Veränderung bei Herzinsuffizienz beschrieben ist: Hier erhöht sich der elektrochemische Gradient für Natrium, der Austausch über den NCLX wird beschleunigt und senkt damit das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  (Maack et al., 2006).

## 1.5 $\text{IP}_3$ -Signalweg

Für die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  als Signalmolekül spielt die Familie der Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle in Kardiomyozyten eine wichtige Rolle (Kockskämper et al., 2008).  $\text{IP}_3\text{R}$ s sind hauptsächlich in der Membran des SR lokalisiert. Die  $\text{IP}_3\text{R}$  werden durch die gleichzeitige Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) aktiviert. Letzteres entsteht in einer Signalkaskade durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) durch die Phospholipase C (PLC). Auslöser dieser Kaskade sind wiederum verschiedene Hormone wie z.B. Endothelin 1 (ET-1) oder Angiotensin II (AngII) (Sugden, 2003, Remus et al., 2006). AngII bindet an den Angiotensin 1-Rezeptor (AT1-R), welcher als Gq-gekoppelter Membranrezeptor die PLC und in der Folge  $\text{IP}_3$  erhöht. AngII führt also zu einer AT1-R-vermittelten Steigerung der  $\text{IP}_3$ -Konzentration.

Der  $\text{IP}_3\text{R}$  existiert in drei Isoformen, die Unterschiede in ihrer Affinität zu  $\text{IP}_3$ , ihrer Aktivität und deren Regulation aufweisen, und deren Expression je nach Spezies und Zellart variiert (Kockskämper et al., 2008, Bezprozvanny, 2005). Im Vergleich zu den RyR2 ist die Dichte der  $\text{IP}_3\text{R}$  in der SR-Membran gering, in ventrikulären Kardiomyozyten liegt das Verhältnis bei ca. 1:100 (Kockskämper et al., 2008). Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus einer Gruppe von RyR2 im Rahmen des CICR (1.2.2 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung) wird von  $\text{Ca}^{2+}$ -sparks gesprochen, die in ihrer Summe den globalen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bilden.  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus einzelnen  $\text{IP}_3\text{R}$ s (sog.  $\text{Ca}^{2+}$ -blips) und aus Gruppen von  $\text{IP}_3\text{R}$  (sog.  $\text{Ca}^{2+}$ -puffs) wurden experimentell nachgewiesen und weisen eine langsamere Kinetik und niedrigere Amplitude als  $\text{Ca}^{2+}$ -sparks auf (Zima and Blatter, 2004, Wullschleger et al., 2017). Bemerkenswert ist dabei, dass der  $\text{IP}_3$ -Signalweg den CICR und damit das ECC beeinflussen kann. ET-1 und  $\text{IP}_3$  steigern das diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  (Li et al., 2005, Zima and Blatter, 2004) und veränderten die Kinetik des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

zugunsten eines verlängerten Anstiegs und eines schnelleren Abfalls (Kockskämper et al., 2008). In Vorhof- und Ventrikelmyozyten hat  $IP_3$  einen positiv inotropen Effekt (Proven, 2006, Zima and Blatter, 2004). Es steigert die fraktionelle  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR und damit die zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten bei gleichzeitig kaum verändertem SR- $Ca^{2+}$ -Gehalt (Kockskämper et al., 2008).

Des Weiteren konnten Seidlmayer et al. den Einfluss von  $IP_3$ -vermittelten  $Ca^{2+}$ -Signalen auf basale metabolische Funktion von Mitochondrien zeigen. Die Stimulation von murinen Kardiomyozyten mit ET-1, welches u.a. die  $IP_3$ -Konzentration erhöht, resultierte in einer mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Aufnahme mit konsekutiver Aktivierung der ATP-Produktion. Dieser Effekt wurde bei Blockade des  $IP_3R$  bzw. in Zellen von funktionellen  $IP_3$ -KO-Mäusen nicht mehr beobachtet. Zusätzlich ließ sich die mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme durch den Blocker des mRyR1, Dantrolen, abschwächen, während der MCU-Blocker Ru360 darauf keinen Einfluss hatte. Daraus folgt, dass ET-1 den mitochondrialen Metabolismus durch  $IP_3$ -vermittelte, mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 beeinflusst (Seidlmayer et al., 2016). Weitere Arbeiten bestätigten diese Signalachse und identifizierten das Protein Mfn2 als wichtige Strukturkomponente der SR-mitochondrialen Interaktion in murinen Kardiomyozyten. Bei kardiospezifischem KO von Mfn2 lässt sich der Effekt von ET-1, eine signifikante  $IP_3$ -vermittelte mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme zu bewirken, nicht mehr beobachten und in der Folge kommt es zu einem energetischen Defizit und gesteigerter Superoxidbildung (Seidlmayer et al., 2019).

$IP_3R$  sind neben der SR-Membran auch in der Kernmembran lokalisiert (Bare et al., 2005, Zima et al., 2007). Ihre Rolle bei der Beeinflussung des nukleären  $Ca^{2+}$ -Transienten und der Gentranskription wird im nächsten Kapitel besprochen. Wenngleich die (patho-)physiologische Funktion des  $IP_3$ -Signalwegs noch nicht abschließend geklärt wurde, ist seine Relevanz u.a. für kardiale Hypertrophie (Harzheim et al., 2010, Nakayama et al., 2010), hypertrophe Gentranskription (Wu et al., 2006) und Rhythmusstörungen (Proven, 2006, Bootman et al., 2007) mehrfach belegt.

## **1.6 Nukleärer Calciumtransient**

Der Zellkern ist von einer Kernhülle umgeben, die ein spezialisierter Abschnitt des SR ist und mit diesem ein zusammenhängendes Netzwerk bildet (Wu and Bers, 2006). Wie das SR stellt auch die Kernhülle einen  $Ca^{2+}$ -Speicher dar (Wu et al., 2006). Die Kernhülle hat großlumige Poren, sodass Zytosol und Nukleoplasma verbunden sind und freie Diffusion von Molekülen (mit Durchmesser  $<5$  nm), also auch von Ionen wie  $Ca^{2+}$ ,



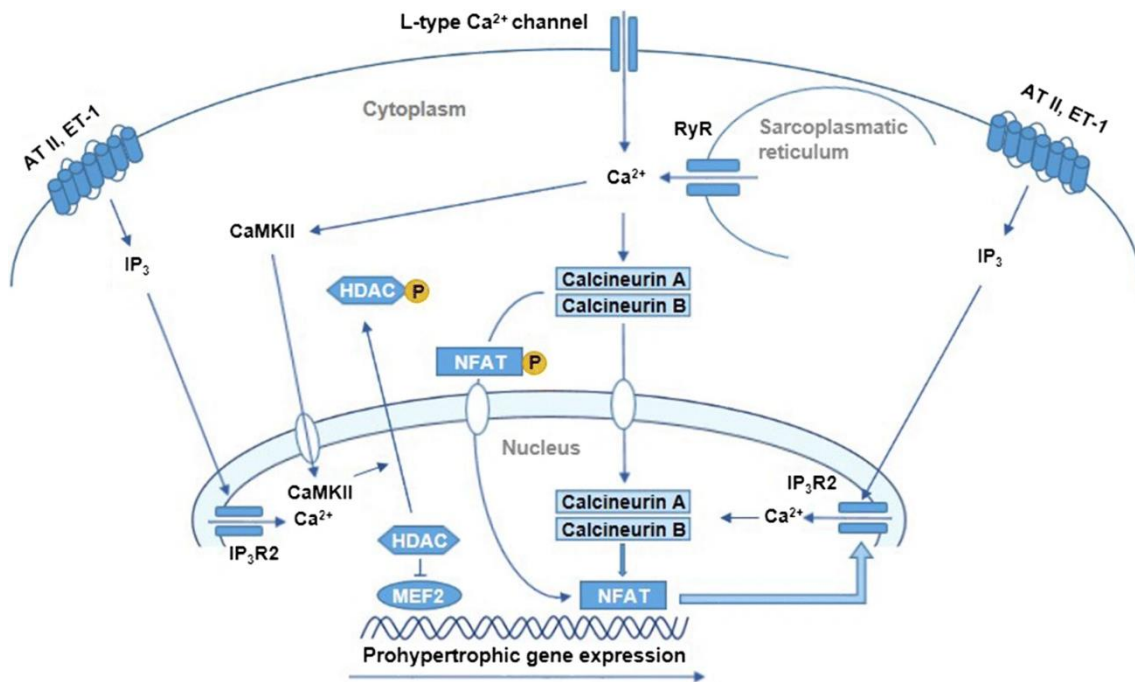
möglich ist (Keminer and Peters, 1999). Analog zu jedem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Zytosol gibt es auch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern, der maßgeblich durch passive Diffusion von  $\text{Ca}^{2+}$  vom Zytosol in den Kern entsteht. Das zeigen Experimente, die den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten über Steigerung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  oder durch Stimulation mit Iso, einem Agonisten des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta$ -AR) erhöhen. Der Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führt wiederum im gleichen Maße zu einer Erhöhung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. (Kockskamper et al., 2008, Kiess and Kockskämper, 2019). Kiess et al. beschreiben dabei eine lineare Abhängigkeit der Amplitude des nukleären vom zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten für eine breite Spanne von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Kiess and Kockskämper, 2019). Der nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient zeigt im Vergleich zum zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient u.a. aufgrund der Verzögerung durch Diffusion, eine langsamere Kinetik mit längerem Anstieg und Abfall sowie einen geringeren systolischen Spitzenwert (Kockskamper et al., 2008, Soeller et al., 2003). Wenn Kardiomyozyten experimentell mit höheren elektrischen Frequenzen stimuliert werden, kommt es aufgrund dieser Kinetik zu einer Akkumulierung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Kern und damit zu einem erhöhten diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  (Ljubojević et al., 2011).

Der nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient wird nicht nur passiv, sondern auch aktiv durch direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Kernhülle verändert und durch differenzierte Mechanismen moduliert, welche verschiedene Signalwege integrieren (Dewenter et al., 2017). Die Kernhülle enthält Rezeptoren, Kanäle und Transporter, die den lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt beeinflussen, z.B. SERCA und RyR. Außerdem befinden sich  $\text{IP}_3\text{R}$  sowohl auf der zytosolischen als auch der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran (Bare et al., 2005, Zima et al., 2007). Zima et al. zeigen an permeabilisierten atrialen Myozyten von Katzen und isolierten Kernen von Ratten-Kardiomyozyten, dass  $\text{IP}_3$  eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Kernhülle ins Nukleoplasma verursacht (Zima et al., 2007). In atrialen Kaninchen-Kardiomyozyten führt ET-1 über die  $\text{IP}_3$ -Signalkaskade zu einem Anstieg sowohl des zytosolischen als auch des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Dabei fiel der Anstieg des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten überproportional stärker aus. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die bei Aktivierung von  $\text{IP}_3\text{R}$  einen überproportionalen Anstieg des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$  zeigten (Olivares-Florez et al., 2018, Zima et al., 2007, Ljubojević et al., 2011). Wird bei Kockskämper et al. im gleichen Versuchsaufbau mit atrialen Kaninchen-Kardiomyozyten eine niedrigere ET-1-Konzentration verwendet, kam es nur im Kern zum Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, nicht aber im Zytosol (Kockskamper et al., 2008). Die Autoren folgern, dass unabhängig von den zyklischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten des ECC, das  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  durch ET-1

reguliert werden kann. Solche Beobachtungen wurden schon früher an nicht-erregbaren Zellen u.a. durch Lipp et al. gemacht, bei deren Experimenten kleine perinukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -puffs) nur das nukleäre, nicht aber das zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$  erhöhten (Lipp et al., 1997). Welchen Einfluss ein vom ECC differenziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal im Kern insbesondere auf die Gentranskription haben kann, soll im Folgenden besprochen werden.

## **1.7 Einfluss von Calcium auf Genexpression in Kardiomyozyten**

Verschiedene Studien zeigen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation der Genexpression in Kardiomyozyten durch Modulation von Transkriptionsfaktoren und betonen deren Bedeutung für pathologische Veränderungen bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Wilkins et al., 2004, Wu et al., 2006, Dewenter et al., 2017). Es ist allerdings noch weitgehend ungeklärt, welche Mechanismen eine Differenzierung zwischen den zyklischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die eine Kontraktion ermöglichen und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen, die die Genexpression beeinflussen, ermöglichen. Dewenter et al. diskutieren, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege entweder durch die Modifizierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (z.B. Dauer, Amplitude) oder räumlich und zeitlich limitierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Mikrodomänen) beeinflusst werden könnten (Dewenter et al., 2017). Die genauen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Doch bisherige Studien schlagen verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege vor, die sich stellenweise überschneiden und beeinflussen (schematisch dargestellt in Abb. 2 nach (Olivares-Florez et al., 2018)). Zentrale Vermittler sind die Transkriptionsfaktoren NFAT (nuclear factor of activated T-cells) und HDAC (Histondeacetylase), deren Aktivität mittels Phosphorylierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme moduliert wird. Zu diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzymen zählen z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) und Calcineurin (Dewenter et al., 2017). Wu et al. zeigen in Experimenten mit Ventrikeldomyozyten von Kaninchen und Mäusen, wie ET-1-Stimulation zu lokaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch  $\text{IP}_3\text{R}$  aus der Kernhülle führt und es zur Phosphorylierung der CaMKII und HDAC5 kommt. Der Transkriptionsfaktor HDAC5 wird in der Folge aus dem Kern exportiert, sodass sich dessen hemmende Wirkung auf (prohypertrophe) Gene aufhebt (sog. Derepression der Genexpression) (Wu et al., 2006). In Einklang damit zeigen Bare et al. die Kollokalisierung von CaMKII und  $\text{IP}_3\text{R}$  in der Kernhülle von Kardiomyozyten (Bare et al., 2005).



**Abbildung 4: Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf die hypertrophe Genexpression**

Schematische Darstellung eines Kardiomyozyten mit  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signalwegen mit Einfluss auf die hypertrophe Genexpression. Zytoplasmatisches  $Ca^{2+}$  bewirkt eine Translokation von Calcineurin, NFAT und CaMKII in den Kern. Die Bindung von Endothelin-1 oder Angiotensin II an ihre Rezeptoren führt zur  $IP_3$ -vermittelten Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus  $IP_3R2$  in der Kernhülle. In der Folge wird einerseits über Interaktion mit Calcineurin die NFAT-Transkriptionsaktivität erhöht. Andererseits phosphoryliert CaMKII HDAC, was dessen Export aus dem Kern bewirkt und seine Hemmung des Transkriptionsfaktors MEF2 aufhebt. Beide  $Ca^{2+}$ -abhängigen Mechanismen aktivieren prohypertrophe Genexpression.

Abkürzungen: CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; HDAC, Histondeacetylase;  $IP_3R2$ , Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor 2; MEF2, myocyte elongation factor; NFAT, nuclear factor of activated T cells; RyR, Ryanodin Rezeptor.

Abbildung mit Genehmigung von der Springer Nature Customer Service Centre GmbH aus (Olivares-Florez et al., 2018).

Des Weiteren ist der  $Ca^{2+}$ -sensitive Calcineurin-NFAT-GATA4-Signalweg bekannt, der eine wichtige Rolle in der kardialen Entwicklung und bei hypertropher Antwort in adulten Kardiomyozyten spielt (Molkentin et al., 1998). Nach der Dephosphorylierung von NFAT durch Calcineurin im Zytoplast gelangt NFAT in den Kern, wo es u.a. im Zusammenspiel mit GATA4 als Transkriptionsfaktor prohypertropher Genprogramme aktiv ist. Außerdem fungiert Calcineurin als  $Ca^{2+}$ -Sensor im Kern, wo er durch direkte Interaktion die NFAT-Transkriptionsaktivität steigert, wie Olivares-Florez et al. an murinen Kardiomyozyten zeigen konnten (Olivares-Florez et al., 2018).

## 1.8 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz

Pathophysiologisch sind bei der Herzinsuffizienz Kompensationsmechanismen bedeutend, die in einem frühen Krankheitsstadium die Herzleistung und die Durchblutung des Organismus aufrechterhalten, jedoch langfristig zu maladaptiven und pathologischen Prozessen führen (1.2 Definition, Ursachen und Pathophysiologie). Im

Folgenden sollen einige dieser strukturellen und funktionellen Veränderungen auf Ebene der Kardiomyozyten betrachtet werden.

Der in Kardiomyozyten zentrale und komplexe Vorgang der ECC ist bei Herzinsuffizienz beeinträchtigt, was sich in verminderter Kontraktilität und Relaxation zeigt. Dazu tragen struktureller Veränderungen bei, z.B. führen der Verlust von T-Tubuli und die Störung der Dyaden-Architektur zu inhomogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Lyon et al., 2009). Auf molekularer Ebene sind Veränderungen des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten messbar (Bers, 2006, Bertero and Maack, 2018a). Dabei ist der systolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Spitzenwert verringert und das diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Level erhöht (Ljubojevic et al., 2014). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient weist eine verminderte Amplitude und einen jeweils verlängerten Anstieg und Abfall auf (Lehnart et al., 2009). Diese Veränderungen sind insbesondere auf einen erniedrigten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zurückzuführen. Dieser ist bedingt erstens durch eine geringere SERCA-Aktivität und somit weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR und zweitens durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust des SR durch RyR2 mit erhöhter Offenwahrscheinlichkeit ( $\text{Ca}^{2+}$ -Leck) (Bers, 2006).

Ein weiterer Pathomechanismus betrifft den eng mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt verbundenen  $\text{Na}^+$ -Haushalt. Die zytosolische  $[\text{Na}^+]$  ist bei Herzinsuffizienz in Kaninchenmodell (Despa et al., 2002) und beim Menschen (Pieske et al., 2002) erhöht. Das führt einerseits zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über den sarkolemmal lokalisierten NCX in der Diastole und trägt damit zu einer gestörten Relaxation bei. Andererseits kommt es während eines Aktionspotentials zur Umkehr des Ionenflusses über den NCX. In diesem sog. reverse mode wird  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch mit  $\text{Na}^+$  in die Zelle aufgenommen. Das könnte die geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR in Teilen kompensieren und so zur Inotropie beitragen (Weisser-Thomas, 2003). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den NCX führt allerdings nicht zu einer vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium (Kohlhaas et al., 2010). Im Gegenteil, in Mitochondrien ist bei erhöhtem zytosolischen  $[\text{Na}^+]$  bzw. im Meerschweinchen-Herzinsuffizienz-Modell der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus dem Mitochondrium über den NCLX erhöht (Maack et al., 2006, Kohlhaas et al., 2010). Außerdem ist die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in humanen kardialen Mitochondrien von herzinsuffizienten Patienten vermindert, wofür u.a. eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit des MCU und einer Störung der Mikrodomänen zwischen SR und Mitochondrien mitverantwortlich sind (Michels et al., 2009, Bertero and Maack, 2018a). Beides – geringere Aufnahme und gesteigerter Efflux – senkt das  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  und führt zu verminderter Aktivierung wichtiger  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Vorgänge wie dem

Krebszyklus, der Energieproduktion und der Aufrechterhaltung der antioxidativen Kapazität (Maack et al., 2006, Kohlhaas et al., 2010). In der Folge lassen sich auf zellulärer Ebene ein energetisches Defizit und oxidativer Stress beobachten, welche als zentrale Veränderungen bei Herzinsuffizienz erachtet werden (Bertero and Maack, 2018a).

Im Rahmen der erwähnten neuroendokrinen Aktivierung lassen sich bei herzinsuffizienten Menschen erhöhte Spiegel der beiden Hormone ET-1 und AngII beobachten (Pieske et al., 1999, Ohmae, 2011). Beide Hormone bewirken eine Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Signalkaskade, was in erhöhten intrazellulären IP<sub>3</sub>-Konzentrationen resultiert (Kockskämper et al., 2008). Zusätzlich wird bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz eine gesteigerte Expression von IP<sub>3</sub>Rs beobachtet (Harzheim et al., 2010, Ljubojevic et al., 2014). In Zusammenhang mit erhöhten ET-1-Spiegeln wird die Aktivierung von hypertrophen Genexpressionsprogrammen durch eine gesteigerte CaMKII-Aktivität nachgewiesen (Zhu et al., 2000). Auch im Mausmodell mit kardialer Druckbelastung wird eine erhöhte CaMKII-Aktivität gemessen (Zhang et al., 2003). Ljubojevic et al. beobachten in frühen Krankheitsstadien der Herzinsuffizienz pathologisch veränderte nukleäre Ca<sup>2+</sup>-Transienten und aktivierte prohypertrophe Signalkaskaden (u.a. erhöhte CaMKII-Aktivität) bei noch normalen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten und weisen damit die Möglichkeit einer frühen maladaptiven Genexpression auf (Ljubojevic et al., 2014). Zu diesen Ergebnissen passt, dass bei einem Herzinsuffizienzmodell an Ratten die Veränderungen der nukleären Transportmechanismen der Verschlechterung der kardialen Funktion vorausgingen (Chahine et al., 2015). Zusammenfassend ist festzustellen, dass Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transkription-Signalwege bei Herzinsuffizienz gesteigert aktiv sind und zum kardialen Remodeling beitragen (Dewenter et al., 2017).

## **1.9 Zielsetzung**

In pathologischen kardialen Situationen wie bei der Herzinsuffizienz gehören Störungen des Ca<sup>2+</sup>-Haushalts zu den zentralen pathophysiologischen Merkmalen. Ca<sup>2+</sup> ist als Signalmolekül maßgeblich am kardialen Remodeling beteiligt, z.B. bei der Aktivierung hypertropher Gentranskription (Tanai and Frantz, 2015). Bei der Herzinsuffizienz sind strukturelle und funktionelle Veränderungen des am Ca<sup>2+</sup>-Haushalt beteiligten zellulären Gefüges zu beobachten (Rosca and Hoppel, 2013, Bertero and Maack, 2018b). So werden Störungen der Kommunikation zwischen Mitochondrien und SR und der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme beschrieben, welche maßgeblich zu einem

Energiedefizit in der Zelle beitragen (Dorn and Maack, 2013). Weiterhin finden sich bei Herzinsuffizienz beim Menschen und auch im Tiermodell erhöhte Plasma-Konzentrationen der Hormone ET-1 und AngII, die über Rezeptorbindung die intrazelluläre IP<sub>3</sub>-Produktion steigern (Kockskämper et al., 2008). In Experimenten von Seidlmayer et al. wurden murine Kardiomyozyten mit ET-1 stimuliert, woraufhin Ca<sup>2+</sup> IP<sub>3</sub>-vermittelt aus dem SR freigesetzt und dann über den mRyR1 ins Mitochondrium aufgenommen wurde, wo es zu einer Steigerung des ATP-Gehalts führte (Seidlmayer et al., 2016). Voraussetzung für diesen Signalweg ist eine intakte Kopplung zwischen Mitochondrien und SR (Seidlmayer et al., 2019).

Wenn nun – wie bei der Herzinsuffizienz – die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme gestört ist und vermehrt ET1 und AngII zirkulieren, stellt sich die Frage, wie diese Faktoren den zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten und damit über die passive Komponente den nukleären Ca<sup>2+</sup>-Transienten beeinflussen, der wiederum eine wichtige Rolle in der Aktivierung hypertropher Gentranskription spielt. Zusätzlich ist es von Interesse, ob dieser vermutete Einfluss der gestörten mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme auf den nukleären Ca<sup>2+</sup>-Transienten frequenzabhängig ist.

In dieser Arbeit wird an intakten ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Mäusen untersucht, wie sich der zytosolische und nukleäre Ca<sup>2+</sup>-Transient verändern, wenn während der Stimulation mit AngII, welches AT1-R-vermittelt die IP<sub>3</sub>-Konzentration steigert, die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme entweder durch Blockade des mRyR1 oder des MCU gestört ist. Um die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme über den mRyR1 zu blockieren, wird zusätzlich zu AngII oder Iso der mRyR1-Blocker Dantrolen zugegeben (AngII+Dantrolen bzw. Iso+Dantrolen). Das für die Blockade des MCU etablierte Ru360 zeigte in Vorarbeiten einen relevanten Einfluss auf die Kinetik des nukleären Ca<sup>2+</sup>-Transienten, weshalb für diese Arbeit zur Blockade des MCU Mäuse mit einem induzierbaren kardiospezifischen MCU KO verwendet wurden (2.3.1 Versuchstiere) (Leucht, 2019). Zum Vergleich wurden Zellen mit dem β-AR-Agonisten Iso stimuliert, um den Effekt des β-adrenerg vermittelten, IP<sub>3</sub>-unabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs im Zytosol auf den Ca<sup>2+</sup>-Transienten im Kern zu untersuchen. Weiterhin wurden die Versuche bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuchsvotum

Die Genehmigung des Versuchsvorhabens nach dem Tierschutzgesetz wurde von der Regierung von Unterfranken erteilt (AZ-55.2-2532-2-382).

### 2.2 Materialien

#### 2.2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Absaugpumpe	Hartenstein, Würzburg, DE	Flask Trap Aspirator
Binokularmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE	Wild M3B
Elektrischer Stimulator	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE	Electronic Stimulator CS
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, DE	ThermostatC
Homogenisator	Qiagen, Hilden, DE	Tissue Ruptor
Inkubator (37°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Hera therm
Konfokalmikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE	LSM 780
Langendorff-Perfusionssystem	Universität Würzburg, DE	
Lichtquelle	Schott AG, Mainz, DE	KL 1500 electronic
Perfusor	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE	Perfusor fm, VC-&
pH-Meter	Hanna instruments, Woonsocket, USA	HI 991000
RT-PCR Detection System (iCycler)	BioRad Laboratories, Hercules, USA	CFX96 Touch
Schüttler	Labnet, Edison, USA	Rocker 25
Thermocycler	Biometra, Göttingen, DE	T300
Thermomixer	Analytik Jena, Jena DE	UVP HB500 Minidizer
Transfergerät	BioRad Laboratories, Hercules, USA	TransBlot Turbo
UV-Transluminator	Alpha Innotec, Kasendorf, DE	Red
UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	NanoDrop 2000
Waage	Kern&Sohn, Balingen, DE	ABT1204M, EW22002NM
Wasserbad	Lauda Scientific, Lauda-Königshofen, DE	Alpha
Western Blot Scanner	AlphaMetrix Biotech, Rödermark, DE	Syngene PXi
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE	Mikro 220 R

## 2.2.2 Chemikalien und Substanzen

Tabella 2: Chemikalien und Substanzen

Substanz	Firma	Bestellnummer
Agarose	Genaxxon, Ulm, DE, Ulm, DE	M3044
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A9525
Butandionmonoxim(BDM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B0753
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	21115
CoCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, DE	70951
Dantrolen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D9175
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	90001043815-1G
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	A9942
EDTA (0,5M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E6758
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E4378
Essigsäure	J.T. Baker, Phillipsburg, USA	6052
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	46067
FCS	Biochrom, Berlin, DE	S0615
Fluo4 AM	Life Technologies, Darmstadt, DE	F14201
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G7528
Glutamat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G8415
Glycin	AppliChem, Darmstadt, DE	131340
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H3375
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I5627
KCl	Merck, Darmstadt, DE	104.936
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, DE	104.873
KOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P1767
Laminin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L2020
Liberase TH	F.Hoffmann-La Roche, Basel, CH	5401151001
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, DE	A0830
Maleat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M0375
MgCl*6H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, DE	105.833
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M1028
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, DE	105.886
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, DE	106.346
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8010
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	31434
NaFl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S1504
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, DE	106.580
NaOH	Merck, Darmstadt, DE	109137
Na-Ortovanadate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S6508



Substanz	Firma	Bestellnummer
Pluronic	Life Technologies, Darmstadt, DE	P3000MP
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P7626
Proteinaseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	9000101187358001
Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P2256
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	11667289001
Tamoxifen	ssniff Spezialdiäten, Soest, DE	A115T70212
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T0625
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6066
Trypsin	Gibco by Life Technologies, Darmstadt, DE	15090
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9127
X-Rhod-1, AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	X14210

*Tabelle 3: Kommerzielle Kits und Lösungen*

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Little Chalfont, UK	RPN2108
Dnase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	AMPD1
dNTP SET	Promega, Walldorf, DE	U1330
GeneRuler 50 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	SM0373
iScript cDNA synthesis kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA	1708890
PCR-Puffer E	Genaxxon, Ulm, DE	M3456
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen, Hilden, DE	69504/69506
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE	74104
SDS Loading-Puffer	BioRad Laboratories, Hercules, USA	
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon, Ulm, DE	M3001

*Tabelle 4: PCR Primer*

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Forward Primer PCR Cre – Cre 1	5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA CC-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
Reverse Primer PCR Cre – Cre 2	5'- TAG TTA CCC CCA GGC TAA GT-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
Forward Primer PCR MCU – MCU1	5'- GAA GGC CTC CTG TTA TGGA AT-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
Reverse Primer PCR MCU – MCU2	5'- CCA GCT TGG TGA AGC CTG AT-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg

Tabelle 5: RT-PCR

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA	4309155
TaqMan® Gene Expression Assay MCU	Applied Biosystems, Foster City, USA	4331182, Mm01168773
TaqMan® Gene Expression Assay GAPDH	Applied Biosystems, Foster City, USA	4331182, Mm99999915

Tabelle 6: Western Blot Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Primär-Antikörper: GAPDH Rabbit mAb (HRP Conjugated)	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	3683S	1:5000
Primär-Antikörper: Anti-MCU pAb produced rabbit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	HPO016480	1:1000
Sekundär-Antikörper: Rabbit IgG HRP Linked F(ab') <sub>2</sub>	GE Healthcare, Little Chalfont, UK	NA93401ML	1:5000

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Seidenfaden	Voemel
Isofluran CP	cp-pharma, Burgdorf, DE
Heparin	ratiopharm, Ulm, DE
Zellkulturschale Cellview	Greiner Bio-one, Frickenhausen, DE

Allgemeine Verbrauchsmaterialien (z.B. Pipettenspitzen, Nitrilhandschuhe, Falcons, lichtdichte Eppendorf Caps) wurden über das Zentrallager der Universitätsklinik Würzburg, die Firma A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, DE) bzw. die Firma Weckert Labortechnik (Kitzingen, DE) bezogen.

## 2.2.4 Puffer und Lösungen

### 2.2.4.1 Kardiomyozytenisolation

#### Stocklösung

Tabelle 8: Zusammensetzung der Stocklösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge [g]	Endkonzentration [mmol/l]
NaCl	58,4	7,884	135
KCl	74,6	0,35062	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	0,08166	0,6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	138	0,0828	0,6
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	246,5	0,2958	1,2
HEPES	238,31	4,07662	20
Taurin	125,1	3,753	30

Die angegebenen Substanzen werden in destilliertem Wasser (Aqua. dest.) ad 1000 ml aufgelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### Perfusionslösung

Tabelle 9: Zusammensetzung der Perfusionslösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge	Endkonzentration [mmol/l]
Stocklösung		0,333 ml	
D-Glucose	101,1	0,6 g	5,9
BDM	180,16	0,36 g	1,9

Die Perfusionslösung ist Basis für die im Folgenden beschriebene Verdauung und die Stopplösungen 1 und 2.

#### Verdauung

Tabelle 10: Zusammensetzung der Verdauung

Substanz	Verwendete Menge [ml]	Endkonzentration
Perfusionslösung	60 ml	
Liberase TH	0,15	0,25 µM/ml
Trypsin 2,5%	0,3	0,12 µM/ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	0,067	[Ca <sup>2+</sup> ] 0,01 mmol/l

#### Stopplösung 1 und 2

Tabelle 11: Zusammensetzung der Stopplösungen 1 und 2

	Stopplösung 1	Stopplösung 2
Substanz	Verwendete Menge	Verwendete Menge
Perfusionslösung	2,25 ml	19 ml
FCS	250 µl	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	3,125 µl	25 µl
Endkonzentr. Ca <sup>2+</sup>	0,0125 mM	0,0125 mM

## Ca<sup>2+</sup>-Lösungen

Die Stopplösung 2 ist Basis für die Ca<sup>2+</sup>-Lösungen 1-3.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Calcium-Lösungen 1-3

	Ca <sup>2+</sup> -Lösung 1	Ca <sup>2+</sup> -Lösung 2	Ca <sup>2+</sup> -Lösung 3
Substanz	Verwendete Menge	Verwendete Menge	Verwendete Menge
Stopplösung II	4 ml	4 ml	4 ml
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	5 µl	10 µl	20 µl
Endkonzentration [Ca <sup>2+</sup> ]	0,125 mM	0,25 mM	0,5 mM

## Tyrode-Lösung

Tabelle 13: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge	Endkonzentration [mmol/l]
NaCl	238,3	7,89 g	135
KCl	74,6	0,298 g	4
Glucose	180,16	1,8 g	10
HEPES	283,3	2,38 g	10
MgCl <sub>2</sub>	95,21	1 ml	1
CaCl <sub>2</sub>	110,98	1 ml	1

Die angegebenen Substanzen werden in destilliertem Wasser (Aqua. dest.) ad 1000 ml aufgelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit NaOH auf 7,3 eingestellt.

### 2.2.4.2 Konfokalmikroskopie

Laminin dient als Beschichtung der Objektträger um die Kardiomyozyten zu fixieren. Es besteht aus 50 µl Aliquot und 950 µl Tyrode.

Isoproterenol (Iso) (247,72 g/mol): 124 mg in 10 ml destilliertem Wasser (Aqua. dest.) lösen, davon 1 µl in 100 ml Tyrode geben. Die Endkonzentration Isoproterenol beträgt 500 nmol/l.

Angiotensin II (1046,18 g/mol): 100 µl Angiotensin II (2 mmol/l) werden in 100 ml Tyrode gegeben, sodass eine Endkonzentration von 2 µmol/l vorliegt.

Dantrolen (336,23 g/mol): Es werden 10,5 mg Dantrolen in 62,5 µl DMSO gelöst und anschließend mit Tyrode verdünnt, sodass die Endkonzentration Dantrolen 1 µmol/l beträgt.

### Farbstoffe

Fluo4 AM (Acetoxymethyl): Die Stocklösung setzt sich aus 50 µl Fluo4 AM (1 mM), 45,6 µl Pluoronic und 400 µl Tyrode zusammen. Zur Beladung der Zellen wird 200 µl Stocklösung mit 800 µl Tyrode gemischt. Die Endkonzentration Fluo4 beträgt 20 µmol/l.

X-Rhod-1: Die Stocklösung setzt sich aus 50 µl X-Rhod-1 (1 mM/50 µg), 50 µl Pluronic und 357,1 µl Tyrode zusammen. Zur Beladung der Zellen wird 50 µl Stocklösung mit 950 µl Tyrode gemischt. Die Endkonzentration X-Rhod-1 beträgt 5 µmol/l.

#### 2.2.4.3 PCR

*Tabelle 14: Zusammensetzung der 50xTAE-Lösung*

Substanz	Verwendete Menge Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml

Durch 50-fache Verdünnung der 50xTAE-Lösung wird die 1xTAE-Lösung abgeleitet. (20ml 50xTAE ad 1000ml H<sub>2</sub>O).

#### 2.2.4.4 Proteinanalytik

*Tabelle 15: MHC-Puffer*

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge [g] ad 200 ml H <sub>2</sub> O	Endkonzentration [mmol/l]
NaCl	238,3	3,5	14,68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	137,99	2,76	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	177,99	1,42	7,9
MgCl*6H <sub>2</sub> O	203,3	0,04	0,2
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	265,90	0,54	2
EDTA	292,24	0,74	2,5
NaFl	41,99	1,6796	40
Na-Ortovanadate	183,9	0,3778	2

*Tabelle 16: Trenngel (7,5%)*

Substanz	Verwendete Menge [ml]
30% Acrylamide 0,8% Bisacrylamid	2,5
TrisBase-Lösung pH 8,8, 1,5 M/0,4% SDS	2,5
H <sub>2</sub> O	5
APS 10%	0,0333
Temed	0,00668

Tabelle 17: Sammelgel (4%)

Substanz	Verwendete Menge [ $\mu$ l]
30% Acrylamide 0,8% Bisacrylamid	815
TrisBase-Lösung pH 6,8, 0.5 M/0,4% SDS	1564
H <sub>2</sub> O	3818
APS 10%	31,3
Temed	6,25

Tabelle 18: Sample-Puffer

Substanz	Verwendete Menge [ $\mu$ l]
DTT	20
3xSDS Loading-Puffer (Biorad)	180

Tabelle 19: 5xElektrophorese-Puffer

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge [g] ad 2000 ml H <sub>2</sub> O	Endkonzentration [mmol/l]
Tris	121,14	30,3	124
Glycin	75,07	144	960
SDS	288,38	10	1,73

Tabelle 20: 5xPBS-Lösung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Verwendete Menge [g] ad 1000 ml H <sub>2</sub> O	Endkonzentration [mmol/l]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141,96	41,17	290
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	137,99	11,73	85
NaCl	58,44	20	342

Zur Herstellung der PBS-Tween-Lösung wird 200 ml 5xPBS-Lösung (Tab. 20) mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und 500  $\mu$ l Tween-20 dazugegeben.

Der Block-Puffer wird aus 100 ml PBS-Tween-Lösung und 5 g Milchpulver hergestellt.

## 2.3 Isolation adulter Kardiomyozyten

### 2.3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um B6;129S-Mcu<sup>tm1.1Jmol</sup>/J Mäuse aus der Arbeitsgruppe von Jeff Molkenin (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati) (Kwong et al., 2015). Die Tiere haben einen durch das Cre/loxP-System hervorgerufenen konditionellen herzspezifischen KO des MCUs. Die DNA-Abschnitte, welche die Zielgene (hier die Gene für den MCU) enthalten, werden

durch loxP markiert ( $Mcu^{fl/fl}$ ). Dieser markierte Abschnitt kann durch Cre, eine durch Tamoxifen aktivierbare Rekombinase, ausgeschnitten werden. Dazu wurden Mäuse genutzt, bei denen die Cre-Expression unter Kontrolle des für Kardiomyozyten spezifischen Promoters für  $\alpha$ -Myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC) liegt und somit nur in Kardiomyozyten exprimiert wird (Mäuse mit MCM-Eigenschaft). Die Mäuse mit MCM-Eigenschaft wurden dann mit  $Mcu^{fl/fl}$  Mäusen gekreuzt, sodass bei doppelt transgenen Nachkommen ein Tamoxifen-induzierbarer herzspezifischer KO des MCUs (MCU KO) vorliegt. Der jeweilige Genotyp wurde durch PCR bestimmt (2.3.2.1 Genotypisierung mittels PCR). Die Wildtypen der beschriebenen Mäuse (WT), also Tiere ohne den induzierbaren KO, waren die Kontrollgruppe. Die doppelt transgenen Mäuse wurden mit 20 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht/Tag über einen Zeitraum von 7 Tagen gefüttert und dann als Versuchstiere mit MCU KO verwendet. Zur Überprüfung der Futteraufnahme wird das Gewicht des Futters und der Mäuse regelmäßig gemessen. Die Experimente wurden an weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 8-12 Wochen durchgeführt.

## 2.3.2 Methoden zur Charakterisierung der Versuchstiere

### 2.3.2.1 Genotypisierung mittels PCR

Bei den oben beschriebenen Versuchstieren (2.3.1 Versuchstiere) kann es unterschiedliche Genotypen geben, weshalb jedes Tier hinsichtlich seiner genetischen Eigenschaften für  $Mcu^{fl/fl}$  und Cre (MCM) typisiert wurde. Von den Versuchstieren wurden Gewebeproben (Ohrstanzen) entnommen, die DNA aufgereinigt und der Genotyp mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese bestimmt. Die Isolierung der DNA aus den Gewebeproben erfolgte mit einem kommerziellen Kit (DNeasy Blood&Tissue Kit, Qiagen) nach enthaltendem Protokoll.

Der Reaktionsansatz für die PCR ist für die Eigenschaften MCU bzw. Cre wie folgt:

Tabelle 21: Reaktionsansatz PCR

Substanz	Menge (MCU) [ $\mu$ l]	Menge (Cre) [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O (Aqua. dest.)	15,8	13,3
PCR-Puffer E	2	2,5
MgCl	2	2,5
dNTP Stammlsg. (10 mM)	1	1
Forward Primer (1:10)	1	0,75
Reverse Primer (1:10)	1	0,75
Taq DNA-Polymerase	0,2	0,2
isolierte DANN	2	2

Die Reaktionsansätze wurden für die Eigenschaften MCU bzw. Cre mit den in Tabelle 12 angegebenen Substanzen hergestellt und durchliefen im Thermocycler folgende Schritte:

Tabelle 22: PCR – Programm Thermocycler

Schritt	Zeit (MCU)	Zeit (Cre)
Initiale Denaturierung bei 94°C	3 min	5 min
Denaturierung bei 94°C	40 Zyklen mit je 30 s	30 Zyklen mit je 30 s
Primerhybridisierung bei 55°C	40 Zyklen mit je 35 s	30 Zyklen mit je 35 s
Elongation bei 72°C	40 Zyklen mit je 30 s	30 Zyklen mit je 1 min
Finale Elongation bei 72°C	5 min	5 min

Die Analyse der in der PCR vervielfältigten Genabschnitte erfolgte mittels Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese. Dafür wurde für die MCU-PCR ein 3% Agarosegel bzw. für die Cre-PCR ein 1,5% Agarosegel hergestellt. 3 g bzw. 1,5 g Agarose wurden in 100 ml 1xTAE (Zusammensetzung 2.2.4.3) gelöst, in der Mikrowelle erhitzt, durch Rühren auf 50°C abgekühlt und nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid in eine Gelkammer mit Kämmen gegossen. Nach Abkühlen und Entfernen der Kämmen wurde das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1xTAE überschichtet. In die Ladetaschen wurden nun 20 µl des PCR-Produkts pipettiert. Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und eine DNA-Leiter in Ladetaschen gefüllt. Nach dem Befüllen wurde das Gel für 1 h an eine Spannung mit 100 V angeschlossen. Im Anschluss konnte man unter UV-Licht die Banden ablesen, welche aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid mit den DNA-Fragmenten entstanden, und somit mithilfe der Bandenmuster den Genotyp der Versuchstiere feststellen (261 bp (WT)/354 bp (MCU) bzw. 700 bp (Cre)).

### 2.3.2.2 Real-time-PCR

#### Prinzip

Die real-time-PCR (RT-PCR) ist eine Methode zur relativen Quantifizierung von mRNA (messenger RNA). Das Grundprinzip der RT-PCR entspricht dem der PCR (2.3.2.1 Genotypisierung mittels PCR), wobei mRNA zunächst aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben wird. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzmessungen, welche während des PCR-Zyklus in Echtzeit durchgeführt werden. Dabei kann von der Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals auf die Menge der cDNA, die aus einer spezifischen mRNA synthetisiert wurde, geschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um die Expression der MCU-mRNA im Vergleich zwischen den Kardiomyozyten von MCU KO-Mäusen und MCU-Wildtyp Mäusen (WT) zu untersuchen. Die RT-PCR wurde an jeweils drei MCU KO-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurden die Ergebnisse für MCU auf ein Referenzgen normalisiert. Dafür wurde GAPDH



(Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase), ein ubiquitär exprimiertes Protein mit stabiler Expression, verwendet. Die Expression der MCU-mRNA im Vergleich zur GAPDH-mRNA wurde mithilfe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode aus den Messdaten berechnet und die Ergebnisse werden als x-fache Veränderung (fold change expression) der MCU KO-Mäuse im Vergleich zu den WT angegeben.

### **Ablauf**

Die Isolation der RNA aus dem Herzgewebe wurde mithilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy Mini Kit, Qiagen) nach enthaltenem Protokoll durchgeführt und im Anschluss die RNA-Konzentration der Probe bestimmt. Die in der Probe noch enthaltene DNA wurde mittels Kit (DNase1, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdaut. Im Anschluss wurde cDNA aus der RNA mit dem kommerziellen Kit iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) hergestellt. Vor der eigentlichen PCR erfolgte eine Kalibrierung der Sonden (jeweils für MCU und GAPDH) mithilfe einer Verdünnungsreihe.

Die synthetisierte cDNA wurde in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

12,5  $\mu\text{l}$  TaqMan® Gene Expression Master Mix

1,25  $\mu\text{l}$  TaqMan® Gene Expression Assay MCU bzw. GAPDH

6,25  $\mu\text{l}$  RNase freies  $\text{H}_2\text{O}$

5  $\mu\text{l}$  cDNA

Im Anschluss durchlief der Reaktionsansatz folgende Reaktionsschritte im iCycler, währenddessen erfolgten die Fluoreszenzmessungen:

2 min bei  $50^\circ\text{C}$

10 min bei  $95^\circ\text{C}$

40x15 s bei  $95^\circ\text{C}$

40x1 min bei  $60^\circ\text{C}$

### **2.3.2.3 Proteinanalytik**

Der MCU KO der transgenen Mäuse (2.3.1 Versuchstiere) wird mittels proteinanalytischer Methoden (SDS-Page, Western Blot) nachgewiesen, quantifiziert und mit den WT-Mäusen verglichen. Dafür wurden zunächst Proteine aus dem Myokard der Tiere extrahiert, nach Größe aufgetrennt, mittels spezifischer Antikörper detektiert und im Anschluss quantifiziert.

### **Proteinextraktion aus Myokard**

Das Myokard wurde gewichtsadaptiert mit MHC-Puffer (0,06 µl/mg), 1:25 Proteinaseinhibitor und 1:1000 PMSF vermischt. Diese Mischungen wurden mithilfe eines Homogenisators (Tissue Ruptor, Qiagen) homogenisiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration jeder Probe spektrometrisch (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) bestimmt. Um Vergleichbarkeit herzustellen, wurden die Proben dann so verdünnt, dass sie gleiche Konzentrationen an Proteinen enthielten. Zur Vorbereitung der Auftrennung der Proben mittels SDS-Page wurden die Proteine denaturiert. Dafür wurde ein Gemisch aus Probe/Sample-Puffer (Zusammensetzung Tab. 18) im Verhältnis 2:1 hergestellt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

### **SDS-Page**

SDS-Page ist eine Methode, um Proteine elektrophoretisch nach ihrer Molekülmasse trennen. Dafür werden die zu untersuchenden Proben in einer Polyacrylamid-Gel-Matrix aufgetragen, an das dann elektrische Spannung angelegt wird. Die Proteine sind nach der Denaturierung mithilfe des negativ geladenem Tensid SDS (Sodiumdodecylsulfat) negativ geladen und bewegen sich auf die Anode zu, wobei sich schwerere Moleküle langsamer bewegen. Mithilfe einer standardisierten Proteinleiter kann das Gewicht der in den Proben enthaltenen Protein bestimmt werden.

Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel (Zusammensetzung Tab. 16) wurde in eine vorbereitete Glasform mit 1,0 mm Abstandshaltern gegossen, mit H<sub>2</sub>O bedeckt und für 45 min bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehen gelassen. Nach Abgießen des H<sub>2</sub>O wurde das Sammelgel (Zusammensetzung Tab. 17) auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach weitere 45 min zur Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung Tab. 19) überschichtet.

Die vorbereiteten Proben und eine größenstandardisierte Proteinleiter wurden in die Probetaschen im Gel gefüllt (je 30 µl). Anschließend wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 70 V durchgeführt und damit die in den Proben enthaltenen Proteine nach Größe aufgetrennt.

### **Western Blot**

Die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrophorese (25 V, 10 min) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Trans Blot Turbo Transfer, Biorad). Anschließend wurde die Membran in Block-Puffer (Zusammensetzung 2.2.4.4)

für mindestens 1 h inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen der Cellulosemembran gesättigt wurden. Dann erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, welcher spezifisch das zu untersuchende Protein (hier: MCU bzw. das Haushaltsprotein GAPDH) bindet. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit PBS-Tween (Zusammensetzung 2.2.4.4) dreimal 10 min lang gewaschen, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert und am Ende wiederum mit PBS-Tween gewaschen. Am Sekundärantikörper ist ein Enzym, HRP (horseradish peroxidase), gebunden. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von hinzugefügtem Luminol. Dabei wird Lumineszenz emittiert, welche detektiert werden kann. So werden die mit Antikörper markierten Proteine sichtbar gemacht (Chemolumineszenzmethode). Dafür wurde ein kommerzielles Kit (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) und der Western Blot Scanner Syngene PXi (Alpha Metrix) genutzt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software ScanPack3.0 (Biometra). Die Ergebnisse der Proteinanalyse für MCU wurden auf das ubiquitär exprimierte GAPDH normalisiert und somit eine Vergleichbarkeit und Quantifizierung der Proteinmengen ermöglicht.

### **2.3.3 Myozytenisolation**

Die im Folgenden beschriebene Isolation von Myozyten aus einem Mäuseherz verwendet eine modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage. Das Grundprinzip, welches 1895 von Langendorff beschrieben wird (Langendorff, 1895), ist die retrograde Herzperfusion über die kanülierte Aorta und die Koronargefäße bei geschlossener Aortenklappe (Dhein et al., 2005). Die Anlage verfügt über eine Aufhängevorrichtung, zwei von einer Glaskammer umgebene Schlauchsysteme und ein Wasserbad. An die zwei getrennten Schlauchsysteme der Anlage sind zwei Perfusoren mit Spritzen angeschlossen. Eine enthält die Perfusionslösung (Zusammensetzung 2.2.4.1), die andere die enzymhaltige Verdauungslösung (Zusammensetzung 2.2.4.1). Die Anlage wird mithilfe des Wasserbads und den Glaskammern, die die Schläuche umgeben, gewärmt, sodass die Perfusions- und die Verdauungslösung auf 37°C eingestellt sind. Die Schläuche münden in einen Dreiwegehahn mit Blasenfalle. Mittels einer Kanüle lässt sich das zuvor entnommene Herz daran anschließen. Die Perfusionsanlage wird vor und nach der Benutzung gründlich gereinigt und vor Gebrauch zweimal mit destilliertem Wasser und Tyrode gespült.

Dem Versuchstier wurden 125 µl Heparin (ratiopharm) i.m. gespritzt. Nach 20 min wurde es in eine Inhalationskammer gesetzt, Isofluran (cp-pharma) zugeführt und, nachdem die Reflexe erloschen waren, mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Maus wurde in Rückenlage mit Klebestreifen an den Pfoten fixiert. Mithilfe einer Pinzette und einer feinen Schere wurde das Abdomen längs inzidiert und das Xiphoid angehoben, sodass das Zwerchfell entlang des Rippenbogens präpariert und durchtrennt werden konnte. Nach kaudaler Durchtrennung der Rippen wurde das vordere Thoraxschild aufgeklappt und fixiert, sodass das vordere Mediastinum frei lag. Das noch schlagende Herz wurde vorsichtig vom umliegenden Gewebe abpräpariert und die Aorta in einem möglichst langen Verlauf dargestellt. Die großen Gefäße wurden durchtrennt, das Herz entnommen und sofort in eine Schale mit eisgekühlter Perfusionslösung gelegt. Bei Bedarf wurden Gewebereste wie Lunge, Thymus oder Fett entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Aorta unter einem Binokular-Mikroskop dargestellt, mithilfe einer Knopfkanüle (1,5x80 mm) kanüliert und mit einem vorgelegtem Seidenfaden (Vömel) fixiert. An die Kanüle war eine Spritze angeschlossen, mit der die Aorta retrograd mit Perfusionslösung gespült wurde. Bei erfolgreicher Kanülierung wurden nun die Koronargefäße durch die Spülung sichtbar blutleer und eine retrograde Perfusion des Herzens war möglich. Die Kanüle mit dem daran fixierten Herzen wurde an die vorbereitete Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen und 3 min mit auf 37°C angewärmte Perfusionslösung gespült (Flussgeschwindigkeit 100 ml/h). Im Anschluss erfolgte die Perfusion für 11,5 min mit der ebenso angewärmten Verdauungslösung (Flussgeschwindigkeit 100,8 ml/h), welche die Enzyme Lipase und Trypsin enthält. Diese zersetzen die Extrazellulärmatrix, welche die Myozyten umgibt. Danach wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe durchtrennt und die Ventrikel in die Stopp 1-Lösung (Zusammensetzung 2.2.4.1) gelegt, welche den Verdauvorgang beendete. In mehreren Schritten erfolgte die vorsichtige mechanische Lösung der Myozyten aus dem Zellverband durch mehrfaches Aspirieren in Pipetten.

Die Stopp 2-Lösung (Zusammensetzung 2.2.4.1) wurde zugegeben und zur Trennung von Myozyten und Geweberesten wurde das Gemisch filtriert (Polyamid Filter, Hartenstein). Nach einer 10-minütigen Sedimentationsphase wurde der wässrige Überstand verworfen und nun konnte ein schrittweiser  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau der im Pellet enthaltenen Myozyten beginnen. Das Pellet wurde zunächst mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung 1 (0,125 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ , Zusammensetzung 2.2.4.1) bedeckt, vorsichtig geschwenkt und 10 min sedimentieren gelassen, bevor der wässrige Überstand erneut verworfen wurde. Der Vorgang wurde mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösungen 2 und 3 (0,25 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  und

0,5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ ) wiederholt. Nach der beschriebenen Isolation und Aufbereitung der Myozyten wurden diese auf Zellkulturschalen mit Glasboden (Cellview, Greiner Bio-one) ausplattiert und zur Anheftung für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellkulturschalen waren vorher mit Laminin (2.2.4.2 Konfokalmikroskopie) beschichtet worden, welches der Anheftung der Zellen dient.

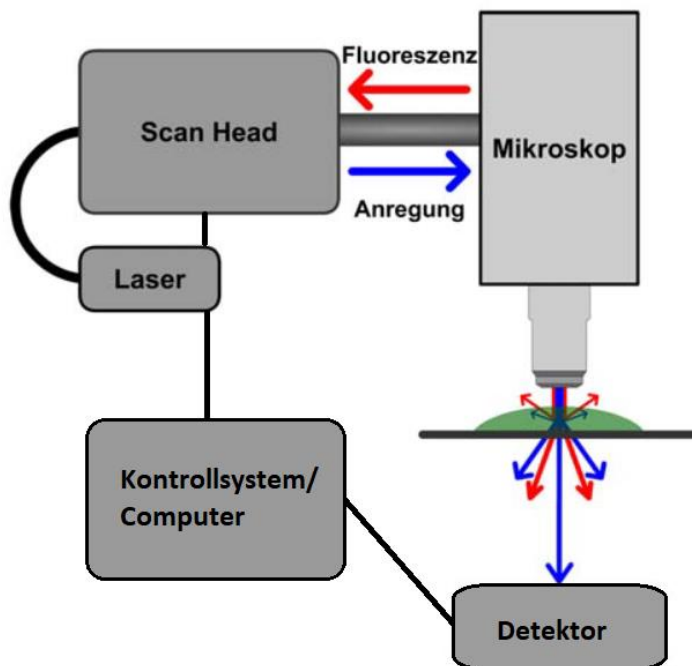
## **2.4 Live-Cell-Imaging am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop**

### **2.4.1 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop**

Bei einem konventionellen Lichtmikroskop erfolgt die Umwandlung vom Objekt zum Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig. Dagegen ist die Grundidee eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops das zeilenweise serielle Abrastern (engl. scan = rastern) des Präparats mit einem fokussierten Laserstrahl. Durch das vom bestrahlten Präparatpunkt emittierte Fluoreszenzlicht entstehen mithilfe eines Detektors einzelne

Bildpunkte, welche von einer Software auf dem Computer zu einem Bild zusammengesetzt werden (Wilhelm et al., 2003).

Für diese Messungen werden folgende Gerät benötigt: Laser, Scan-Kopf, Transmissionsdetektor (Photomultiplier), Mikroskop und Computer (Abb. 5).

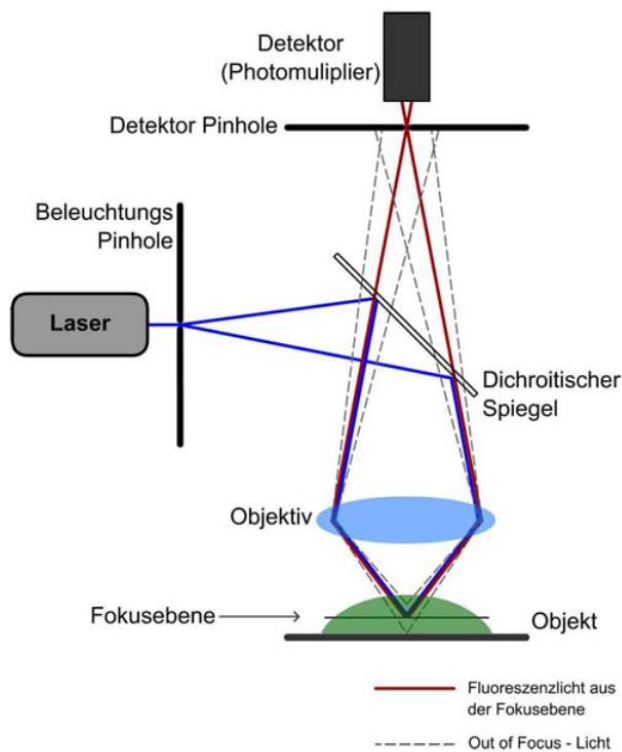


**Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.**

*Der Computer als Kontrollelement ist mit Scan Head, Laser, Mikroskop und Detektor verbunden, er steuert die Messungen, verarbeitet und speichert die gemessenen Daten.*

*Abbildung modifiziert nach Volgger und Lichtscheidl (Volgger and Lichtscheidl, 2008)*

Der Laserstrahl, monochromatisches Licht mit hoher Intensität, wird durch den Scan-Kopf auf das Präparat fokussiert (Abb. 6). Der Scankopf besteht aus Spiegeln mit Stellmotoren zur Lenkung des Laserstrahls in der X- und Y-Achse und ermöglicht, dass der Lasterstrahl Punkt für Punkt über das Objekt geführt wird. Über dieselben Spiegel gelangt das emittierte Fluoreszenzlicht vom Objektpunkt zurück in den Scankopf. Dort kann es durch dichroitische Spiegel und Blenden variabel aufgeteilt werden. Durch eine konfokale Blende (Pinhole) in der hinteren Brennebene gelangt das Fluoreszenzlicht zum Detektor (Photomultiplier). Der Durchmesser der Blende ist variabel und ermöglicht, dass Licht von außerhalb der Brennebene des Objekts blockiert wird und nur Licht aus der Brennebene des Objekts zum Detektor gelangt (Wilhelm et al., 2003). Dieser wandelt das Licht in ein elektrisches Signal um und leitet es über ein Steuermodul an den Computer weiter. Der Computer hat mehrere Funktionen, er steuert die Messung und verarbeitet sowie speichert die Daten.



**Abbildung 6: Schematisches Prinzip und Strahlengang des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops**

Ein Laserstrahl (in der Abb. blau dargestellt) wird über mehrere Spiegel in die Probe gelenkt und erzeugt dort Fluoreszenzlicht (in der Abb. rot dargestellt). Dieses wird über das Objektiv gesammelt und über einen dichroitischen Spiegel zum Detektor weitergeleitet. Vor dem Detektor befindet sich eine konfokale Blende (Detektor-Pinhole). Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene (in der Abb. „Out of Focus-Licht“ genannt) trifft defokussiert auf die konfokale Blende, erreicht den Detektor nicht und trägt somit auch nicht zur Bildentstehung bei.

Abbildung nach Volgger und Lichtscheidl (Volgger and Lichtscheidl, 2008)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bietet verschiedene Vorteile, welche sie geeignet für die Fragestellung im vorliegenden Projekt machen. Sie bietet eine sehr gute Auflösung, was wichtig ist um Fluoreszenzsignale aus unterschiedlichen Zellkompartimenten wie Nukleus und Zytoplasma darstellen zu können. Des Weiteren erlauben die hohe Sensitivität sowie die Fluoreszenzintensität-Quantifizierung die während der Kontraktion der Kardiomyozyten zyklisch wechselnden Fluoreszenzsignale abzubilden. Ein entscheidender Vorteil der Messmethode ist die hohe zeitliche Auflösung, welche das Live-Cell-Imaging möglich macht, also die Darstellung dynamischer zellulärer Vorgänge wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten kontrahierender Kardiomyozyten (2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und vgl. (Volgger and Lichtscheidl, 2008)).

### **2.4.2 Aufbau der Messanlage**

Die Messungen erfolgten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 780) unter Verwendung des zugehörigen Programms LSM Software Zen 2012 (Zeiss). Es wurde das Objektiv C-Apochromat x63 genutzt. Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

Nach dem Anheften der isolierten Kardiomyozyten auf den Zellkulturschalen wurden die Zellen entweder mit Fluo4 AM oder X-Rhod-1 gefärbt (für Beschreibung der Beladung 2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bzw. 2.4.5 Messung von mitochondrialem Calcium) und mit Tyrode bedeckt. Die Zellkulturschalen wurden dann in der dafür vorgesehenen Halterung unter dem Mikroskop arretiert. Die für die elektrische Feldstimulation notwendigen Elektroden wurden angebracht und mit dem elektrischen Stimulator verbunden. Eine Perfusionsanlage mit Tyrode und den für die Messungen vorgesehenen Stoffen (nächster Abschnitt Messprotokoll) wurde über Schläuche und eine Nadelkanüle an die Zellkulturschale unter dem Mikroskop angeschlossen. Ergänzend wurde eine Absaugvorrichtung angebracht. So konnten die Zellen stetig mit der jeweilig gewünschten Lösung umspült werden (Tropfgeschwindigkeit ca. 1/s). Mithilfe des Okulars konnten geeignete Zellen fokussiert und in der passenden Fokusebene dargestellt werden.

### **2.4.3 Messprotokoll**

Die Kardiomyozyten wurden für die Experimente in einem elektrischen Feld mit einer Frequenz von 1 Hz oder 4 Hz stimuliert. Zuerst wurden sie drei min lang mit Tyrode als Kontrolllösung umspült und mit der entsprechenden Frequenz stimuliert bevor zum Messzeitpunkt 0 min begonnen wurde entweder AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) oder Isoproterenol ( $500 \text{ nmol/l}$ ) als Lösung zuzuführen (Zusammensetzung 2.2.4.2). Zusätzlich gab es die gleichen Versuchsbedingungen (Hinzugabe von AngII oder Iso) noch einmal mit dem Zusatz von Dantrolen (Blocker des mRyR1,  $1 \mu\text{mol/l}$ ). In diesem Fall wurden die Zellen schon vor Beginn der Messungen 10 min mit Dantrolen inkubiert und Dantrolen wurde während des Experiments über die Lösungen mit AngII oder Iso zugeführt. Zudem gab es eine unbehandelte Kontrollgruppe, die nur mit der Kontrolllösung Tyrode umspült wird. Diese ist u.a. relevant, um mögliche Farbstoffleckage und Photobleaching-Effekte zu korrigieren. Es ergeben sich also fünf Behandlungsgruppe, die jeweils bei 1 oder 4 Hz gemessen wurden: unbehandelte Kontrollen, AngII, AngII+Dantrolen, Iso, Iso+Dantrolen. Die beschriebenen Versuche wurden an Kardiomyozyten aus MCU KO-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt. Es wurde eine Anzahl von n Zellen pro



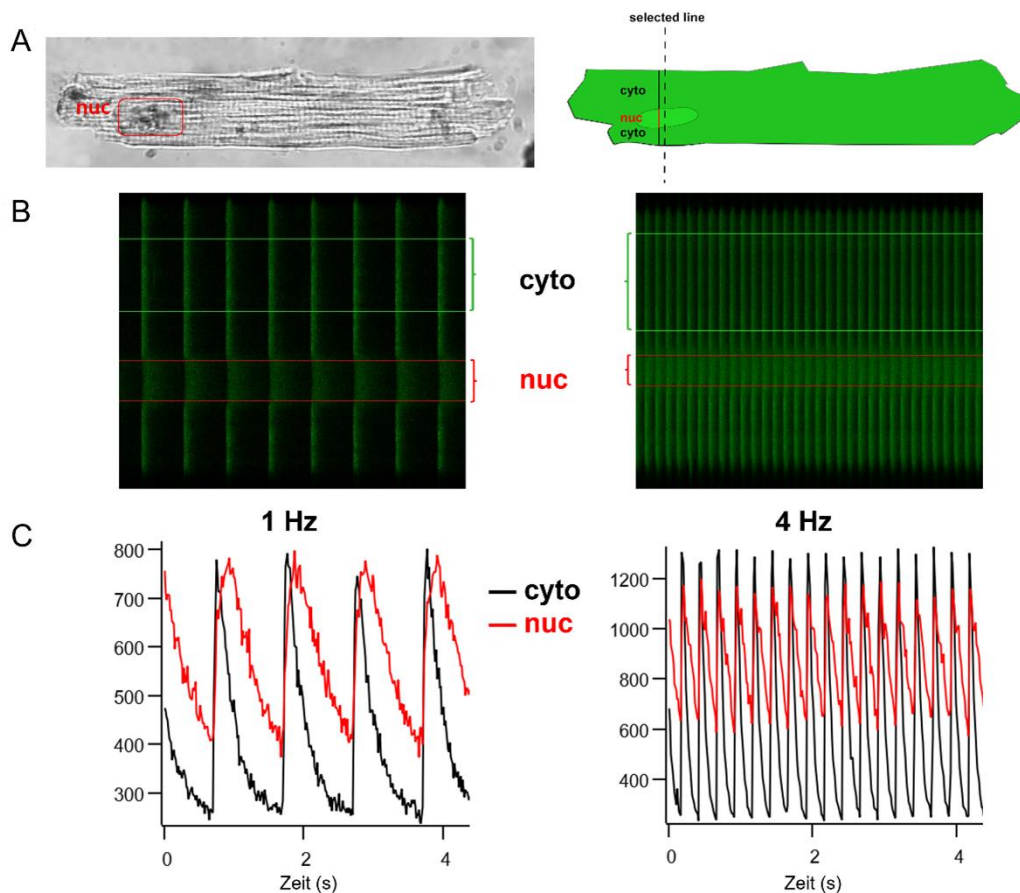
Behandlungsgruppe gemessen. Für jede Behandlungsgruppe wurden Zellen von mindestens 3 Mäusen (MCU KO-Mäuse oder WT-Mäusen) genutzt.

Nach dem Messzeitpunkt 0 min waren 5, 10, 15 und 20 min weitere Messzeitpunkte. In einem weiteren Experiment wurde der Wechsel der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz untersucht, wobei zusätzlich bei 0,5, 1 und 2 min gemessen wurde.

#### **2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten**

Fluo4 AM ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff für Messungen im Bereich zwischen 100 nmol/l und 1  $\mu\text{mol/l}$  (Gee et al., 2000), welcher genutzt wird um zytosolische und nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, im Sinne der zyklischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderungen in Zytosol und Zellkern, zu bestimmen (Kockskamper et al., 2008, Plačičić et al., 2016). Die Farbstoffbeladung der Myozyten erfolgte nach der Ausplattierung auf Zellkulturschalen durch 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (Fluo4-Konzentration 20  $\mu\text{mol/l}$ ), gefolgt von einem 10-minütigen Auswaschvorgang mit Tyrode. Anschließend wurde die Messanlage wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben vorbereitet.

Für das Experiment wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM von einem Argon-Laser mit Exzitationswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  angeregt, das emittierte Fluoreszenzsignal bei Emissionswellenlängen von  $\lambda_{\text{em}} = 515\text{-}530 \text{ nm}$  aufgenommen. Weitere Einstellungen: Frame Size 512x512 Pixel, Pixelzeit 1,58  $\mu\text{s}$ , Pixeltiefe 12 bit, Scanbreite 134,7  $\mu\text{m}$ , Pixelgröße 0,26  $\mu\text{m}$ , Zoomfaktor 1,0. Das Fluoreszenzsignal wurde im Line Scan-Modus aufgenommen, wobei das Objekt (hier der Myozyt) immer entlang einer festgelegten Linie und bei gleichen Einstellungen in festen Intervallen gescannt wurde (Abb. 7). Diese zu Beginn der Messung festgelegte Messlinie lag senkrecht zur Längsachse des Myozyten und schnitt den Kern, sodass gleichzeitig Fluoreszenzsignale aus dem Zytoplasma, dem Kern und vom Hintergrund aufgenommen wurden. Diese drei interessierenden Bereiche, engl. region of interest (ROI), wurden markiert (beispielhaft in Abb. 7 B), die jeweiligen Fluoreszenzsignale als Rohdaten exportiert und in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt (beispielhaft in Abb. 7 C). Pro Messzeitpunkt wurden über 8 s Fluoreszenzsignale im Abstand von 16 ms (Millisekunden) aufgenommen. Die zytosolischen und nukleären Fluoreszenzsignale wurden hintergrundkorrigiert. Zu jedem Messzeitpunkt wurde das durchschnittliche diastolische und systolische  $\text{Ca}^{2+}$  als Mittelwert von drei repräsentativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bestimmt.



**Abbildung 7: Messung von zytosolischen und nukleären Fluoreszenzsignalen mittels Line Scan**

A Links lichtmikroskopisches Bild eines ventrikulären Kardiomyozyten mit rot umrahmtem Kern (nuc). Rechts schematische Darstellung eines Kardiomyozyten im Line Scan Modus. Dabei wird die Linie, entlang derer gemessen wird (selected line) senkrecht zur longitudinalen Achse des Myozyten gelegt, sodass sie den Kern schneidet. So kann gleichzeitig nukleäres und zytosomatisches Fluoreszenzsignal aufgezeichnet werden.

B Original Line Scan-Fluoreszenzsignal von elektrisch stimulierten Myozyten bei 1 Hz (links) und 4 Hz (rechts) mit markierter ROI (region of interest) der zytosomatischen (cyto, schwarz) und nukleären (nuc, rot) Ca<sup>2+</sup>-Transienten.

C Original-Kurvenverläufe der Fluoreszenzsignale der in B dargestellten Ca<sup>2+</sup>-Transienten im Zeitverlauf; X-Achse: Zeit (s); Y-Achse: Fluo4-Fluoreszenzsignal).

**2.4.5 Messung von mitochondrialem Calcium**

X-Rhod-1 ist ein Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff (Thermo Fisher Scientific, 2010), der potentialvermittelt in Mitochondrien aufgenommen und zur Bestimmung des mitochondrialen Ca<sup>2+</sup> verwendet wird (Dedkova and Blatter, 2012, Davidson et al., 2007). Zur Beladung wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit dem in Tyrode gelösten Farbstoff (Konzentration 5 µmol/l) inkubiert. Anschließend folgten 10 min Inkubation mit CoCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur, um eventuell im Zytosol verbliebene Farbstoffmoleküle zu binden (sog. Quenching der zytosolischen Fluoreszenz). Der Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1 wurde von einem Argon-Laser mit Exzitationswellenlänge λ<sub>ex</sub> 543 nm angeregt, das emittierte Fluoreszenzsignal wurde bei Emissionswellenlängen von λ<sub>em</sub> 552-617 nm

aufgenommen. Die Fluoreszenzsignale wurden im Intervall von 2 s im Frame Modus aufgenommen, wobei im Gegensatz zum Line Scan keine Messlinie durch den Myozyten gezogen, sondern die interessierende Zelle durch ein Feld markiert wurde. Dadurch wurden sämtliche Fluoreszenzsignale der in der Fokusebene liegenden Mitochondrien erfasst. Weitere Einstellungen: Scan Mode Frame, Frame Size 512x512 Pixel, Pixelzeit 1,58  $\mu$ s, Pixeltiefe 12 bit, Scanbreite 224,5  $\mu$ m, Pixelgröße 0,44  $\mu$ m, Zoomfaktor 0,6.

## **2.5 Statistische und graphische Auswertung**

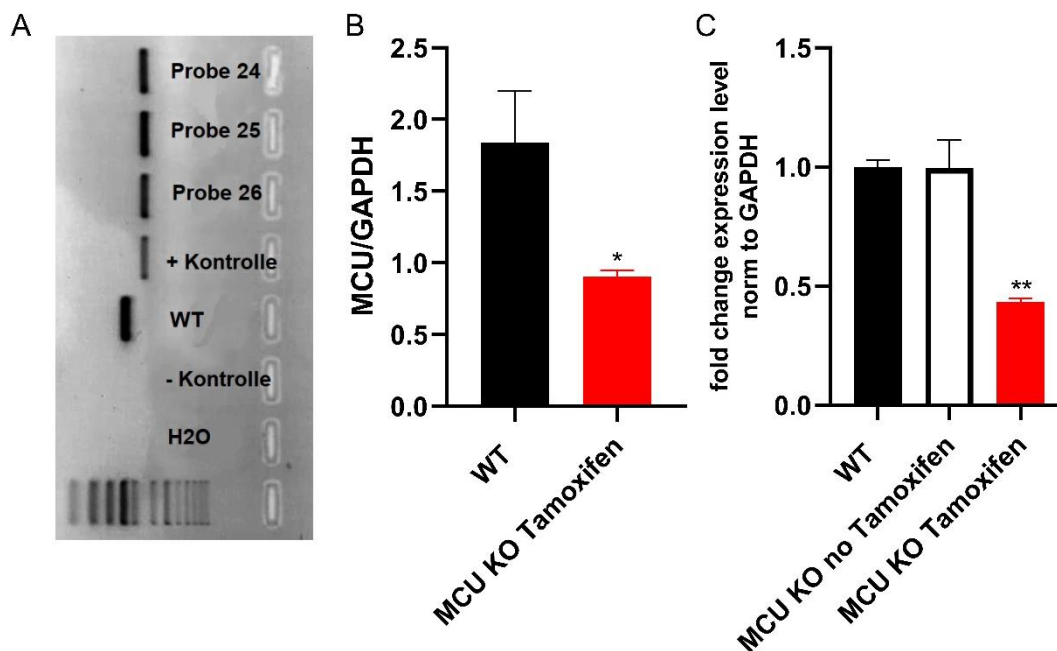
Dies Messdaten des Konfokalmikroskops wurden aus dem Programm LSM Software Zen 2012 (Zeiss) in Microsoft Excel übertragen. Die statische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen Igor Pro 6.37, Microsoft Excel und GraphPad Prism 9.

Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM) für die angegebene Anzahl von Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde für wiederholte Messungen durch two-way ANVOA-Analyse ermittelt, wobei für den Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe via Dunett's post-hoc Test bzw. den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen via Tukey post-hoc Test getestet wurde. Als statistisch signifikant wird ein P-Wert von  $<0,05$  erachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Molekularbiologische Analyse des MCU KO-Tiermodells

Das für die Experimente verwendete MCU KO-Mausmodell (2.3.1 Versuchstiere) wird mithilfe molekularbiologischer Methoden analysiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (2.3.2.1 Genotypisierung mittels PCR), die Proteinexpression wird mittels Western Blot ermittelt (2.3.2.3 Proteinanalytik) und das mRNA-Expressionslevel für MCU wurde mittels RT-PCR (2.3.2.2 Real-time-PCR) bestimmt. In Abb. 8 B ist die MCU-Proteinexpression normalisiert auf GAPDH dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der MCU-Proteinexpression um 50,9% im Vergleich von MCU KO-Mäusen nach 7 Tagen Tamoxifengabe mit den WT-Mäusen (WT  $1,84 \pm 0,36$ ,  $n=3$ ; MCU KO  $0,904 \pm 0,05$ ,  $n=3$ ). Die Abb. 8 C zeigt den Vergleich des MCU mRNA-Expressionslevels. Auch das MCU mRNA-Expressionslevel war bei den Mäusen mit MCU KO, die über 7 Tage Tamoxifenfutter erhalten hatten, um 46,6% signifikant reduziert im Vergleich zu den WT und den Tieren mit MCU KO, die kein Tamoxifenfutter erhalten hatten, WT  $1,0 \pm 0,03$ ,  $n=3$ ; MCU KO kein Tamoxifen  $0,99 \pm 0,12$ ,  $n=3$ ; MCU KO Tamoxifen  $0,434 \pm 0,014$ ,  $n=3$ .



**Abbildung 8: Expressionslevel von MCU in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten**

A Repräsentatives Ergebnis einer MCU-PCR für drei Proben mit MCU-KO (nummeriert 24-26), daneben Positivkontrolle (MCU KO), WT-Bande und Negativkontrolle.

B Proteinexpression von MCU auf GAPDH normalisiert von MCU KO-Mäusen nach Gabe von Tamoxifen oder WT-Mäusen, gemessen an jeweils 3 Mäusen pro Gruppe, dargestellt als Mittelwert ±SEM.

C RT-PCR auf MCU mRNA (normalisiert auf GAPDH mRNA) von MCU KO-Tieren unter Tamoxifen (rot, Messungen an 3 Mäusen) im Vergleich mit MCU KO-Tieren ohne Tamoxifen (schwarz umrandet, Messungen an 3 Mäusen) und WT-Tieren (schwarz, Messungen an 3 Mäusen), dargestellt als Mittelwert ±SEM. \*  $p < 0,05$  vs. WT (ungepaarter t-Test) \*\*  $p < 0,01$  vs. WT und vs. MCU KO kein Tamoxifen (ungepaarter t-Test). Abkürzungen: MCU KO = Knock-out des Mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporters, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

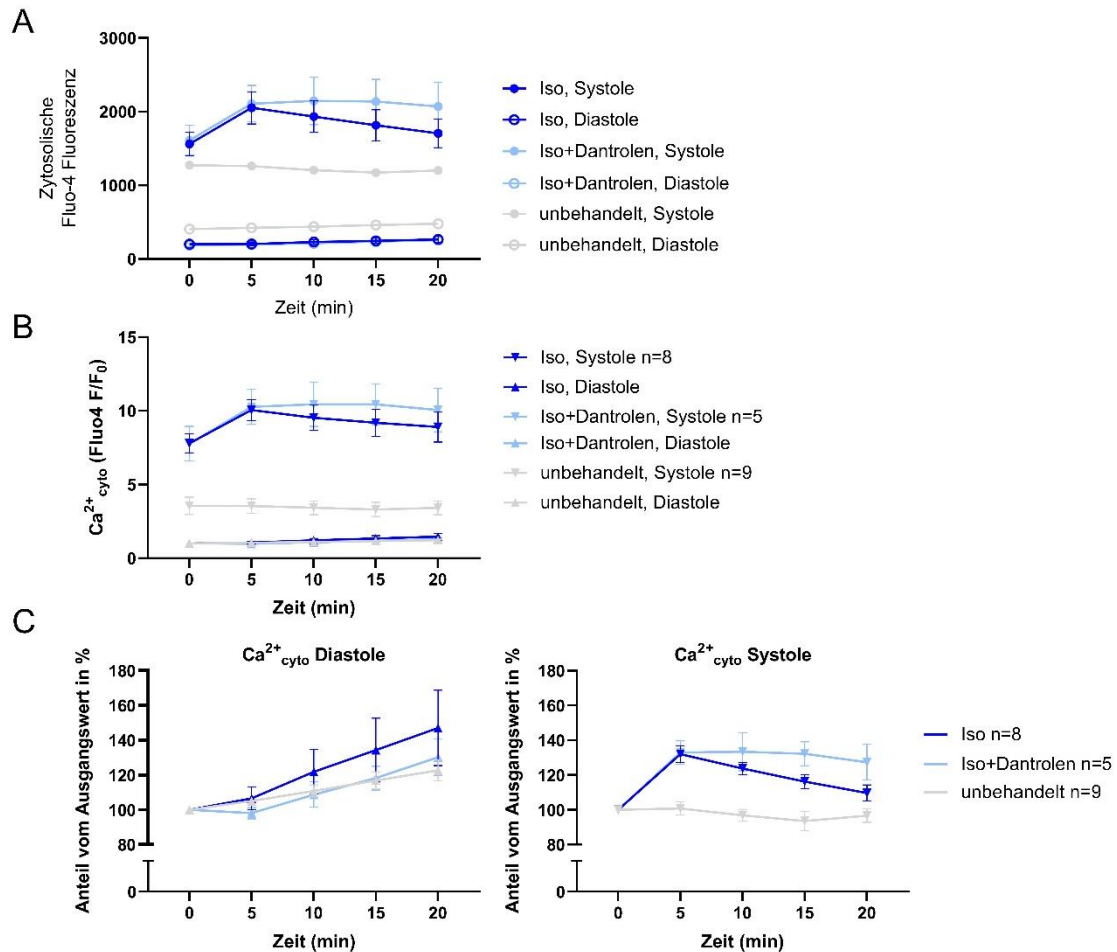
**3.2 Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern**

Die Messung der zytosolischen und nukleären  $Ca^{2+}$ -Transienten erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM. Dabei können aus dem Kurvenverlauf eines  $Ca^{2+}$ -Transienten Diastole und Systole unterschieden werden (2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten). Somit erhält man für jede Zelle zu jedem Messzeitpunkt (0, 5, 10, 15, 20 min) einen diastolischen und einen systolischen Fluoreszenzwert jeweils für Zytosol und Kern. Diese werden im Folgenden als diastolisches bzw. systolisches  $Ca^{2+}_{cyto}$  und  $Ca^{2+}_{nuc}$  bezeichnet. Für jede Untersuchungsbedingung im Experiment (Stimulationsfrequenz und Behandlung z.B. 1 Hz, Iso) wurden mehrere Zellen (Anzahl n der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen (je nach Gruppe WT oder MCU KO) gemessen. Um zur Präsentation der Ergebnisse hinzuführen, wird in Abb. 9 die schrittweise Auswertung der  $Ca^{2+}$ -Transienten am Beispiel dreier Gruppen gezeigt.

Die Abb. 9 A zeigt die diastolischen und systolischen Fluoreszenzdaten zu den Messzeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 min, gemittelt aus den Daten von jeweils n Zellen pro Gruppe. Die Kardiomyozyten wurden in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt) oder ab dem Zeitpunkt 0 min mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation mit dem mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit Iso stimuliert. Zum Zeitpunkt 0 min, und damit vor der Behandlung mit Iso, herrschen gleiche Ausgangsbedingungen für die Zellen der verschiedenen Gruppen (zum Einfluss von Dantrolen siehe 4.2 Stimulation mit dem IP<sub>3</sub>R-Agonisten Angiotensin II bei gestörter mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme).

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen, z.B. bei unterschiedlichen absoluten diastolischen Fluoreszenzwerten zum Zeitpunkt 0 min (Abb. 9 A), wird jeder systolische und diastolische Messwert (F) auf den diastolischen Fluoreszenzmesswert der jeweiligen Zelle zum Zeitpunkt 0 min (F<sub>0</sub>) normiert, allgemein hin bezeichnet als F/F<sub>0</sub>. In Abb. 9 B werden für jede Gruppe die diastolischen und systolischen Mittelwerte der normalisierten Fluoreszenzsignale F/F<sub>0</sub> dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass die Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen schon vor der Behandlung, also bei eigentlich gleichen Ausgangsbedingungen, deutlich niedrigere systolische F/F<sub>0</sub>-Werte zeigt. Das kann am ehesten mit unterschiedlicher Zellbeladung und -qualität erklärt werden. Um diese Unterschiede rechnerisch miteinzubeziehen, wird im nächsten Schritt die für die Fragestellung der Arbeit interessierende Veränderung der diastolischen bzw. systolischen Werte über den Behandlungszeitraum dargestellt. Die Abb. 9 C zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM der prozentualen Veränderungen ausgehend jeweils vom diastolischen (links) oder systolischen Ausgangswert (rechts) zum Zeitpunkt 0 min. Diese Darstellungsform ermöglicht einen übersichtlichen Vergleich der verschiedenen Gruppen hinsichtlich der Veränderung im Beobachtungszeitraum. Zudem ist sie unabhängig von im Untersuchungsaufbau nicht kontrollierbaren Unterschieden, z.B. hinsichtlich der Zellqualität und Farbstoffbeladung. Im Folgenden werden die Ergebnisse der nukleären und zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten in getrennten Abbildungen betrachtet. Es werden jeweils erst die diastolischen und systolischen Fluoreszenzdaten (wie hier in Abb. 9 A) und dann die prozentuale Veränderung der diastolischen bzw. systolischen Ausgangswerte präsentiert (wie hier in Abb. 9 C).



### Abbildung 9: Einfluss von Isoprenalin und Dantrolen auf cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Transienten

Die Zellen wurden mit dem Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM beladen, in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso (500 nmol/l) stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen (1  $\mu$ mol/l) mit Iso stimuliert. A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte von n Zellen pro Gruppe. B zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM der normierten Fluoreszenzsignale F/F<sub>0</sub> (mit F<sub>0</sub> definiert als Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min) von n Zellen pro Gruppe. C zeigt Mittelwerte  $\pm$ SEM der prozentualen Veränderung im Vergleich zu den systolischen (rechts) oder diastolischen (links) Ausgangswert (0 min) zu den Messzeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 min.

Abkürzungen:  $\beta$ -AR =  $\beta$ -adrenerger Rezeptor, Iso = Isoproterenol, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler).

### 3.3 Mitochondriale Calciumaufnahme bei 1 Hz Stimulation

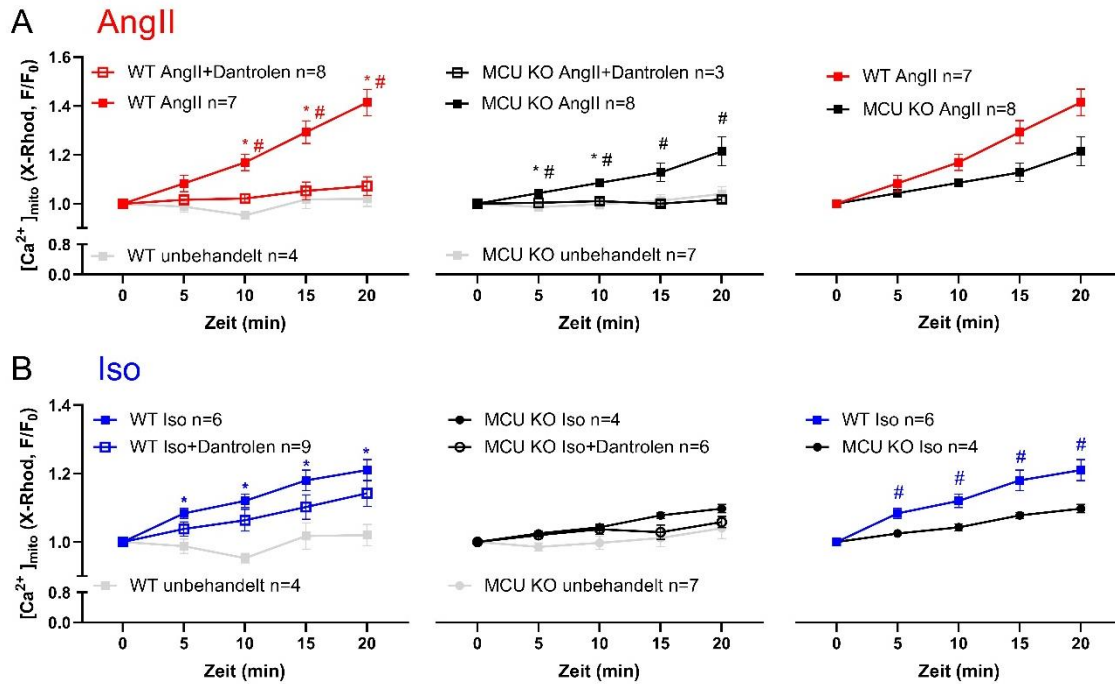
Zur Messung des mitochondrialen Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup><sub>mito</sub>) wurden Kardiomyozyten mit dem nicht ratiometrischen, Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1 beladen (2.4.5 Messung von mitochondrialem Calcium). Die Kardiomyozyten wurden in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten AngII stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit AngII oder Iso stimuliert (2.4.3 Messprotokoll). Die Messungen erfolgten bei elektrischer Feldstimulation von 1 Hz. Pro Gruppe wurden mehrere Zellen (Anzahl n

der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen gemessen. In Abb. 10 werden die normalisierten Fluoreszenzsignale als  $F/F_0$ , mit  $F_0$  definiert als Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min, zu den Messzeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 min dargestellt.

Die Behandlung mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII führte in den Kardiomyozyten von WT-Mäusen erwartungsgemäß zu einer deutlichen Steigerung des  $Ca^{2+}_{mito}$  um  $41 \pm 5\%$  nach 20 min (Abb. 10 A links). Dieser Effekt war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant  $2 \pm 2\%$  nach 20 min.

Der AngII-induzierte Anstieg von  $Ca^{2+}_{mito}$  konnte durch Behandlung der Zellen mit dem mRyR1-Blocker Dantrolen aufgehoben werden. Zellen, die zusätzlich zur Gabe von AngII mit Dantrolen behandelt wurden, zeigten eine nur geringe Zunahme von  $Ca^{2+}_{mito}$  von maximal  $7 \pm 3\%$  nach 20 min. Dieser Effekt von AngII+Dantrolen zeigte sich als signifikant niedriger im Vergleich zur Behandlung mit AngII (Abb. 10 A links).





**Abbildung 10: Mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten bei 1 Hz**  
 Ventrikuläre Kardiomyozyten von WT- und MCU KO-Mäusen wurden zur Messung der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Aufnahme mit dem  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1/AM beladen, in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt unbehandelt, mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII oder Iso stimuliert. Das dargestellte Fluoreszenzsignal  $F/F_0$  mit  $F_0$  definiert als Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min, spiegelt das mitochondriale  $Ca^{2+}$  zu den angegebenen Messzeitpunkten wider. Mittelwerte  $\pm$ SEM der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Aufnahme von WT-Myozyten (links) und MCU KO-Myozyten (mittig) bzw. deren Vergleich (rechts). \*  $p < 0.05$  WT AngII vs. WT unbehandelt (rot) bzw. MCU KO AngII vs. MCU KO unbehandelt (schwarz) bzw. WT Iso vs. WT unbehandelt (blau) (two-way-ANOVA, Dunett's multiple comparisons test), #  $p < 0.05$  WT AngII vs. WT AngII+Dantrolen (rot) bzw. MCU AngII vs. MCU KO AngII+Dantrolen (schwarz) bzw. WT Iso vs. MCU KO Iso (two-way-ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).  
 Abkürzungen: AngII = Angiotensin II,  $\beta$ -AR =  $\beta$ -adrenerger Rezeptor, Iso = Isoproterenol, MCU KO = Knock-out des Mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporters, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

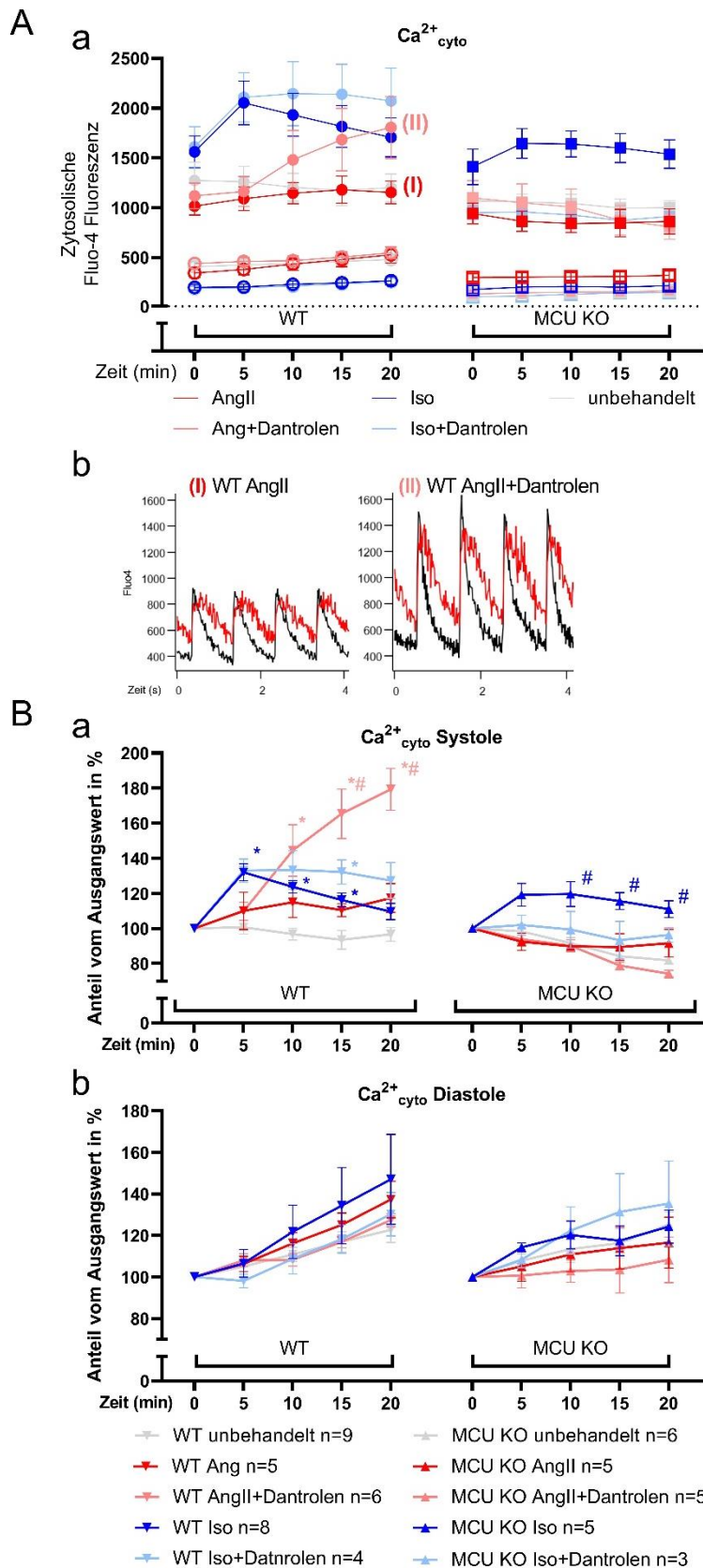
Auch bei Kardiomyozyten der MCU KO-Mäuse steigerte AngII das  $Ca^{2+}_{\text{mito}}$  ( $+21 \pm 4\%$ ), was signifikant mehr war verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe ( $+4 \pm 2\%$ , Abb. 10 A mittig). Ebenso schwächte die zusätzliche Behandlung mit Dantrolen den Effekt von AngII in den Kardiomyozyten der MCU KO-Mäuse signifikant ab,  $Ca^{2+}_{\text{mito}}$  blieb unter AngII+Dantrolen über den Beobachtungszeitraum weitgehend konstant ( $+2 \pm 1\%$ ). In den unbehandelten Kontrollen sowohl der MCU KO- als auch der WT-Myozyten veränderte sich das  $Ca^{2+}_{\text{mito}}$  im Verlauf der 20 min nicht relevant (MCU KO  $+4 \pm 2\%$  bzw. WT  $+2 \pm 2\%$ ). Eine vergleichende Darstellung des AngII-Effekts in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten ist in Abb. 10 A rechts dargestellt. Die Blockade des mRyR1 verhindert den  $IP_3$ -vermittelten Anstieg des  $Ca^{2+}_{\text{mito}}$  bei mit 1 Hz stimulierten Kardiomyozyten. Das gilt sowohl für WT- als auch für MCU KO-Kardiomyozyten, sodass der Effekt unabhängig vom MCU scheint.

Als nächstes soll der Behandlungseffekt des  $\beta$ -AR-Agonisten Iso betrachtet werden (Abb. 10 B). Erwartungsgemäß steigt  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  bei Behandlung mit Iso an ( $+21\pm 3\%$  (20 min)). Dieser Effekt ist zu allen Messzeitpunkten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $+2\pm 3\%$  (20 min)). Auch in Kombination mit Dantrolen steigert Iso das  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  ( $+14\pm 4\%$  (20 min)). Hier zeigt sich der Effekt zwar etwas geringer ausgeprägt als durch die alleinige Behandlung mit Iso, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Bei den MCU KO-Myozyten gibt es keine Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  unter Iso ( $+10\pm 1\%$ ) bzw. Iso + Dantrolen ( $+6\pm 2\%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $+4\pm 3\%$ ). Interessant ist der Vergleich von WT- und MCU KO-Kardiomyozyten (Abb. 10 B rechts). Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt erwartungsgemäß zu einem Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  in den WT-Zellen, nicht aber in den MCU KO-Zellen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Die  $\beta$ -adrenerg vermittelte Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  durch Iso erfolgt also über den MCU (abgeschwächter  $\beta$ -AR vermittelter Effekt bei MCU Blockade) und wird durch die mRyR1-Blockade nicht verändert.

### 3.4 Zytosolische Calciumtransienten bei 1 Hz Stimulation

Die Messung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM (2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten). Die Kardiomyozyten wurden in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation mit dem mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit AngII oder Iso stimuliert (2.4.3 Messprotokoll). Pro Gruppe wurden mehrere Zellen (Anzahl n der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen gemessen.

Abb. 11 Aa zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. Zur Veranschaulichung sind in Ab zwei repräsentative Originalspuren der Gruppen WT AngII bzw. WT AngII+Dantrolen zum Zeitpunkt 20 min dargestellt. Diese Zeitpunkte sind in Aa mit (I) (rot für WT AngII) bzw. II (rosa für AngII+Dantrolen) markiert. In Abb. 11 B sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  (% vom Ausgangswert) im Beobachtungszeitraum über 20 min dargestellt (dazu auch die einleitenden Erläuterungen in 3.2. Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern). Dabei finden sich unter Ba die systolischen und unter Bb die diastolischen Werte. Jeweils links sind die Ergebnisse der WT-Kardiomyozyten und rechts der MCU KO-Kardiomyozyten dargestellt.



**Abbildung 11: Zytosolisches  $Ca^{2+}$ -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten in WT- und MCU KO-Mäusen 1 Hz**

Die Zellen wurden mit dem  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 beladen, in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII oder Iso stimuliert. Aa

zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte von  $n$  Zellen pro Gruppe, Ab zeigt zwei repräsentative Originalspuren der Gruppen WT AngII bzw. WT AngII+Dantrolen zum Zeitpunkt 20 min. B zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $Ca^{2+}_{cyto}$  (% vom Ausgangswert) über 20 min von  $n$  Zellen pro Gruppe, Ba systolische und Bb diastolische Werte. Jeweils links die WT- und rechts die MCU KO-Gruppen. \*(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT unbehandelt, #(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT AngII, \*(blau)  $p < 0.05$  WT Iso vs. WT unbehandelt, \*(hellblau)  $p < 0.05$  WT Iso+Dantrolen vs. WT unbehandelt, #(blau)  $p < 0.05$  MCU KO Iso vs. MCU KO unbehandelt (Statistik: two-way-ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).

Abkürzungen: AngII = Angiotensin II,  $\beta$ -AR =  $\beta$ -adrenerger Rezeptor, Iso = Isoproterenol, MCU KO = Knock-out des Mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporters, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

### 3.4.1 Systolisches Calcium im Zytosol

Zuerst wird das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  betrachtet, wenn nicht anders angegeben als  $Ca^{2+}_{cyto}$  (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min. In WT-Kardiomyozyten steigert die Behandlung mit dem  $IP_3R$ -Agonist AngII das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  um  $+17 \pm 8\%$  (Abb. 11 Ba). Bei zusätzlicher Behandlung mit Dantrolen steigert AngII das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  deutlich um  $+79 \pm 12\%$  zum Ausgangswert der Zellen. Der Effekt von AngII+Dantrolen ist signifikant verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, bei der das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  über 20 min stabil ist ( $-3 \pm 3\%$ ). Die Myozyten der MCU KO-Mäuse zeigten bei der Zugabe von AngII einen leichten Abfall der systolischen  $Ca^{2+}_{cyto}$  ( $-8 \pm 8\%$ ), wobei auch die Kontrollgruppe hier etwas abfällt ( $-18 \pm 2\%$ ). AngII hat keinen relevanten Effekt auf das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  von MCU KO-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Erhielten die Zellen vor Behandlung mit AngII zusätzlich Dantrolen, zeigte sich – anders als bei den WT-Kardiomyozyten – kein Anstieg des systolischen  $Ca^{2+}_{cyto}$  verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 11).

Die Behandlung mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso steigert das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  in den WT-Kardiomyozyten, es erreicht sein Maximum nach 5 min ( $+32 \pm 5\%$ ) um danach wieder abzufallen (auf  $+10 \pm 5\%$  nach 20 min; Abb. 11 Ba). Diese Steigerung ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $-3 \pm 4\%$ ) signifikant. Wird zusätzlich zu Iso Dantrolen gegeben, steigt das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  mit einem Maximum nach 5 min ( $+30 \pm 8\%$ ) und fällt dann etwas ab ( $+20 \pm 10\%$  (20 min)). Hier ist der Effekt (u.a. aufgrund der hohen Standardfehler) nur zum Messzeitpunkt 15 min signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe, in der Gesamtschau ist der Effekt von Iso und Iso+Dantrolen jedoch vergleichbar. In den MCU KO-Zellen hat Iso einen Effekt mit ähnlicher Dynamik, das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  steigt unter Iso mit Maximum nach 10 min ( $+20 \pm 7\%$ ) und leichtem Abfall bis 20 min ( $+11 \pm 5\%$ ; Abb. 11 Ba). Verglichen mit der Kontrollgruppe, welche über 20 min etwas abfällt ( $-18 \pm 2\%$ ), ist der Iso-Effekt signifikant. Bei Behandlung mit Iso und Dantrolen kommt es zu einer leichten Abnahme des systolischen  $Ca^{2+}_{cyto}$  über den

Beobachtungszeitraum (-4±4%), wobei die Gruppe damit höher als die unbehandelte Kontrollgruppe liegt (-18±2%).

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Bei Stimulation mit dem IP<sub>3</sub>R-Agonisten AngII und gleichzeitig gestörter mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme über den mRyR1 durch Dantrolen kommt es zu einem deutlichen Anstieg des systolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> in WT-Kardiomyozyten. Dieser Effekt ist bei MCU KO-Kardiomyozyten nicht zu beobachten.

Der β-AR-Agonist Iso erhöht in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten das systolische Ca<sup>2+</sup> mit ähnlicher Dynamik: Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> erreicht nach Beginn der Gabe von Iso schnell ein Maximum nach 5 min (WT) bzw. 10 min (MCU KO) und fällt dann leicht ab. Ein vergleichbarer Anstieg von Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> lässt sich in den wildtypischen Zellen nach Gabe von Iso in der Kombination mit Dantrolen beobachten. In den MCU KO-Zellen kommt es durch die Behandlung mit Iso und Dantrolen hingegen nur zu einer geringen, nicht signifikanten Steigerung von Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> verglichen mit der Kontrollgruppe.

### 3.4.2 Diastolisches Calcium im Zytosol

Das diastolische Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> (Abb. 11 Bb) wird, wenn nicht anders angegeben, als Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min betrachtet. Das diastolische Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> stieg in den WT-Myozyten durch die Stimulation mit AngII um +37±9% und durch AngII+Dantrolen um +27±3%. Zur unbehandelten Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, da es auch bei dieser zum Anstieg des diastolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> kam (+22±6%). Die MCU KO-Zellen zeigten unter AngII wenig Änderung der diastolischen Werte (Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> +8±11%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> +16±11%) (Abb. 11 Bb). Die Behandlung durch AngII+Dantrolen führte zu einem Anstieg des diastolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> von +25±6%, der jedoch ebenfalls verglichen mit der Kontrollgruppe nicht signifikant war.

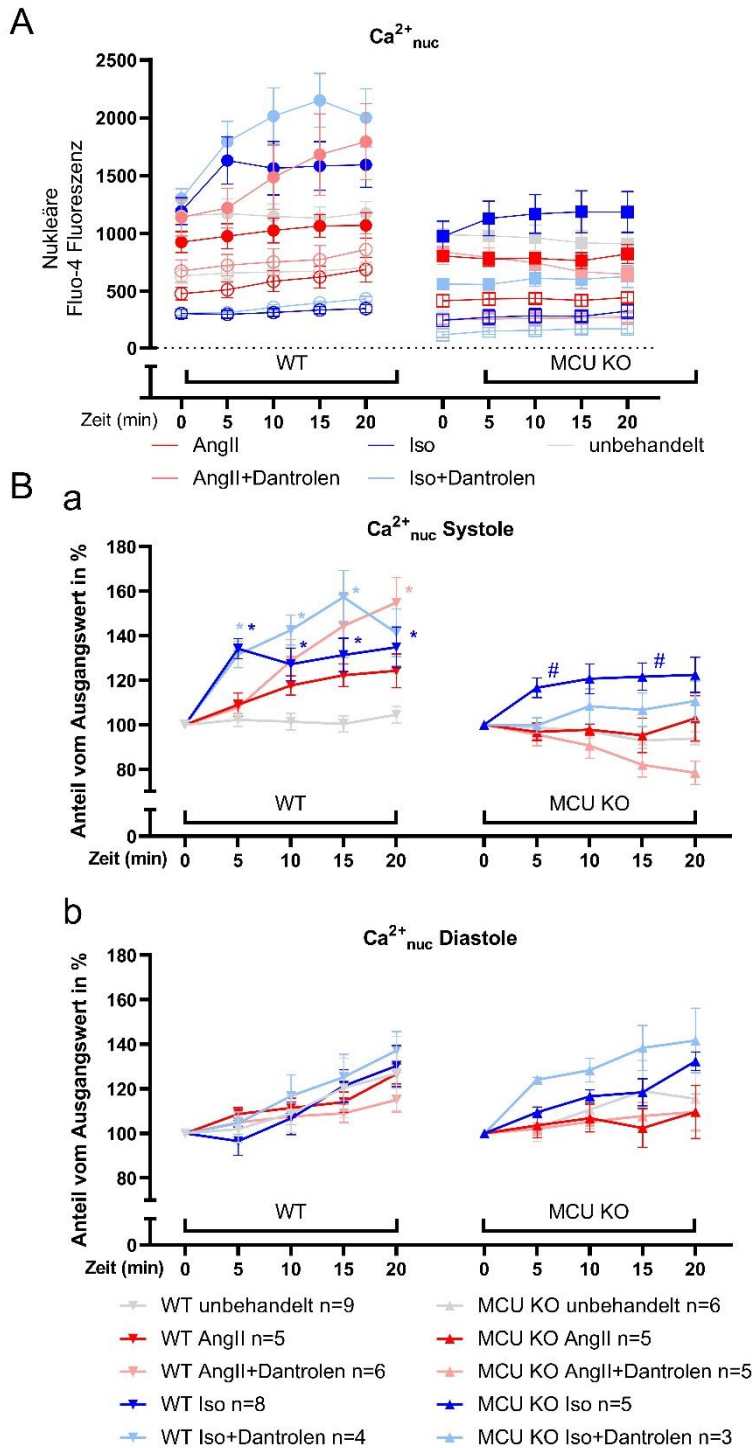
Die β-adrenerge Stimulation mit Iso führt in den WT-Kardiomyozyten zu einer Steigerung des diastolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> (+47±22%) (Abb. 11 Bb). Dabei sollte einschränkend erwähnt werden, dass einerseits auch die Kontrollgruppe steigt (+22±6%) und der Iso-Effekt im Vergleich dazu nicht relevant ist; andererseits ist der Standardfehler hoch. Die Behandlung mit Iso und Dantrolen erhöht das diastolische Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> (+30±10%), der Effekt ist verglichen mit der Kontrollgruppe nicht signifikant. Auch die MCU KO-Zellen zeigen sowohl unter Iso einen Anstieg des diastolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> (+24%±8%) als auch unter Iso und Dantrolen (+35±20%). Dabei steigen jedoch auch die unbehandelten Kontrollen der

MCU KO-Zellen an (+17±12%) und die Behandlung mit Iso bzw. Iso+Dantrolen hat im Vergleich dazu keinen signifikanten Effekt.

Festzuhalten ist: In der Tendenz steigt das diastolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  sowohl bei der Behandlung mit den  $IP_3R$ -Agonisten AngII als auch mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso. Diese Effekte sind jedoch nicht signifikant verglichen mit den unbehandelten Kontrollen in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten, da einerseits auch in den Kontrollgruppen eine Steigerung des diastolischen  $Ca^{2+}_{cyto}$  zu beobachten ist. Andererseits weisen die Werte z.T. hohe Standardfehler auf.

### **3.5 Nukleäre Calciumtransienten bei 1 Hz Stimulation**

Die Messung der nukleären  $Ca^{2+}$ -Transienten erfolgte – wie bei den zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten – mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM (2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten). Die Kardiomyozyten wurden in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit AngII oder Iso stimuliert (2.4.3 Messprotokoll). Pro Gruppe wurden mehrere Zellen (Anzahl n der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen gemessen. Abb. 12 A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. In Abb. 12 B sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $Ca^{2+}_{nuc}$  (% vom Ausgangswert) im Beobachtungszeitraum über 20 min dargestellt (3.2. Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern). Dabei finden sich unter Ba die systolischen und unter Bb die diastolischen Werte. Jeweils links sind die Ergebnisse der WT-Kardiomyozyten und rechts der MCU KO-Kardiomyozyten dargestellt.



**Abbildung 12: Nukleäres  $Ca^{2+}$ -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten in WT- und MCU KO-Mäusen 1 Hz**

Die Zellen wurden mit dem  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 beladen, in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII oder Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) stimuliert. A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte von  $n$  Zellen pro Gruppe. B zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $Ca^{2+}_{nuc}$  (% vom Ausgangswert) über 20 min von  $n$  Zellen pro Gruppe, Ba systolische und Bb diastolische Werte. Jeweils links die WT- und rechts die MCU KO-Gruppen. \*(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT unbehandelt, \*(blau)  $p < 0.05$  WT Iso vs. WT unbehandelt,

*\*(hellblau) p<0.05 WT Iso+Dantrolen vs. WT unbehandelt, #(blau) p<0.05 MCU KO Iso vs. MCU KO unbehandelt (Statistik: two-way-ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).  
Abkürzungen: AngII = Angiotensin II,  $\beta$ -AR =  $\beta$ -adrenerger Rezeptor, Iso = Isoproterenol, MCU KO = Knock-out des Mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Uniporters, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.*

### 3.5.1 Systolisches Calcium im Kern

Zuerst wird das systolische  $Ca^{2+}_{nuc}$  betrachtet, wenn nicht anders angegeben als  $Ca^{2+}_{cyto}$  (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min. Das systolische  $Ca^{2+}_{nuc}$  steigt durch Stimulation mit AngII ohne Dantrolen um  $+24\pm 8\%$ . Verglichen mit der Kontrollgruppe ( $+4\pm 3\%$ ) ist der AngII-Effekt jedoch nicht signifikant. Einen deutlichen Anstieg des systolischen  $Ca^{2+}_{nuc}$  zeigt die Behandlung mit AngII+Dantrolen ( $+55\pm 11\%$ ), dieser war zum Zeitpunkt 20 min signifikant zur Kontrollgruppe (Abb. 12 Ba). In den Myozyten der MCU KO-Mäuse zeigte sich bei der Zugabe von AngII keine Veränderung des systolischen  $Ca^{2+}_{nuc}$  ( $+3\pm 10\%$ ). In der Gruppe, die mit AngII+Dantrolen behandelt wurde, kam es zu einem Abfall des systolischen  $Ca^{2+}_{nuc}$  ( $-22\pm 5\%$ ), wenngleich dieser nicht signifikant zur im Beobachtungszeitraum stabilen Kontrollgruppe ( $-6\pm 3\%$ ) ist.

Das systolische  $Ca^{2+}_{nuc}$  der WT-Kardiomyozyten (Abb. 12 Ba) zeigt bei der Gabe von Iso einen schnellen Anstieg ( $+34\pm 4\%$  nach 5 min) und bleibt über den Beobachtungszeitraum auf diesem Niveau erhöht ( $+35\pm 9\%$  nach 20 min). Verglichen mit der Kontrollgruppe ( $+4\pm 4\%$  nach 20 min) ist die Wirkung von Iso signifikant. Ein deutlicher, signifikanter Anstieg ist auch bei Behandlung mit Iso und Dantrolen zu beobachten ( $+41\pm 11\%$  nach 20 min). Bei MCU KO-Kardiomyozyten steigert Iso das systolische nukleäre  $Ca^{2+}_{nuc}$ , wie im Zytoplasma bleibt es nach schnellem Anstieg über den Beobachtungszeitraum erhöht ( $+22\pm 8\%$  nach 20 min), jedoch nicht signifikant zur Kontrollgruppe ( $-6\pm 3\%$  nach 20 min) (Abb. 12 Ba). Die Behandlung mit Iso und Dantrolen führt zu einem Anstieg des systolischen nukleären  $Ca^{2+}_{nuc}$ , der etwas weniger deutlich und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant ausfällt ( $+11\pm 9\%$ ).

Zusammengefasst: Die Stimulation mit dem  $IP_3R$ -Agonisten AngII bei gleichzeitig gestörter mitochondrialer  $Ca^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 durch Dantrolen steigert das systolische  $Ca^{2+}_{nuc}$  in WT-Kardiomyozyten signifikant. Dieser Effekt zeigt sich bei den MCU KO-Kardiomyozyten nicht.

Der  $\beta$ -AR-Agonist Iso erhöht in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten das systolische nukleäre  $Ca^{2+}_{nuc}$ , wobei es – anders als im Zytoplasma – nach einem schnellen Anstieg im gesamten Beobachtungszeitraum erhöht bleibt. In der Kombination mit Dantrolen steigert Iso in den WT-Zellen das systolische  $Ca^{2+}_{nuc}$ . In den MCU KO-Zellen führt die



Behandlung mit Iso und Dantrolen hingegen nur zu einem geringen, nicht signifikanten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

### 3.5.2 Diastolisches Calcium im Kern

Nun wird das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  betrachtet, wenn nicht anders angegeben als  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min. Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  steigt bei Behandlung mit AngII in den WT-Kardiomyozyten um  $+37\pm 8\%$  und in der Kombination AngII+Dantrolen um  $+27\pm 5\%$  (Abb. 12 Bb). Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigt einen leichten Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  ( $+15\pm 5\%$ ), sodass sich kein signifikanter Unterschied zu den behandelten Gruppen ergibt. Die MCU KO-Zellen zeigen nach Gabe von AngII ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}} +10\pm 11\%$ ) wie auch nach AngII+Dantrolen ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}} +10\pm 8\%$ ) keine relevante Änderung der diastolischen Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}} +16\pm 15\%$ ) (Abb. 12 Bb). Einschränkend sei angemerkt, dass die Standardfehler der Mittelwert relativ hoch sind.

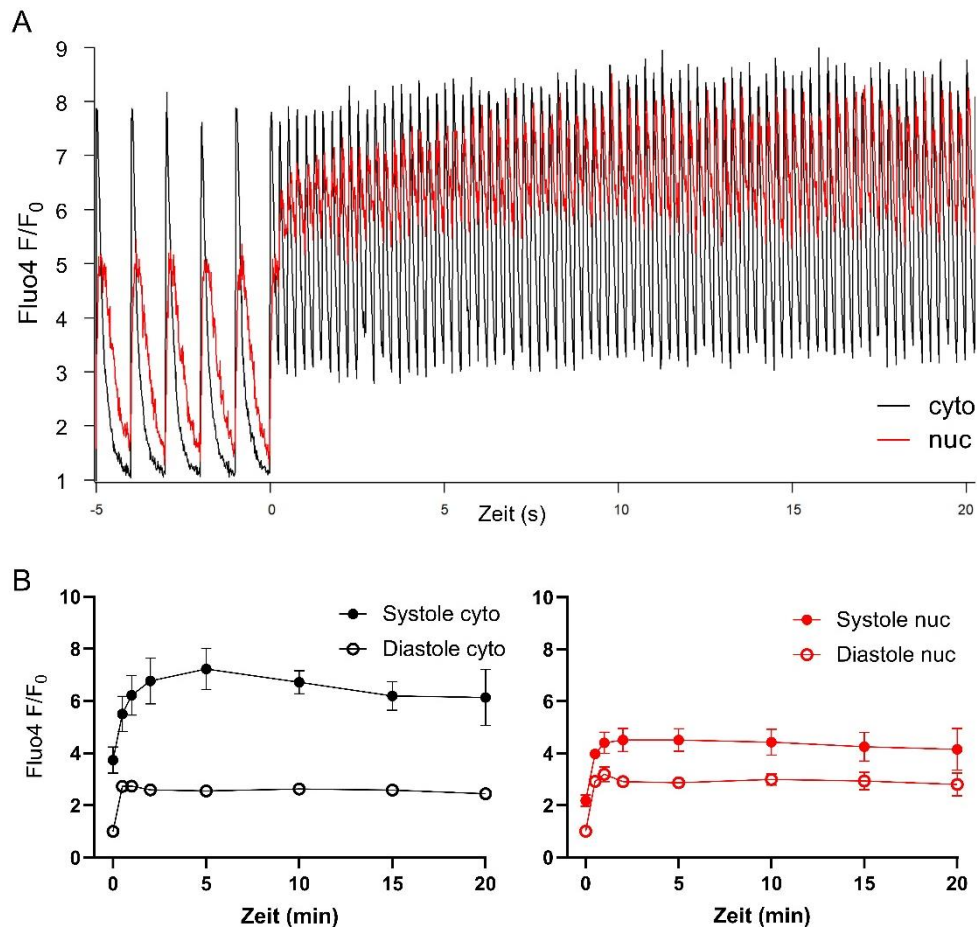
Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  zeigt bei WT- und MCU KO-Kardiomyozyten bei  $\beta$ -adrenerger Behandlung einen ähnlichen Verlauf (Abb. 12 Bb). In den wildtypischen Zellen steigt es durch Stimulation mit Iso kontinuierlich über 20 min um  $+27\pm 17\%$ , in den MCU KO-Zellen um  $32\%\pm 4\%$ . Bei zusätzlicher Gabe von Dantrolen bewirkt die Iso-Stimulation ebenfalls einen Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  von  $+30\pm 10\%$  in wildtypischen und  $+42\pm 15\%$  in MCU KO-Zellen. Jedoch steigt auch das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  in den Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe etwas an, mit  $+15\pm 6\%$  in den WT und mit  $+16\pm 14\%$  in den MCU KO-Zellen.

Die Messungen zeigen, dass das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  sowohl bei der Behandlung mit den  $\text{IP}_3\text{R}$ -Agonisten AngII als auch mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso tendenziell ansteigt. Jedoch steigt auch bei den unbehandelten Kontrollen das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  im Beobachtungszeitraum, sodass weder AngII noch Iso eine relevante Steigerung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  im Kern bewirken.

### 3.6 Steigerung der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz

In ersten Schritt wird der Wechsel der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz untersucht. Dabei wurden WT-Kardiomyozyten zunächst 5 min bei 1 Hz stimuliert, bis das systolische und diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  jeweils stabile Werte zeigte (steady-state). Dann wird die Frequenz von 1 Hz auf 4 Hz erhöht (Zeitpunkt 0 min) und zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 2, 5, 10, 15 und 20 min das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Abb. 13 A zeigt in einem Zeitabschnitt von 25 s beispielhaft den repräsentativen

Kurvenverlauf einer Zelle während des Frequenzwechsels. In Abb. 13 B sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzsignale in Zytosol (schwarz) und Kern (rot) dargestellt. Die Mittelwerte sind jeweils auf das diastolische Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min normiert ( $F/F_0$ ). Das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  verdoppelt sich innerhalb der ersten 5 min und fällt dann wieder leicht ab ( $F/F_0$  (0 min) von  $3,74 \pm 0,18$  auf Maximum  $F/F_0$  (5 min)  $7,22 \pm 0,24$ ). Dabei ist das systolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  nach 20 min Stimulation mit 4 Hz deutlich erhöht im Vergleich zum Ausgangswert bei 1 Hz ( $F/F_0$  (0 min)  $3,74 \pm 0,18$ ,  $F/F_0$  (20 min)  $6,14 \pm 0,25$ ). Noch stärker als das systolische steigt das diastolische  $Ca^{2+}_{cyto}$  an. Es erreicht sein Maximum schon nach 1 min (Maximum  $F/F_0$  (1 min)  $2,73 \pm 0,18$ ) und fällt dann leicht ab, sodass es nach 20 min Stimulation mit 4 Hz weiterhin mehr als das Doppelte des Ausgangswerts bei 1 Hz beträgt ( $F/F_0$  (20 min)  $2,44 \pm 0,17$ ).



**Abbildung 13: Verlauf des zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten von WT-Mäusen mit Frequenzerhöhung von 1 Hz auf 4 Hz**

Die Zellen wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM beladen und in einem elektrischen Feld stimuliert. Dabei wird zunächst für 5 min mit 1 Hz (hier nicht dargestellt) stimuliert, bis das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal stabil war. Dann wird auf 4 Hz Stimulationsfrequenz umgestellt (Zeitpunkt 0 min). A Repräsentativer Kurvenverlauf der konfokalmikroskopischen Messung einer Zelle über 25 s. Das in B dargestellte Fluoreszenzsignal  $F/F_0$ , mit  $F_0$  definiert als diastolisches Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min, ist der Mittelwert  $\pm$ SEM des diastolischen bzw. systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von 4 Zellen im Zytosol (cyto, schwarz) und im Kern (nuc, rot).

Abkürzungen: SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

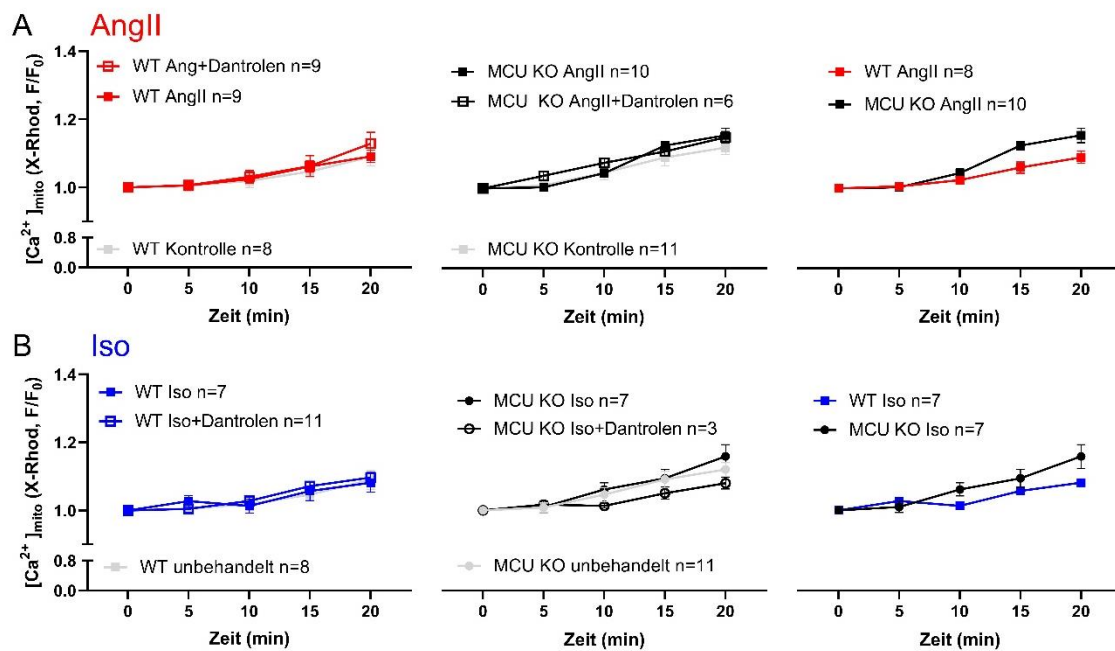
Der Verlauf von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  hat eine ähnliche Dynamik. Das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  verdoppelt sich nach dem Frequenzwechsel und erreicht nach 2 min sein Maximum ( $F/F_0$  (0 min) von  $2,18 \pm 0,14$  auf Maximum  $F/F_0$  (2 min)  $4,5 \pm 0,23$ ). Danach fällt es nur leicht ab, um nach 20 min Stimulation bei 4 Hz deutlich über dem Ausgangswert bei 1 Hz zu bleiben ( $F/F_0$  (0 min) von  $2,18 \pm 0,14$ ,  $F/F_0$  (20 min)  $4,15 \pm 0,26$ ). Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  steigt innerhalb der ersten Minute auf mehr als das 3-fache ( $F/F_0$  (1 min)  $3,2 \pm 0,23$ ) und sinkt über 20 min nur wenig. Nach 20 min Stimulation mit 4 Hz ist es stabil, gegenüber dem Ausgangswert auf deutlich höherem Niveau ( $F/F_0$  (20 min)  $2,8 \pm 0,24$ ).

Nach Wechsel der elektrischen Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz ließ sich ein neues, deutlich erhöhtes Level der zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale

beobachten. Die stärkste Steigerung zeigte dabei das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal im Kern. Vor diesem Hintergrund wurden im nächsten Schritt die bereits beschriebenen Experimente mit 1 Hz Stimulationsfrequenz noch einmal mit 4 Hz Stimulationsfrequenz durchgeführt. Wichtig ist, dass die Zellen (wie in Abschnitt 2.4.3 Messprotokoll beschrieben) vor Messbeginn bereits einige min mit 4 Hz stimuliert wurden, bevor zum Messzeitpunkt 0 min die jeweils beschriebene Behandlung mit AngII oder Iso begonnen wurde.

### **3.7 Mitochondriale Calciumaufnahme bei 4 Hz Stimulation**

Nach der Betrachtung des Frequenzwechsels soll im nächsten Schritt die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei 4 Hz untersucht werden. Dafür wurden Kardiomyozyten aus WT- und MCU KO-Mäusen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1 gefärbt. Die Kardiomyozyten wurden in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit AngII oder Iso stimuliert (2.4.3 Messprotokoll). Die Messungen erfolgten bei elektrischer Feldstimulation mit 4 Hz, die einige min vor Messbeginn gestartet wurde. Pro Gruppe wurden mehrere Zellen (Anzahl n der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen gemessen. In Abb. 14 werden die normalisierten Fluoreszenzsignale  $F/F_0$  mit  $F_0$  definiert als Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min zu den Messzeitpunkten 5, 10, 15 und 20 min dargestellt.



**Abbildung 14: Mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten bei 4 Hz Stimulation**

Ventrikuläre Kardiomyozyten von WT- und MCU KO-Mäusen wurden zur Messung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff X-Rhod-1/AM beladen, in einem elektrischen Feld mit 1 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt unbehandelt, mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert A, mit dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor-Agonisten Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) B stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII A oder Iso B stimuliert. Das dargestellte Fluoreszenzsignal  $F/F_0$  mit  $F_0$  definiert als Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt 0 min, spiegelt das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  zu den angegebenen Messzeitpunkten wider. Mittelwerte  $\pm$ SEM der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme von WT-Myozyten (links) und MCU KO-Myozyten (mittig) bzw. deren Vergleich (rechts). Abkürzungen: AngII = Angiotensin II, Iso = Isoproterenol, MCU KO = Knock-out des Mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

Im Folgenden werden, wenn nicht anders angegeben, die Werte für  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  zum Zeitpunkt 20 min betrachtet. Der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonist AngII führt in den WT-Myozyten zu einem leichten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  ( $+9 \pm 2\%$ , Abb. 14 A), der sich nicht vom Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  der Kontrollgruppe unterscheidet ( $+9 \pm 3\%$ ). Die Kombination AngII+Dantrolen, also  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Stimulation bei gleichzeitiger Blockade des mRyR1 steigert das  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  ähnlich stark ( $+13 \pm 3\%$ ), es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen. Bei den MCU KO-Myozyten zeigen sich ähnliche Effekte mit noch geringeren Unterschieden zwischen den Gruppen. AngII steigert  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  um  $16 \pm 2\%$ , AngII+Dantrolen um  $15 \pm 1\%$  und bei der unbehandelten Kontrollgruppe steigt  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  um  $12 \pm 2\%$ . Wie in Abb. 14 A rechts dargestellt, zeigt sich kein Unterschied des AngII-Effekts zwischen WT- und MCU KO-Zellen.

Die Behandlung der WT-Myozyten mit dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor-Agonisten Iso steigert  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  leicht ( $+8 \pm 3\%$ ) (Abb. 14 B), genauso auch in Kombination mit Dantrolen

(+10±2%), wobei sich auch hier kein relevanter Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe ergibt (+9±3%).

In den MCU KO-Myozyten nimmt das  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  unter Behandlung mit Iso zu (+16±1%), ebenso unter Iso + Dantrolen (+8±2%), wobei auch hier kein wesentlicher Unterschied zur Kontrollgruppe besteht (+12±2%). Vergleicht man den Iso-Effekt in WT- und MCU KO-Zellen, ergibt sich kein relevanter Unterschied (Abb. 14 B rechts).

Bei 4 Hz Stimulation kommt es über den Beobachtungszeitraum von 20 min zu einem leichten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  in den unbehandelten Kontrollgruppen von WT- und MCU KO-Kardiomyozyten. Die  $\text{IP}_3$ -R-Stimulation mit AngII führt – anders als bei 1 Hz – weder bei WT- noch bei MCU KO-Kardiomyozyten zu einem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation bewirkt keinen weiteren Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$ . Die jeweilige Zugabe des mRyR1-Antagonisten Dantrolen verändert die Ergebnisse nicht relevant.

### **3.8 Zytosolische und nukleäre Calciumtransienten bei 4 Hz**

#### **Stimulation**

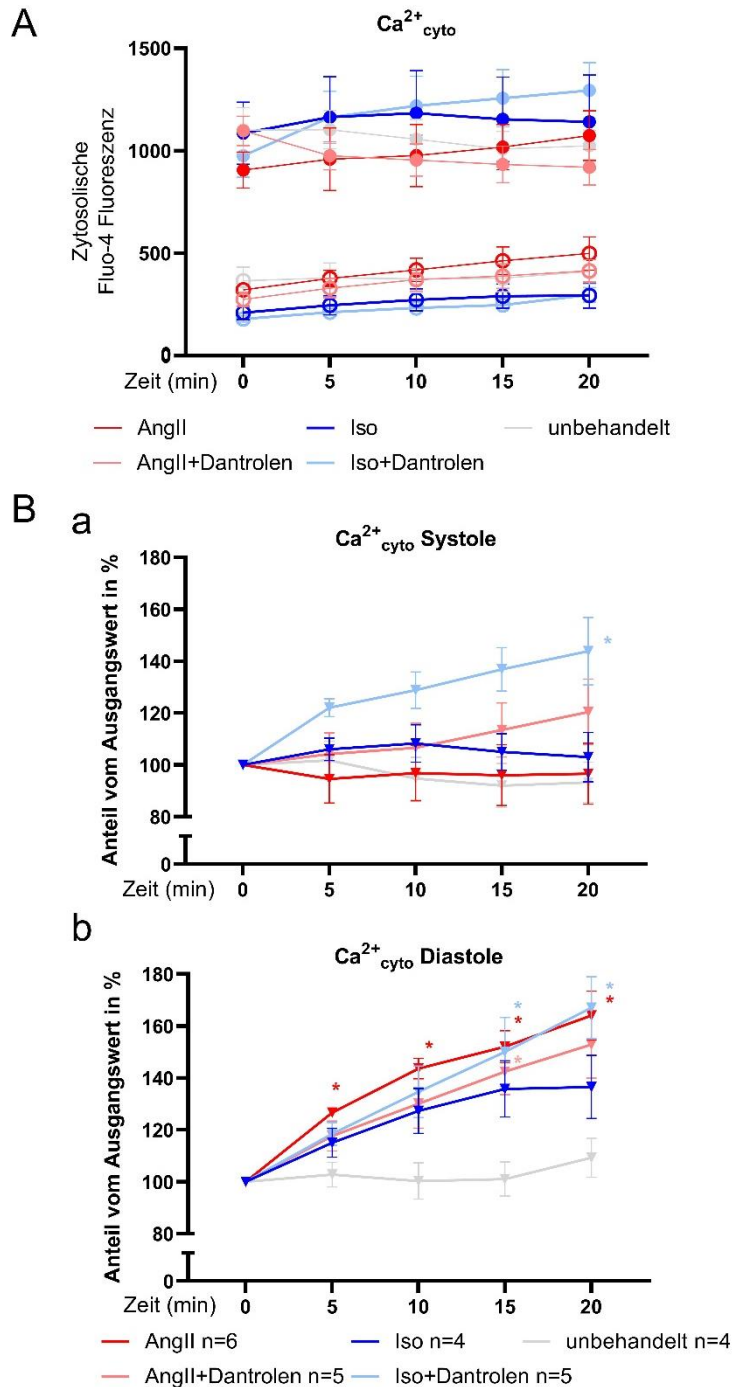
Die Messung der zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wird bei 1 Hz Stimulationsfrequenz an Kardiomyozyten sowohl aus WT- als auch aus MCU KO-Mäusen durchgeführt. Dieses Vorgehen basierte auf der Beobachtung, dass sich bei 1 Hz das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  aufgrund der Behandlung mit dem  $\text{IP}_3$ -R-Agonisten AngII bzw.  $\beta$ -adrenerger Stimulation veränderte und sich daran die Frage anschloss, wie die mitochondriale Veränderung sich auf Zytosol und Kern auswirken würde. Bei 4 Hz Stimulationsfrequenz konnte – wie in 3.7 Mitochondriale Calciumaufnahme bei 4 Hz Stimulation beschrieben – keine signifikanten Veränderungen des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden. Diese Beobachtung führte, gemeinsam mit der Abwägung, die Anzahl der notwendigen Mäuse gering zu halten, zu einem Verzicht der Messung der zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei Kardiomyozyten aus MCU KO-Mäusen. Im Folgenden werden dementsprechend die Ergebnisse der zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von wildtypischen Kardiomyozyten bei 4 Hz Stimulation besprochen.

Die Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 AM (2.4.4 Messung von zytosolischen und nukleären Calciumtransienten). Die Kardiomyozyten der WT-Mäuse wurden in einem elektrischen Feld mit 4 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII stimuliert, mit dem

$\beta$ -adrenergen Rezeptor-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen mit AngII oder Iso stimuliert (2.4.3 Messprotokoll). Pro Gruppe wurden mehrere Zellen (Anzahl n der Zellen pro Gruppe) aus mindestens 3 Mäusen gemessen. Im Folgenden werden zuerst die zytosolischen, dann die nukleären Daten betrachtet.

### **3.8.1 Zytosolische Calciumtransienten bei 4 Hz Stimulation**

Abb. 15 A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. In Abb. 15 B sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  (% vom Ausgangswert) im Beobachtungszeitraum über 20 min dargestellt (3.2. Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern). Dabei finden sich unter Ba die systolischen und unter Bb die diastolischen Werte.



**Abbildung 15: Zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten von WT-Mäusen bei 4 Hz**  
 Die Zellen wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 beladen, in einem elektrischen Feld mit 4 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert, mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des  $\text{mRyR1}$ -Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII oder Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) stimuliert. A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. B zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  (% vom Ausgangswert) über 20 min von n Zellen pro Gruppe, Ba systolische und Bb diastolische Werte. \*(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT unbehandelt, #(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT AngII, \*(blau)  $p < 0.05$  WT Iso vs. WT unbehandelt, \*(hellblau)  $p < 0.05$  WT Iso+Dantrolen vs. WT unbehandelt, #(blau)  $p < 0.05$  MCU KO Iso vs. MCU KO unbehandelt (Statistik: two-way-ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).  
 Abkürzungen: AngII = Angiotensin II,  $\beta$ -AR =  $\beta$ -adrenerger Rezeptor, Iso = Isoproterenol, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

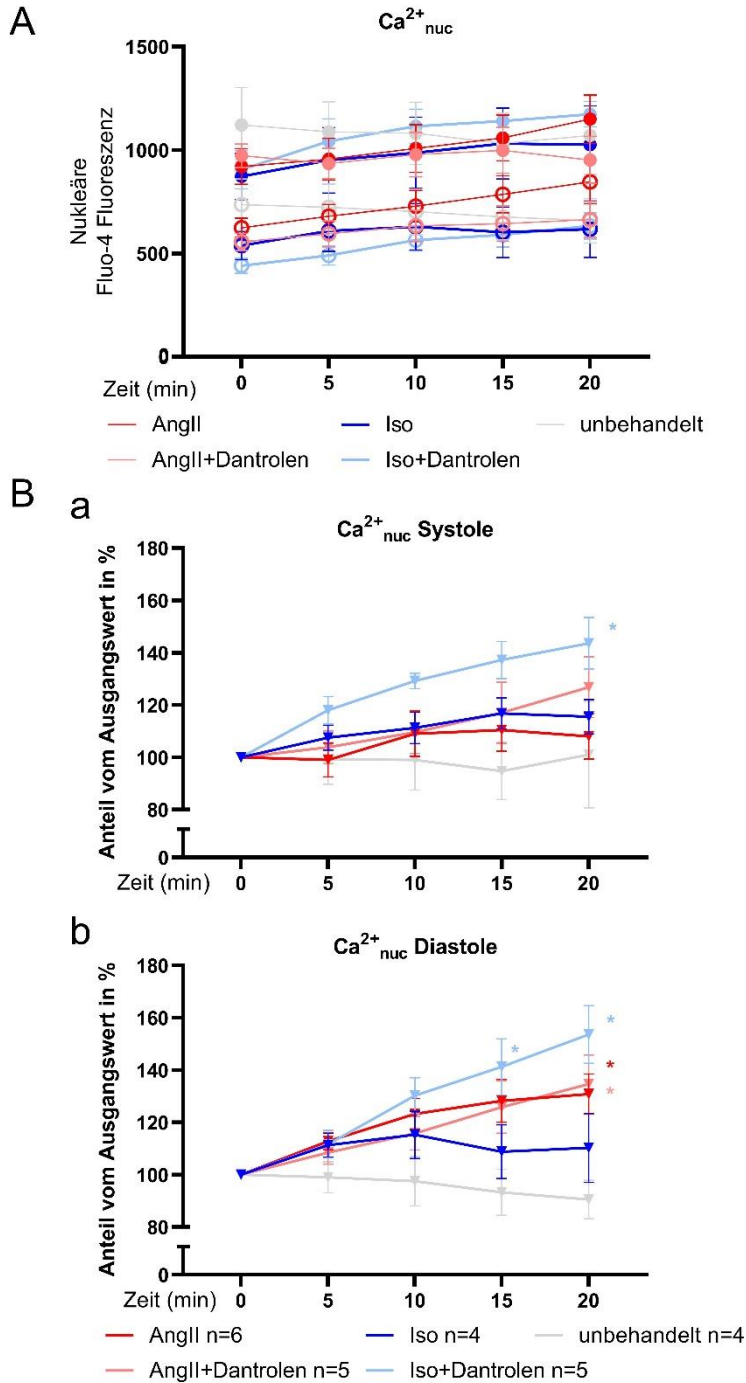


Im Folgenden wird, wenn nicht anders angegeben,  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min betrachtet. Im Zytosol nimmt das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  (Abb. 15 Ba) unter AngII leicht ab ( $-12\pm 10\%$ ), genauso bei der unbehandelten Kontrollgruppe ( $-7\pm 7\%$ ). AngII+Dantrolen führt zu einer geringen Steigerung ( $+12\pm 5\%$ ). Im Vergleich zu Kontroll- bzw. AngII-Gruppe ist diese allerdings nicht signifikant. Iso hat keinen relevanten Effekt auf das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  ( $3\pm 7\%$ ). Iso+Dantrolen steigert das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  ( $+32\pm 12\%$ ) signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Zytosol steigern sowohl AngII als auch AngII+Dantrolen das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$ , um  $+64\pm 9\%$  (AngII) bzw.  $+52\pm 9\%$  (AngII+Dantrolen) (Abb. 15 Bb). Im Vergleich zur Kontrollgruppe  $+9\pm 7\%$  ist der Effekt von AngII zu allen Messzeitpunkten signifikant, für AngII+Dantrolen nur für den Zeitpunkt 15 min. Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  wird durch Iso gesteigert ( $37\pm 12\%$ ). Noch deutlicher fällt die Steigerung bei Behandlung durch Iso+Dantrolen aus ( $67\pm 12\%$ ), welche nach 20 min signifikant höher als bei der unbehandelten Kontrollgruppe ist.

### **3.8.2 Nukleäre Calciumtransienten bei 4 Hz Stimulation**

Abb. 16 A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. In Abb. 16 B sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  (% vom Ausgangswert) im Beobachtungszeitraum über 20 min dargestellt (3.2. Auswertung der Calciumtransienten in Zytosol und Kern). Dabei finden sich unter Ba die systolischen und unter Bb die diastolischen Werte.



**Abbildung 16: Nukleäres  $Ca^{2+}$ -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten von WT-Mäusen bei 4 Hz**

Die Zellen wurden mit dem  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 beladen, in einem elektrischen Feld mit 4 Hz stimuliert und entweder als Kontrollgruppe nicht behandelt (unbehandelt), mit dem  $IP_3$ -Rezeptor-Agonisten AngII ( $2 \mu\text{mol/l}$ ) stimuliert, mit dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor-Agonisten Iso ( $500 \text{ nmol/l}$ ) stimuliert oder nach vorheriger Inkubation des mRyR1-Antagonisten Dantrolen ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) mit AngII oder Iso stimuliert. A zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM der diastolischen bzw. systolischen Fluoreszenzwerte. B zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SEM von  $Ca^{2+}_{nuc}$  (% vom Ausgangswert) über 20 min von n Zellen pro Gruppe, Ba systolische und Bb diastolische Werte. \*(rosa)  $p < 0.05$  WT AngII+Dantrolen vs. WT unbehandelt, \*(rot)  $p < 0.05$  WT AngII vs. WT unbehandelt, \*(hellblau)  $p < 0.05$  WT Iso+Dantrolen vs. WT unbehandelt, (Statistik: two-way-ANOVA, Tukey's multiple comparisons test).

Abkürzungen: AngII = Angiotensin II, Iso = Isoproterenol, SEM = standard error of mean (deutsch: Standardfehler), WT = Wildtyp.

Im Folgenden wird, wenn nicht anders angegeben,  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  (% vom Ausgangswert) zum Zeitpunkt 20 min betrachtet. Das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  steigt bei Behandlung der Zellen mit Iso gering an, wobei die Zunahme  $+16\pm 7\%$  beträgt und damit nicht signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 16 Ba). Die Behandlung mit Iso+Dantrolen steigert – wie im Zytosol – das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  deutlich ( $+41\pm 10\%$ ) und zum Zeitpunkt 20 min signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $+1\pm 10\%$ ). Weder AngII noch AngII+Dantrolen ( $+27\pm 12\%$ ) steigern das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

Das diastolische Fluoreszenzsignal im Kern wird durch die Behandlung mit AngII ( $+31\pm 8\%$ ) und mit AngII+Dantrolen ( $+35\pm 8\%$ ) gesteigert (Abb. 16 Bb). Der Effekt ist im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $-9\pm 7\%$ ) zum Zeitpunkt 20 min für beide Gruppen signifikant. Die Behandlung mit Iso+Dantrolen steigert das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  ( $+54\pm 11\%$ ) ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei die Behandlung mit Iso zu keiner relevanten Steigerung führt ( $+10\pm 13\%$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei 4 Hz Stimulationsfrequenz der  $\text{IP}_3\text{R}$ -Agonist AngII das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  steigert. Wird zusätzlich zur Behandlung mit AngII der mRyR1-Blocker Dantrolen gegeben, fällt die Steigerung der diastolischen Werte vergleichbar aus. Weder AngII noch AngII+Dantrolen verändern die systolischen Werte für  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  bei 4 Hz signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Effekt der  $\beta$ -adrenergen Stimulation bei 4 Hz Stimulation lässt sich somit folgendermaßen zusammenfassen: Iso steigert das systolische und diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  in geringem Maße, der Effekt ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Die Behandlung mit Iso+Dantrolen steigert die systolischen wie auch die diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Zytosol und Kern signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Effekt von Iso+Dantrolen ist jedoch im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Iso nicht signifikant.

### **3.9 Arrhythmische Kontraktionsmuster bei 4 Hz**

In der Gesamtschau der Versuche, bei denen Kardiomyozyten mit 4 Hz stimuliert wurden, zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von arrhythmisch kontrahierenden und teilweise in der Folge instabilen Zellen in der WT-Gruppe. Instabil bedeutet hier, dass eine Zelle nach einer arrhythmischen Phase nur noch vereinzelte oder keine Kontraktionen mehr zeigt. Alle Arrhythmien oder Instabilitäten der Zellen wurden

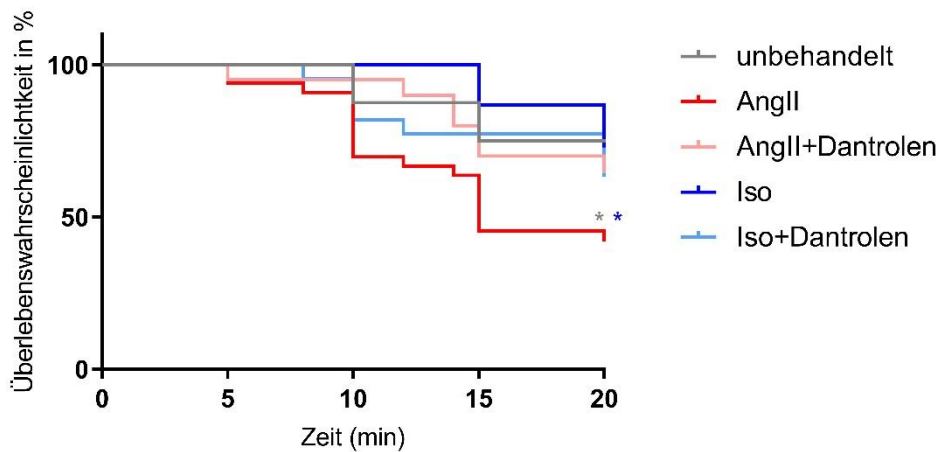
während der Stimulation mit 4 Hz beobachtet. Die Messungen der arrhythmischen oder instabilen Zellen flossen nicht mit in die Auswertung ein. Die Tab. 23 gibt einen Überblick über die Anzahl der arrhythmischen oder instabilen Zellen der WT-Gruppe bei 4 Hz Stimulation. Auffällig ist, dass bei den mit AngII behandelten Zellen mehr als die Hälfte arrhythmisch/instabil wurde, während bei den anderen Gruppen ein etwas geringerer Anteil betroffen war. Am niedrigsten lag der Anteil bei den unbehandelten Kontrollen (25%), bei Gabe von Iso waren 27% der Zellen betroffen. Im Vergleich dazu wurde bei den MCU KO-Kardiomyozyten bei 4 Hz Stimulation (Messung von  $Ca^{2+}_{mito}$ , siehe 3.7 Mitochondriale Calciumaufnahme bei 4 Hz Stimulation) über alle Behandlungsgruppen hinweg keine arrhythmische Zelle beobachtet. Bei 1 Hz Stimulationsfrequenz waren nur einige wenige arrhythmische Zellen zu beobachten, ohne Unterschied zwischen WT- und MCU KO-Kardiomyozyten. In der Tabelle ist der Zeitpunkt des Auftretens der Arrhythmie/Instabilität angegeben (gemessene Zeit ab Start der Messungen bei Zeitpunkt 0 min, siehe 2.4.3 Messprotokoll). Im Durchschnitt lag der Zeitpunkt des Auftretens der Arrhythmie/Instabilität über alle Gruppen hinweg bei  $13 \pm 0,7$  min (Mittelwert  $\pm$ Standardfehler). Zwischen den Gruppen gab es hinsichtlich des Zeitpunkts kaum Unterschiede, wie in der Tabelle ersichtlich wird. Lediglich bei der Behandlungsgruppe Iso traten die Arrhythmien/Instabilität nach durchschnittlich  $17,5 \pm 1,3$  min und damit etwas später als bei den anderen Gruppen auf.

Tabelle 23: Arrhythmische oder instabile Zellen der WT-Gruppe bei 4 Hz Stimulationsfrequenz

Behandlungsgruppen mit Anzahl gemessener Zellen n	Anzahl arrhythmisch/instabiler Zellen	Anteil arrhythmische Zellen/ Gesamtzahl n	Zeitpunkt Auftreten Arrhythmie in min (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)
unbehandelt n=16	4	25%	$11,7 \pm 1,4$
AngII n=33	19	58%	$11,6 \pm 0,9$
AngII+Dantrolen n=20	7	35%	$13,8 \pm 1,8$
Iso n=15	4	27%	$17,5 \pm 1,3$
Iso+Dantrolen n=22	8	36%	$13,6 \pm 1,8$
Gesamt n=106	42	40%	$13,0 \pm 0,7$

Die Abb. 17 zeigt eine Kaplan-Meier-Kurve zum Auftreten von Arrhythmien und instabilen Kontraktionsmustern innerhalb der Beobachtungszeit von 20 min, aufgeschlüsselt nach den fünf Behandlungsgruppen. Die Anzahl an Kardiomyozyten pro Behandlungsgruppe ist in Tab. 23 aufgeführt. Die Arrhythmien und instabilen

Kontraktionsmuster traten insbesondere ab dem Messzeitpunkt 10 min auf. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den Gruppen AngII gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe sowie zwischen AngII gegenüber Iso.



**Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve zum Auftreten von arrhythmischen/instabilen Kardiomyozyten in der WT-Gruppe**

Die Messungen der WT-Gruppe fanden in fünf Behandlungsgruppe statt. Hier wird das Auftreten von Arrhythmien und instabilen Kontraktionsmustern bei Kardiomyozyten innerhalb der Beobachtungszeit von 20 min für die verschiedenen Behandlungsgruppen als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Als überlebende Kardiomyozyten werden hier die rhythmisch kontrahierenden Zellen gezählt gegenüber den arrhythmischen/instabilen/toten Zellen.

\* (grau)  $p < 0.05$  AngII vs. unbehandelt, \* (blau)  $p < 0.05$  AngII vs. Iso (Log-rank (Mantel-Cox) test).

Abkürzungen: AngII = Angiotensin II, Iso = Isoproterenol, WT = Wildtyp

## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme auf die zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten untersuchen. Dabei lag der Fokus auf dem  $\text{IP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel. Als Vergleich wurde der  $\beta$ -adrenerg vermittelte,  $\text{IP}_3$ -unabhängige Effekt auf die zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten herangezogen. Um einer vermuteten Frequenzabhängigkeit nachzugehen, wurden die Effekte bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen untersucht. Dazu erfolgten konfokalmikroskopische Messungen der zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  an intakten ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Mäusen.

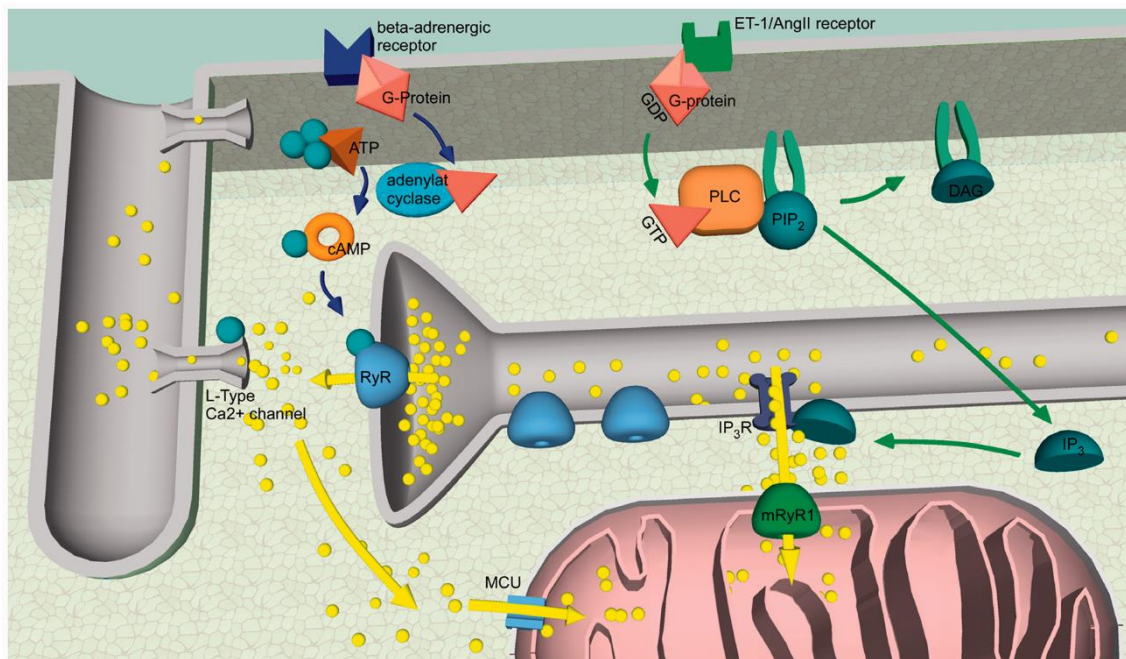
### 4.1 Zusammenfassung

Bei 1 Hz Stimulationsfrequenz steigerte AngII in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, welche durch Blockade des mRyR1 mit Dantrolen signifikant abgeschwächt wurde (Übersicht der intrazellulären Signalwege Abb. 18). Als Folge der gestörten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme kam es in den WT-Zellen zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Zellkern (Abb. 19). Bei 4 Hz Stimulationsfrequenz war dieser Effekt im Vergleich zu 1 Hz abgeschwächt: die relative, AngII-induzierte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme war bei 4 Hz geringer. Entsprechend stiegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Zellkern als Folge der Blockade des mRyR1 weniger stark an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der hohen Stimulationsfrequenz bereits eine deutliche mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  Akkumulation auftrat, da der Export von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Mitochondrien über den NCLX wesentlich langsamer erfolgte als die Aufnahme über den MCU oder RyR1. Deshalb hat eine hohe Stimulationsfrequenz einen wesentlichen Einfluss auf die steady-state  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  (Maack et al., 2006). In dieser Situation hat der AngII-induzierte  $\text{IP}_3$ -mRyR1-Signalweg eine wesentlich geringere Fähigkeit, diese mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation weiter zu steigern, während bei 1 Hz der Einfluss der hormonellen Stimulation größer ist. Die physiologische Relevanz der  $\text{IP}_3$ -Stimulation bei 4 Hz wird noch in Kapitel 4.5.4 diskutiert werden.

Im nächsten Schritt wurde mit dem  $\beta$ -AR-Agonisten Iso stimuliert. Iso steigerte die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in WT-Kardiomyozyten, nicht aber in MCU KO-Kardiomyozyten. Damit schwächte die Blockade des MCU die Iso-induzierte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme signifikant ab. Hingegen war der Iso-Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern ohne signifikanten Unterschied zwischen WT- und

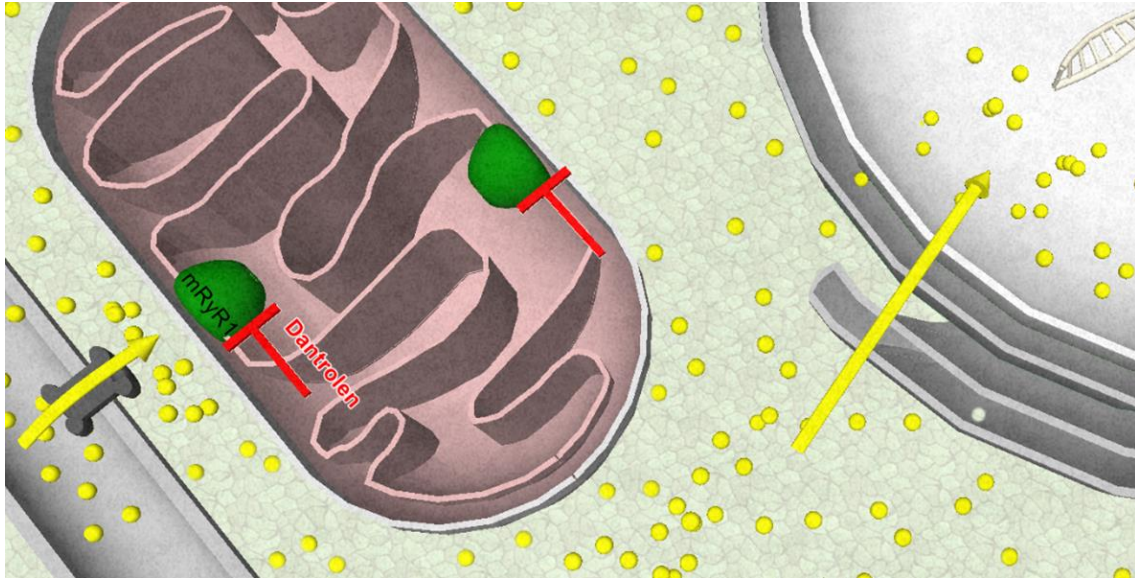
MCU KO-Zellen: In beiden Gruppen steigerte Iso die systolischen Spitzenwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Diskussion dazu auch 4.3  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Blockade der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unterschiedlich auf den nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auswirkt: Bei Stimulation mit dem AngII, welches AT1-R- vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, kam es in Folge der Blockade des mRyR1, nicht aber des MCU, zur Steigerung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in zellulären Kompartimenten unterschiedlich beeinflusst.  $\beta$ -AR-Agonisten hingegen zeigten keinen spezifischen kompartimentalisierten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 11 und 12). Entsprechend veränderte die Blockade des MCU oder des mRyR1 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation nicht signifikant.



**Abbildung 18: Übersicht intrazellulärer Signalwege**

Die Bindung von Isoproterenol an den  $\beta$ -T ET-1/AngII an seinen membranständigen Rezeptor führt zu über Spaltung von  $\text{PIP}_2$  zu einer gesteigerten  $\text{IP}_3$ -Konzentration in der Zelle. Durch Aktivierung des  $\text{IP}_3\text{R}$  wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt und über den mRyR1 in die Mitochondrien aufgenommen. Legende: Gelbe Kreise:  $\text{Ca}^{2+}$ , Grüne Kreise: Phosphat. Abkürzungen: AngII = Angiotensin II, ATP = Adenosintri-phosphat, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, DAG = Diacylglycerin, GDP/GTP = Guanodin-di/tri-phosphat,  $\text{IP}_3$  = Inositol-1,4,5-tri-phosphat,  $\text{IP}_3\text{R}$  = Inositol-1,4,5-tri-phosphat-Rezeptor, MCU = Mitochondrialer  $\text{sCa}^{2+}$ -Uniporter, mRyR1 = mitochondrialer Ryanodin-Rezeptor 1,  $\text{PIP}_2$  = Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PLC = Phospholipase C, RyR Ryanodin-Rezeptor. Abbildung mit Genehmigung der Oxford University Press nach (Seidlmayer et al., 2016) © 2016 European Society of Cardiology.



**Abbildung 19: Effekt von Dantrolen auf den intrazellulären Calciumstoffwechsel**  
 Dantrolen blockiert die IP<sub>3</sub>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme über den mRyR1 ins Mitochondrium. Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol und nachfolgend im Kern steigt. Legende: Gelbe Kreise: Ca<sup>2+</sup>. Abkürzungen: IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; mRyR1 = mitochondrialer Ryanodin-Rezeptor 1.  
 Adaptiert nach (Leucht, 2019).

## 4.2 Stimulation mit dem IP<sub>3</sub>R-Agonisten Angiotensin II bei gestörter mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme

AngII, welches AT<sub>1</sub>-R-vermittelt die IP<sub>3</sub>-Konzentration steigert, führte über 20 min zu einer kontinuierlichen mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, die durch dem mRyR1-Blocker Dantrolen signifikant abgeschwächt werden konnte. Diese Beobachtung ließ sich sowohl bei WT- als auch bei MCU KO-Kardiomyozyten machen, die mit 1 Hz stimuliert wurden (Abb. 10). Das steht im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe von Seidlmayer et al. Diese zeigten an ruhenden und mit 0,5 Hz elektrisch stimulierten murinen Kardiomyozyten, dass die Stimulation mit ET-1 oder AngII IP<sub>3</sub>-vermittelt zu einem Anstieg des Ca<sup>2+</sup><sub>mito</sub> und einer Steigerung des ATP-Gehalts führt IP<sub>3</sub>-mRyR1-Weg (Abb. 18). Diese Effekte konnten durch Blockade des mRyR1, nicht aber durch Blockade des MCU abgeschwächt werden (Seidlmayer et al., 2016). Somit bestärken die vorliegenden Ergebnisse die Relevanz des von Seidlmayer et al. postulierten IP<sub>3</sub>-mRyR1-Wegs auch für eine Stimulationsfrequenz mit 1 Hz.

Nach dem mitochondrialen Ca<sup>2+</sup> betrachtete die Arbeit als nächstes die Ca<sup>2+</sup>-Transienten in Zytosol und Kern. Hier resultierte die Stimulation mit AngII in WT-Kardiomyozyten in einem deutlichen, kontinuierlichen Anstieg des diastolischen Ca<sup>2+</sup><sub>cyto</sub> und Ca<sup>2+</sup><sub>nuc</sub> über 20 min, der in Zytosol und Kern mit 37±9% bzw. 37±8 % gleich stark ausfiel (Abb. 11 und 12, verglichen mit dem Ausgangswert vor Stimulation mit AngII). Etwas weniger



stark steigerte AngII das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  ( $17\pm 8\%$  bzw.  $24\pm 8\%$ ), verglichen mit dem Ausgangswert vor Stimulation mit AngII. Der im Verhältnis gesehen stärkere Effekt auf das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  findet sich vergleichbar auch in der Literatur. Ljubojevic et al. verglichen die Kardiomyozyten von Mäusen nach 7-wöchiger kardialer Druckbelastung mit einer Kontrollgruppe und zeigten, dass in beiden Gruppen unter AngII-Stimulation das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  stärker zunimmt als das systolische  $\text{Ca}^{2+}$  (Ljubojevic et al., 2014). Auch in einer anderen Untersuchung bewirkte die längerfristige AngII-Behandlung von Mäusen über 4 Wochen insbesondere einen Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  (Olivares-Florez et al., 2018). Beide Studien zeigten außerdem, dass AngII das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  im Kern stärker steigert als im Zytosol (Olivares-Florez et al., 2018, Ljubojevic et al., 2014). Diese Effekt konnte auch in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, wobei eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde: Bei höherer AngII-Konzentration ( $3 \mu\text{mol/l}$ ) stieg der nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient stärker als der zytosolische, wohingegen bei  $2 \mu\text{mol/l}$  der Anstieg in Zytoplasma und Kern gleichmäßig ausfiel (Leucht, 2019). Für die hier untersuchte Fragestellung sollte AngII einerseits die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern etwa gleich stark erhöhen, also keinen überproportionalen Anstieg im Kern verursachen, und andererseits eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aktivieren (wie in (Seidlmayer et al., 2016) gezeigt). Aus diesem Grund wurde für die Experimente der vorliegenden Arbeit AngII in einer Konzentration von  $2 \mu\text{mol/l}$  verwendet und in den Ergebnissen zeigte sich auch ein gleich starker Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  (Abb. 11 und 12).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die gestörte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 bei AngII-Stimulation auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auswirkt. Dafür erfolgte die AngII-Stimulation bei gleichzeitiger Blockade des mRyR1 mit Dantrolen. Dabei ließen sich veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in WT-Kardiomyozyten beobachten: Die systolischen Spitzenwerte stiegen unter AngII+Dantrolen deutlich gegenüber AngII bzw. den Kontrollen an (Abb. 11 und 12). Dabei war der Anstieg im Zytosol ( $+79\pm 12\%$ ) etwas höher als im Kern ( $+55\pm 11\%$ ). Das ist in Einklang mit der Überlegung, dass AngII-induziert  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt wird, welches wegen der mRyR1-Blockade aber nicht in Mitochondrien aufgenommen werden kann und somit in größerer Menge im Zytosol zur Verfügung steht. In der Folge nimmt der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient zu und – da der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient über die passive Komponente der maßgebliche Einflussfaktor ist – auch der nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient (Abb. 18 und 1.6 Nukleärer Calciumtransient). Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  unter AngII+Dantrolen veränderte sich hingegen nicht signifikant im Vergleich zur AngII

(Abb. 11 und 12). Entsprechend nahm insgesamt die Amplitude von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  unter AngII+Dantrolen zu. Mit diesen Ergebnissen konnte die Hypothese bestätigt werden, dass eine gestörte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 bei AngII-Stimulation die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern von murinen Kardiomyozyten signifikant beeinflusst. Das untermauert die Bedeutung der  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung für die Kontrolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in zellulären Kompartimenten. Ein möglicher Zusammenhang der Beobachtungen dieser Arbeit mit der Regulation pro-hypertropher Genexpression wird als Ausblick aufgeworfen (5. Ausblick).

### **Vergleich des Angiotensin II-Effekts in MCU KO- und WT-Kardiomyozyten**

In den MCU KO-Kardiomyozyten ließ sich bei AngII-Stimulation – wie in den WT-Zellen – ein signifikanter Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  beobachten, der durch den mRyR1-Blocker Dantrolen signifikant abgeschwächt wurde (Abb. 10). Wie bei den WT-Zellen steht diese Beobachtung im Einklang zu Ergebnissen von Seidlmayer et al., bei denen Dantrolen, nicht aber der MCU-Blocker Ru360, die AngII-induzierte  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme verhinderte (Seidlmayer et al., 2016). Insgesamt scheint der AngII-Effekt auf die Kardiomyozyten mit MCU KO jedoch etwas geringer ausgeprägt als auf die Kardiomyozyten mit MCU WT: Im Vergleich zu den WT-Zellen fällt der AngII-induzierte Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  etwas (wenn auch nicht signifikant) geringer aus ( $41 \pm 5\%$  WT,  $21 \pm 4$  MCU KO,  $p=0.12$ , ns, Abb. 10), jeweils verglichen mit dem Ausgangswert vor Stimulation mit AngII. Auch der AngII-induzierte Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den MCU KO-Zellen fällt verglichen mit den WT-Zellen weniger stark aus (Abb. 10). Des Weiteren zeigen sich bei den MCU KO-Zellen – anders als bei den WT-Zellen – keine deutlichen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, wenn zusätzlich zur AngII-Stimulation die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 durch Dantrolen geblockt wird (Abb. 10).

Die Beobachtung eines schwächeren AngII-Effekts in den MCU KO-Kardiomyozyten führt zu dem Gedanken, ob der  $\text{IP}_3$ -Signalweg in Kardiomyozyten mit MCU KO weniger Einfluss hat als in Zellen mit MCU WT. So könnte analog zu dem verringerten MCU-Proteinlevel auch weniger  $\text{IP}_3\text{R}$  exprimiert werden, sodass die Signalwege verhältnismäßig ausgeglichen wären. Um diese noch spekulative Überlegung zu verfolgen, wäre es interessant, das Expressionslevel von  $\text{IP}_3\text{R}$  in MCU KO- und WT-Zellen zu vergleichen.

Eine zweiter Erklärungsansatz für den weniger starken AngII-induzierten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  in den MCU KO-Kardiomyozyten könnte eine Überschneidung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmewege ins Mitochondrium sein. Dies wird im Abschnitt 4.4 näher diskutiert.

In einem dritten Erklärungsansatz ist zu diskutieren, ob Dantrolen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Kardiomyozyten von MCU KO-Mäusen beeinflussen könnte. Wie Seidlmayer et al. und andere Gruppen zeigten, hat Dantrolen in Herzmuskelzellen von Mäusen (mit MCU WT) keine relevante Wirkung auf die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und das ECC und somit keine unerwünschten, relevanten Nebeneffekte (Domeier et al., 2014, Leucht, 2019, Seidlmayer et al., 2016). In verschiedenen Tiermodellen mit kardialer Dysfunktion jedoch beeinflusste Dantrolen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, wobei je nach Modell unterschiedliche Effekte (Reduktion oder Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten) beobachtet wurden (Kobayashi et al., 2009, Meissner et al., 1996). In Kardiomyozyten mit einem kardiospezifischen MCU KO zeigten die Ergebnisse keinen relevanten Einfluss von Dantrolen auf das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ : Bei Gabe von Dantrolen zeigte sich keine Veränderung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  über 20 min im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In Zusammenschau der hier präsentierten Ergebnisse wurde auf die Untersuchung des Effekts von Dantrolen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Kardiomyozyten mit einem kardiospezifischen MCU KO verzichtet. Somit scheint ein relevanter Effekt unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es wären also weitere Untersuchungen notwendig, um einem möglichen Effekt von Dantrolen auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt von MCU KO-Kardiomyozyten nachzugehen und damit möglicherweise die Unterschiede von MCU KO- und WT-Zellen in der Reaktion auf die Behandlung AngII+Dantrolen zu erklären.

### **4.3 $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol**

#### **WT**

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten mit Iso steigerte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Mitochondrien (Abb. 10). Dieser Effekt ist in der Literatur bekannt und beschrieben, z.B. für Kardiomyozyten von Mäusen (Seidlmayer et al., 2016, Chen et al., 2012, Nickel et al., 2015) und Meerschweinchen (Maack et al., 2006). Die durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation induzierte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ist wichtig, um die mitochondriale Energieproduktion an einen gesteigerten zellulären Bedarf anzupassen (1.3 Mitochondrien und der zelluläre Energiehaushalt) (Kohlhaas et al., 2017).

Gleichzeitig erhöhte die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Iso erwartungsgemäß auch die zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Abb. 11 und 12, 1.2.3 Modulation der elektromechanischen Kopplung). Insbesondere das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  stieg deutlich, wobei der Anstieg nach 5 min maximal war und dann wieder leicht abfiel. Ähnliche Beobachtungen gab es auch in anderen Studien: Kiess et al. zeigten in ihren Experimenten an Ratten-Kardiomyozyten eine maximale Steigerung des systolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch Iso nach 5 min (Kiess and Kockskämper, 2019). In murinen Kardiomyozyten stieg das systolische  $\text{Ca}^{2+}$  bei Iso-Stimulation und erreichte das Maximum nach 15 min (Seidlmayer et al., 2016). Im Kern hat die Iso-Stimulation grundsätzlich denselben steigernden Effekt wie im Zytosol: Das diastolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  blieb weitgehend unbeeinflusst, während das systolische  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  deutlich anstieg. Anders als im Zytosol blieb es jedoch konstant erhöht und fiel über den Beobachtungszeitraum nicht wieder ab (Abb. 12).

## **MCU KO**

Die MCU KO-Kardiomyozyten reagierten in den Experimenten anders auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Iso als die WT-Kardiomyozyten: Die MCU KO-Zellen zeigten keinen relevanten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  bei Stimulation mit Iso (Abb. 10). Hingegen war der Effekt von Iso auf die zytosolischen und nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in WT- und MCU KO-Zellen vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich: Iso steigerte den systolischen Spitzenwert des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den MCU KO-Zellen  $+20\pm 7\%$  (Abb. 11). Die Beobachtungen dieser Arbeit korrespondieren mit Untersuchungen der Molkentin Arbeitsgruppe, die die Mäuse mit induzierbarem kardiospezifischen MCU KO erstmals beschrieben haben. Diese zeigten bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Iso einen fehlenden Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  in den MCU KO-Zellen (Kwong et al., 2015). Damit bestärken die Ergebnisse dieser Arbeit die Überlegung von Kwong et al., wonach die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den MCU wichtig ist für die Vermittlung der  $\beta$ -adrenergen Reaktion (Kwong et al., 2015).

In den Experimenten wurden Mäuse mit einem MCU KO verwendet, um die Auswirkungen einer gestörten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den MCU zu untersuchen. Eine alternative Methode wäre die akute medikamentöse Blockade mittels Ru360 gewesen. Im Vorfeld konnten allerdings gezeigt werden, dass Ru360 den nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beeinflusst, u.a. bewirkte es einen verlangsamten Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, sowie erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte (Leucht, 2019). Da ein maßgeblicher Teil der Fragestellung dieser Arbeit die Veränderung des nukleären

Ca<sup>2+</sup>-Transienten beinhaltet, war Ru360 als MCU-Inhibitor hier nicht geeignet und die Verwendung von Mäusen mit MCU KO sinnvoller. In Untersuchungen des in dieser Arbeit verwendeten kardiospezifischen MCU KO-Mausmodells zeigten sich unter Ruhebedingungen (niedrige Stimulationsfrequenz, keine katecholaminerge Stimulation) keine Unterschiede im Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der Mitochondrien oder zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten im Vergleich zu Kardiomyozyten mit MCU WT (Kwong et al., 2015). Kwong et al. gehen davon aus, dass der in adulten Mäusen induzierte, kardiospezifische MCU KO den basalen Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel und Energiehaushalts nicht verändert und sich erst bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation erkennbar auswirkt. Somit erwartet man bei den Tieren keine chronischen Kompensationsmechanismen des Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsels und das Modell ist – insbesondere im Vergleich zu konstitutivem globalen MCU KO – eher mit einer akuten MCU Blockade vergleichbar (Kwong, 2017).

Als mögliche Einschränkung bei den Überlegungen zum MCU KO-Mausmodell ist festzustellen, dass der KO des MCU bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren möglicherweise nicht vollständig gelungen ist. In der RT-PCR zeigte sich die Expression der MCU-mRNA in den Herzen der mit Tamoxifen behandelten Mäusen auf 40% vermindert gegenüber den WT-Mäusen bzw. den Mäusen mit MCU KO ohne Tamoxifen-Behandlung (Abb. 8 B). Auf Ebene der Proteine konnte eine Verminderung des MCU-Proteins im Herzgewebe der MCU KO-Mäuse festgestellt werden, im Vergleich zu den WT-Hezen um etwa die Hälfte (Abb. 8 A). Es könnte folglich sein, dass die Kardiomyozyten der MCU KO-Mäuse eine MCU-Restaktivität haben und die Messungen beeinflusst werden. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der KO trotzdem ausreichend erfolgreich war: In den MCU KO-Zellen ist die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Iso im Vergleich zu den WT signifikant vermindert (Abb. 10), eine Beobachtung, die auch in der Originalpublikation zu dem kardiospezifischen MCU KO gemacht wurde (Kwong et al., 2015).

#### **4.4 Vergleich der Stimulation mit dem IP<sub>3</sub>R-Agonisten**

##### **Angiotensin II und dem $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoproterenol**

Sowohl der  $\beta$ -adrenerge Agonist Iso als auch der IP<sub>3</sub>R-Agonist AngII führten zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Transienten in Kardiomyozyten. Sie wirkten dabei über unterschiedliche Signalwege und ihre Effekte unterschieden sich in der Dynamik: AngII führte zu einem kontinuierlichen Anstieg über 20 min. Dabei stiegen die diastolischen Werte stärker als die systolischen (Abb. 11 und 12). Iso hingegen hatte wenig Effekt auf die diastolischen Werte und steigerte insbesondere die systolischen Werte (Abb. 11 und

12). Der maximal steigernde Effekt war schon nach 5 min erreicht, danach nahmen die Werte im Zytosol wieder ab bzw. blieben im Kern konstant erhöht. Auch bei Betrachtung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zeigten sich Unterschiede: Der  $\beta$ -adrenerg induzierte Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$ , der in WT-Kardiomyozyten beobachtet wird, war bei MCU KO-Kardiomyozyten abgeschwächt (Abb. 10). Der AngII-induzierte Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  hingegen wurde sowohl in WT- als auch MCU KO-Zellen durch den mRyR1-Blocker Dantrolen abgeschwächt (Abb. 10).

Zudem machen die Ergebnisse deutlich, dass sich die Blockade der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unterschiedlich auf den nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auswirkt: Bei AngII-Gabe, welche AT1-R-vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, kam es in Folge der Blockade des mRyR1, nicht aber des MCU, zur Steigerung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Abb. 12). Im Kontrast dazu veränderte die Blockade des MCU oder des mRyR1 bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern nicht signifikant (Abb. 12). Die Ergebnisse stützen die Idee, dass Iso und AngII über verschiedene Wege  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hervorrufen und diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wiederum unterschiedliche Effekte in den Kompartimenten der Zelle haben. So vermittelt Iso als  $\beta$ -Agonist über den Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  eine schnelle Anpassung des mitochondrialen Energiestoffwechsels (1.3 Mitochondrien und der zelluläre Energiehaushalt und (Kwong, 2017, Kohlhaas et al., 2017)). AngII könnte der Anpassung des basalen mitochondrialen Stoffwechsels dienen (Seidlmayer et al., 2016, Beutner et al., 2005).

### **Crosstalk – Mögliche Überschneidung der Signalwege**

In den Ergebnissen finden sich auch Effekte, die – obwohl einzeln betrachtet ohne statistische Signifikanz – als mögliche Überschneidungen von  $\beta$ -adrenergem Signalweg und AngII- $\text{IP}_3$ -Signalweg betrachtet werden sollten.

Erstens schwächte der mRyR1-Blocker Dantrolen in den WT-Zellen die Iso-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium leicht ab (Iso  $21 \pm 3\%$  vs. Iso+Dantrolen  $14 \pm 4\%$ ,  $p=0,32$ , ns, Abb. 10 A). Daraus ergibt sich die Frage, ob neben dem MCU – zu einem geringeren Anteil – auch der mRyR1 an der Iso-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme beteiligt ist. Für diese Überlegung spricht, dass die systolischen Werte in Zytosol und Kern unter Iso+Dantrolen tendenziell (nicht signifikant) stärker stiegen als unter Iso allein (Abb. 11 und 12). Zweitens fiel der AngII-induzierte Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  in den MCU KO-Zellen geringer aus als in den WT-Zellen ( $41 \pm 5\%$  WT,  $21 \pm 4\%$  MCU KO,  $p=0.12$ , ns, Abb. 10). Wird AngII-induziert freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur über den mRyR1, sondern auch über den MCU aufgenommen? Allgemeiner formuliert: Überschneiden bzw. beeinflussen sich

die von Iso bzw. AngII aktivierten Signalwege bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium?

In atrialen murinen Kardiomyozyten haben Wullschleger et al. gezeigt, dass es einen bi-direktionalen Einfluss – „crosstalk“ – zwischen RyR2 und  $\text{IP}_3\text{R}$  gibt. Diese beiden wichtigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle finden sich in räumlicher Nähe zueinander in der SR-Membran (Ko-Lokalisation) (Wullschleger et al., 2017, Mackenzie et al., 2002). Durch hochauflösende Darstellung einzelner  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen wurde in der Studie sichtbar gemacht, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -puffs aus  $\text{IP}_3\text{R}$  direkt zur Aktivierung von RyR2 führen und einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus RyR2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -sparks) triggern können. Bei erhöhtem intrazellulärem  $\text{IP}_3$  könnten so die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus RyR2 und folglich auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten moduliert werden (Wullschleger et al., 2017). Einschränkend ist zu bedenken, dass die beschriebenen Experimente an atrialen Kardiomyozyten durchgeführt wurden, welche verglichen mit ventrikulären Zellen Unterschiede im Aufbau zeigen. Diese Untersuchung von Wullschleger et al. auf Ebene einzelner  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale unterstützt damit Studien, die schon früher an atrialen Myozyten von Katzen und an ventrikulären Myozyten von Kaninchen und Ratten zeigten, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus  $\text{IP}_3\text{Rs}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und damit das ECC beeinflussen (Zima and Blatter, 2004, Domeier et al., 2008, Harzheim et al., 2009). Zudem wird die Aktivität der  $\text{IP}_3\text{Rs}$  durch  $\text{Ca}^{2+}$ -sparks aus RyR2 beeinflusst: Die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $\text{IP}_3\text{Rs}$  ist abhängig von der lokalen Konzentration von  $\text{IP}_3$  und von  $\text{Ca}^{2+}$ , sodass  $\text{Ca}^{2+}$ -sparks aus RyR2 zu vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus  $\text{IP}_3\text{Rs}$  führen können (Foskett et al., 2007, Wullschleger et al., 2017). Es gibt somit Hinweise auf einen sich überschneidenden Einfluss der von Iso und AngII aktivierten Signalwege bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Weiterführende Untersuchung, insbesondere auch zu möglichen Überschneidungen der durch Iso bzw. AngII induzierten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, drängen sich auf.

## 4.5 Frequenz

### 4.5.1 Frequenzwechsel

Bei dem Frequenzwechsel von 1 Hz auf 4 Hz ließ sich innerhalb weniger Minuten eine deutliche Steigerung der diastolischen und systolischen Werte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern und Zytosol beobachten, die dann (auf diesem neuen, höheren Niveau) stabil blieben (Abb. 13). Der frequenzabhängige Anstieg der diastolischen und systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Kardiomyozyten wird in der Literatur mehrfach beschrieben, für Ratten z.B. von Dibb et al. (Dibb et al., 2007), für Mäuse z.B. von Ljubojevic et al. oder

Antoons et al. (Ljubojević et al., 2011, Antoons et al., 2002). Wie bei Ljubojevic et al. ist auch in den hier präsentierten Ergebnissen der Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  im Kern ausgeprägter als im Zytosol (Abb. 13). Diese Beobachtung lässt sich durch den langsameren Abfall des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und folglich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation bei höherer Frequenz erklären.

In den anschließenden Experimenten wurden die Kardiomyozyten schon vor Messbeginn einige min mit 4 Hz stimuliert, sodass davon auszugehen ist, dass zum Messzeitpunkt 0 min, zu dem mit der pharmakologischen Stimulation begonnen wurde, der Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  durch den Frequenzwechsel schon erfolgt war. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  einige min nach Frequenzwechsel über 20 min Beobachtungszeitraum nur noch wenig veränderten (Abb. 13). In den Experimenten mit 4 Hz blieben  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  der unbehandelten Kontrollgruppe dann über 20 min weitgehend stabil (weniger als 10% Abfall/Anstieg, Abb. 15 und 16). Die physiologische Relevanz wird unten erörtert (4.5.4 IP<sub>3</sub>-Stimulation bei 4 Hz).

#### 4.5.2 Arrhythmien

Bei den mit 4 Hz stimulierten Zellen von WT-Mäusen wurde eine deutliche Tendenz zu Arrhythmien im Vergleich zu den mit 1 Hz stimulierten Zellen und den mit 4 Hz stimulierten MCU KO-Zellen beobachtet. Insbesondere von den mit AngII behandelten WT-Zellen zeigte mehr als die Hälfte im Beobachtungszeitraum arrhythmische Kontraktionen (Tab. 23). Die pro-arrhythmogene Wirkung von AngII und ET-1, welche u.a. AT1-R-vermittelt die IP<sub>3</sub>-Konzentration steigern, ist in der Literatur bekannt und für verschiedene Spezies, u.a. Ratte und Maus, beschrieben (Proven, 2006, Li et al., 2005, Mackenzie et al., 2002). Es wird angenommen, dass bei der AngII/ET-1-induzierten IP<sub>3</sub>-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den IP<sub>3</sub>R im SR auch nahe gelegene RyR2 aktiviert werden und es zu spontanen, unkontrollierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen kommt, welche das Risiko für Arrhythmien erhöhen (Wullschleger et al., 2017, Harzheim et al., 2009). Das Auftreten von Arrhythmien unter AngII trat erst bei einer höheren Stimulationsfrequenz von 4 Hz, noch nicht aber bei 1 Hz auf. Grund hierfür könnte der mit der Frequenz angestiegene SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt sein, der die Offenwahrscheinlichkeit von RyR2 erhöht (Bers, 2002, Eisner et al., 2017).

Bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Iso und 4 Hz Stimulation zeigten sich ebenfalls vermehrt Arrhythmien (Tab. 23). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Studien gemacht. Bei Wüst et al. wurden Kardiomyozyten von Ratten bei annähernd



physiologischen Frequenzen (>4 Hz) und Stimulation mit Iso arrhythmisch und die Zellen instabil (Wüst et al., 2017). Ebenfalls in Ratten-Kardiomyozyten beobachteten Proven et al. schon bei 0,33 Hz unter Iso-Stimulation spontane diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Proven, 2006). Die pro-arrhythmogene  $\beta$ -adrenerge Wirkung wurde durch eine Erhöhung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts erklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Kardiomyozyten mit MCU KO nur vereinzelte (bei Stimulation mit 1 Hz) bzw. keine Arrhythmien (bei Stimulation mit 4 Hz) beobachtet, was im starken Kontrast zu den häufigen Arrhythmien der WT-Gruppe bei 4 Hz steht (3.9 Arrhythmische Kontraktionsmuster bei 4 Hz). In Einklang mit diesen Beobachtungen gibt es Hinweise, dass eine Blockade des MCU Arrhythmien verhindern kann (Salazar-Ramírez et al., 2021). Ein Beispiel soll hier genauer vorgestellt werden: In einem Mausmodell mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz traten vermehrt tachykarde Herzrhythmusstörungen und Extrasystolen auf, welche die Autoren auf eine Erhöhung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  zurückführen (Xie et al., 2018). Als Mechanismus wird vermutet, dass das erhöhte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  den diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus dem Mitochondrium steigert und damit den sarkolemmalen NCX aktiviert. Dadurch wird die Entstehung von pro-arrhythmogenen Signalen in Form sog. EADs (early afterdepolarizations) begünstigt. EADs sind irreguläre Depolarisationen während der Repolarisationsphase des regulären Aktionspotenzials der Zelle und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Arrhythmien (Federico et al., 2020). Die Vermutung bezüglich des vermuteten Mechanismus wird durch die Beobachtung bestärkt, dass sowohl bei Blockade des MCU (entweder durch Ru360 oder genetischen KO) als auch bei Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus dem Mitochondrium die NCX-Aktivität reduziert war und signifikant weniger EADs und Arrhythmien auftraten (Xie et al., 2018). Ob dieser Mechanismus auch als Erklärung für die Beobachtung dienen kann, dass nur in der WT-Gruppe, nicht aber in der MCU KO-Gruppe bei 4 Hz vermehrt Arrhythmien auftreten, bleibt spekulativ. Es gibt jedoch mehrere Beobachtungen, die diese Vermutung stützen. Zum einen verhindert der MCU KO die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unter Stressbedingungen und somit einen mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -overload (Abb. 10 und (Lu et al., 2016)). Zum anderen ist der mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux via NCLX in den MCU KO-Zellen vermindert (Kwong et al., 2015). Die Unterschiede in der Arrhythmie-Häufigkeit WT- und MCU KO-Mäusen passen insgesamt dazu, dass sich Unterschiede zwischen WT- und MCU KO-Mäusen erst unter Belastung zeigen (1.4.2 Mitochondriale Calciumaufnahme): unter Ruhebedingungen sind Phänotyp, mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und Parameter des Energiehaushalts vergleichbar; erhöhte

Arbeitslast oder  $\beta$ -adrenerge Stimulation hingegen resultieren bei den MCU KO-Mäusen in verminderter Leistungsfähigkeit *in vivo* bzw. reduzierter mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und metabolischen Reaktion (Abb. 10 und (Kwong et al., 2015, Luongo et al., 2015)). Um die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Arrhythmien weiter zu verfolgen und die Mechanismen zu ergründen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

#### 4.5.3 $\beta$ -adrenerge Stimulation bei 4 Hz

Erwartungsgemäß führt Iso auch bei mit 4 Hz stimulierten Zellen zu einer Steigerung von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyto}}$  und  $\text{Ca}^{2+}_{\text{nuc}}$  (Abb. 15 und 16). Sie fällt jedoch geringer aus als bei 1 Hz und die diastolischen Werte nehmen stärker zu als die systolischen Werte, während dies bei 1 Hz umgekehrt war. Diese Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach dem Frequenzwechsel bei 4 Hz Stimulation schon nahezu maximal waren und durch weitere pharmakologische Stimulation mit Iso im Sinne eines Plateaus nur noch wenig erhöht werden konnten. Die Besonderheiten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts in murinen Kardiomyozyten bestärken diese Überlegung: Die Herzfrequenz von Mäusen ist mit 450-700/min um ein Vielfaches höher als die Herzfrequenz von größeren Tieren (z.B. Meerschweinchen mit 200-300/min) und die des Menschen mit 60-100/min (Kwong, 2017, Desai et al., 1997). Man geht bei Mäusen in Ruhe von einem hohen Sympathikotonus aus (Desai et al., 1997). Im physiologischen Frequenzbereich der Maus steigt die Auswurfleistung des Herzens bei höherer Frequenz nur unwesentlich (geringe Kraft-Frequenz-Reserve) (Georgakopoulos and Kass, 2001). Damit hat die Maus – anders als der Mensch, der seinen Auswurf etwa um das 4-fache steigern kann – eine sehr geringe Kraft-Frequenz-Reserve (Chapman et al., 1960). Schon bei Ruhfrequenzen sind bei Mäusen u.a. der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und die oxidative Phosphorylierung nahe dem Maximum (Pieske, 2003, Phillips et al., 2012). Bei steigenden Frequenzen nehmen diese Parameter weniger stark zu als bei größeren Säugern. O'Rourke et al. gehen wegen dieser Unterschiede davon aus, dass sich (mitochondriale)  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von kleinen Säugern wie Mäusen von anderen Spezies unterscheiden (O'Rourke et al., 2021). Diese Eigenschaften der murinen Kardiomyozyten, insbesondere der bei Ruhe nahezu maximale SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt, könnten den in den Ergebnissen beobachteten, vergleichsweise geringen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei 4 Hz und Iso-Gabe erklären. Analog dazu haben Dibb et al. an Kardiomyozyten von Ratten gezeigt, dass die systolischen Spitzenwerte von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei 4 Hz ein Plateau erreichen und nicht weiter ansteigen, wenn die Stimulationsfrequenz über 4 Hz hinaus weiter erhöht wird (Dibb et al., 2007). Dieser

Vergleich wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass die Zellen bei Dibb et al. schon vor der Frequenzerhöhung mit Iso stimuliert wurden.

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Iso steigerte die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei 4 Hz Stimulationsfrequenz um  $+8\pm 3\%$ , was keinen Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen darstellt ( $+9\pm 3\%$ ) (Abb. 14). Diese Beobachtung unterscheidet sich vom Effekt von Iso bei 1 Hz, wo  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  anstieg  $+21\pm 3\%$ . Beim Vergleich des Iso-Effekts bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen sollte zunächst bedacht werden, dass die Zellen schon einige min mit 4 Hz stimuliert wurden, bevor Iso zugegeben wurde. Anders als eben für Zytosol und Kern besprochen, wurde die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderung während des Frequenzwechsels nicht gemessen, sondern es wurde jeweils getrennt für 1 und 4 Hz gemessen. Somit lassen sich nur die Veränderungen, nicht aber die absoluten Werte für  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  vergleichen. Bei diesen Überlegungen ist eine Untersuchung von Wüst et al. hilfreich: In Ratten-Kardiomyozyten nahm das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  mit steigender Frequenz (von 0,1 – 4 Hz) zu, sodass es bei 4 Hz etwa doppelt so hoch war als bei 1 Hz (Wüst et al., 2017). Es scheint somit möglich, dass auch in den Experimenten dieser Arbeit das  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  mit dem Frequenzwechsel von 1 auf 4 Hz relevant zugenommen hat, bevor mit der pharmakologischen Stimulation, z.B. mit Iso, begonnen wurde.

#### **4.5.4 IP<sub>3</sub>-Stimulation bei 4 Hz**

Bei 4 Hz Stimulation steigt das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  über den Beobachtungszeitraum in den unbehandelten Zellen leicht an ( $+9\pm 3\%$ ). Die Gabe des IP<sub>3</sub>R-Agonisten AngII bewirkt bei 4 Hz, anders als bei 1 Hz, im Vergleich zu den Kontrollen keine weitere Steigerung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ( $+9\pm 2\%$ ). Die AngII-induzierte IP<sub>3</sub>-vermittelte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme scheint durch diese Ergebnisse bei 4 Hz weniger relevant als bei 1 Hz. Entsprechend zeigt sich bei 4 Hz auch der Effekt von AngII+Dantrolen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern abgeschwächt im Vergleich zu 1 Hz. Bei beiden Frequenzen steigert die AngII+Dantrolen-Behandlung das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ . AngII+Dantrolen steigert außerdem das systolische  $\text{Ca}^{2+}$ . Dabei ist der Anstieg des systolischen  $\text{Ca}^{2+}$  bei 1 Hz höher ( $+79\pm 12\%$ ) als bei 4 Hz ( $+20\pm 12\%$ ), passend zur höheren mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei 1 Hz. Bei diesen Ergebnissen sollte bedacht werden, dass schon die Frequenzerhöhung von 1 auf 4 Hz (3.6 Steigerung der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf 4 Hz) das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  mehr als verdoppelt und das systolische  $\text{Ca}^{2+}$  auf mehr als das 1,5-fache steigert.

Das mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  der MCU KO-Zellen steigt bei 4 Hz Stimulation etwa im gleichen Maße wie die WT-Zellen an (unbehandelte Kontrollen: MCU KO  $+12\pm 2\%$ , WT  $+9\pm 3\%$ ). Wie bei den WT-Zellen bewirkt bei den MCU KO-Zellen die Gabe des  $\text{IP}_3$ -Agonisten AngII keine weitere Steigerung von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  ( $+16\pm 2\%$ ) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Die Gabe des mRyR1-Blockers Dantrolen hat keinen Einfluss auf die Steigerung von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  (AngII+Dantrolen  $+15\pm 1\%$ ) im Vergleich mit der Kontroll- bzw. der AngII-Gruppe. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der  $\text{IP}_3$ -mRyR1-Weg bei 4 Hz Stimulationsfrequenz weniger relevant ist.

Aus dieser Beobachtung zum Effekt von AngII bei 4 Hz schließt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz des  $\text{IP}_3$ -mRyR1-Wegs an. An ruhenden und mit 0,5 Hz stimulierten murine Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ , das über  $\text{IP}_3$ Rs aus dem SR freigesetzt wird, über den mRyR1 in Mitochondrien aufgenommen wird und dort den Energiestoffwechsel beeinflusst (Seidlmayer et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich dieser Weg insofern, als dass AngII, welches AT1-R-vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, zu einer mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 führt. Dieser Effekt ist bei 1 Hz stärker als bei 4 Hz (Abb. 10 und 14). Dabei ist die Stimulationsfrequenz von 4 Hz näher an der physiologischen Herzfrequenz von Mäusen (ca. 450-700/min) als 1 Hz, sodass der mRyR1-Signalweg weniger relevant erscheint. Dieser Signalweg könnte jedoch beim Menschen eine Rolle spielen, dessen Herzfrequenz ca. 45-140/min näher an 1 Hz liegt. Um die physiologische Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 in verschiedenen Spezies zu ergründen, wäre die Untersuchung des mitochondrialen Energiestoffwechsels bei höheren Frequenzen und gleichzeitiger mRyR1-Blockade interessant.

Eine zweite Frage ergibt sich aus der Beobachtung, dass auch Zellen mit MCU KO und Dantrolen-Behandlung einen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mito}}$  zeigen (AngII+Dantrolen  $+15\pm 1\%$  bei 4 Hz, Abb. 14). In diesen Zellen sollte die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme sowohl über den MCU als auch über den mRyR1 geblockt sein. Wie bereits erläutert, hat sich bei Überprüfung des KO-Modells eine Reduktion des MCU-Proteinlevels um die Hälfte gezeigt (Abb. 8). Möglicherweise wird also in den MCU KO-Zellen noch ausreichend MCU exprimiert, um eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (wie bei 4 Hz) zu vermitteln. Eine andere Erklärung wäre ein alternativer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeweg ins Mitochondrium. Neben MCU und mRyR1 werden dafür noch weitere Wege diskutiert, so z.B. der Letm1 (leucine-zipper-EF-handcontaining transmembrane protein 1), ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher

(Jiang et al., 2009) und der TRPC3 (transient receptor potential canonical 3) (Feng et al., 2013).

#### **4.6 Limitationen**

Wie bei experimentellen Arbeiten im Allgemeinen, sollte man sich auch bei der vorliegenden Arbeit über ihre Limitationen bewusst sein. Überwiegend wurden diese in der Diskussion an den inhaltlich passenden Stellen thematisiert. So wird das MCU KO-Mausmodell und spezielle Herausforderungen in dieser Arbeit in 4.3 diskutiert (4.3.  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol). Mögliche Nebeneffekte von Dantrolen werden in 4.2 kritisch beleuchtet (4.2 Stimulation mit dem IP<sub>3</sub>R-Agonisten Angiotensin II bei gestörter mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme). Zwei weitere Einschränkungen sollen nun noch an dieser Stelle erwähnt werden.

Bei den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Qualität der extrahierten Zellen Farbstoff-assoziierte Effekte insb. Bleaching und Farbstoff-Leckage nicht ausschließen. Alle Zellen sind Hintergrund-korrigiert und in jeder Versuchsgruppe gab es zum Vergleich eine unbehandelte Kontrollgruppe um die erwähnten Faktoren einschätzen und – soweit möglich – korrigieren zu können.

Im Ergebnisteil wird an einigen Messpunkten ein z.T. hoher Standardfehler als limitierender Faktor angegeben. Dieser kommt in einigen Gruppen durch eine geringe Anzahl an gemessenen Zellen zustande. Daher ist es an diesen Stellen z.T. erschwert, Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu machen.

## 5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit an murinen Kardiomyozyten bei 1 Hz (und eingeschränkt auch bei 4 Hz) Stimulationsfrequenz zeigen: Eine gestörte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 führt bei Stimulation mit AngII, welches AT1-R-vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, zu einer Steigerung der systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spitzenwerte und damit der Amplitude im Kern. Beeinflussen diese beobachteten Veränderungen des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aufgrund der gestörten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme die hypertrophe Genexpression? Um diese Frage zu beantworten, braucht es ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit weitere Untersuchungen der Signalwege der hypertrophen Genexpression z.B. des NFAT-Signalwegs, bei gleichzeitig gestörter mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme. In der Einleitung wurden bereits  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege der hypertrophen Genexpression skizziert (1.7 Einfluss von Calcium auf die Genexpression in Kardiomyozyten). Hier sollen nun als Ausblick Mechanismen betrachtet werden, die erklären könnten, auf welche Weise  $\text{Ca}^{2+}$  die hypertrophe Genexpression beeinflusst, z.B. durch die Modifizierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (z.B. Dauer, Amplitude) oder räumlich und zeitlich limitierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Mikrodomänen).

### Diastolisches Calcium

Eine Hypothese ist, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige prohypertrophe Signalwege auf anhaltende Veränderung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  reagieren. Schon länger ist bekannt, dass Calcineurin in B-Lymphozyten durch anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung im Zytosol aktiviert wird (Dolmetsch et al., 1997). In Kardiomyozyten ist es schwieriger diesen Effekt zu untersuchen. Jedoch gibt es entsprechende indirekte Hinweise, insbesondere durch die Untersuchung von Tiermodellen mit erhöhtem diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR (Goonasekera and Molkentin, 2012). So zeigten transgene Mäuse mit erhöhter RyR2 Aktivität und SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck zwar keine Hypertrophie unter Ruhebedingungen, nach Druckbelastung aber steigerte sich die Calcineurin-NFAT-Aktivität und die Mäuse entwickelten kardiale Hypertrophie (Van Oort et al., 2010). In einer Untersuchung von transgenen Mäusen mit NHE1-Überexpression, die mit erhöhtem  $\text{Na}^+$ -Level und diastolischem  $\text{Ca}^{2+}$  einhergeht, wird die Aktivierung prohypertropher Signalwege (Calcineurin und CaMKII) und kardiale Hypertrophie beobachtet (Nakamura et al., 2008).

## **Mikrodomäne**

Olivares-Florez et al. schlagen vor, den Zellkern als  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomäne zu betrachten, da der nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient in Teilen unabhängig vom zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient beeinflusst werden kann und so im Kern ein räumlich begrenzter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg als Antwort auf prohypertrophe Stimuli möglich sei. Sie zeigen an murinen Kardiomyozyten, wie sowohl akute als auch chronische Stimulation mit AngII zum Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Kern führt, wobei der Anstieg im Kern dabei signifikant stärker ausfällt. Besonders ausgeprägt ist der Anstieg des nukleären diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ , den die Autoren als entscheidendes Signal interpretieren. Zusätzlich steigt die NFAT-Aktivität nach chronischer AngII-Stimulation und bleibt auch 4 Wochen nach Beendigung der Stimulation mit AngII weiter erhöht. Werden im gleichen Versuchsaufbau Mäuse mit funktionellem  $\text{IP}_3$ -KO untersucht bzw. der  $\text{IP}_3$ R geblockt, fallen die beschriebenen Effekte signifikant schwächer aus. Das unterstreicht die Bedeutung des  $\text{IP}_3$ -Signals für Vermittlung des prohypertrophen AngII-Effekts in diesem Experiment (Olivares-Florez et al., 2018).

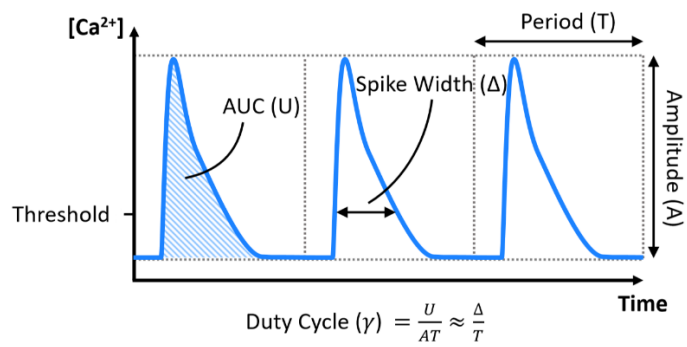
Das Konzept der Mikrodomäne wird durch weitere Studien unterstützt. Das gilt insbesondere für die lokale,  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Kernhülle. Wu et al. zeigten an Ventrikeldomyozyten von Kaninchen und Mäusen, wie  $\text{IP}_3$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Kernhülle als Antwort auf ET-1-Stimulation, unabhängig von den globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, zur Aktivierung des prohypertrophen CaMKII-HDAC5-Signalwegs führt (Wu et al., 2006). Für eine privilegierte nukleäre Mikrodomäne plädieren auch Higazi et al.: In neonatalen und adulten Ratten-Kardiomyozyten kommt es in Folge einer  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus der Kernhülle zur Aktivierung von Calcineurin und Hypertrophie (gemessen als Steigerung der Expression eines Hypertrophie-assoziierten Proteins und der Zellgröße) (Higazi et al., 2009)

## **Frequenz, Amplitude und kumulative Parameter**

Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle der Frequenz und/oder der Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auf die hypertrophe Genexpression und identifizierten sie als Hypertrophie-Signale. In Versuchen mit neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führten erhöhte Frequenz und Amplitude über die Aktivierung von Calcineurin zur NFAT-Translokation in den Kern (Colella et al., 2008). Die Autoren schlagen deshalb vor, Calcineurin als Integrator von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen zu betrachten. Diese Argumentation wird durch verschiedene, auf experimentellen Daten beruhende Rechenmodelle

unterstützt und erweitert. Eine Modellierung von Khalilimeybodi et al. zeigt, dass die durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation gesteigerte Frequenz zur Aktivierung sowohl von Calcineurin als auch von NFAT führt (Khalilimeybodi et al., 2018). Mit einem anderen Modell zeigten Winslow et al., dass nukleäres NFAT sensitiver auf die Frequenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten als auf die Höhe des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  reagiert (Winslow et al., 2016). Letzteres betrifft die häufig aufgeworfene Frage, ob eine Frequenzerhöhung nicht über die Erhöhung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  als Hypertrophiesignal wirkt und somit nicht der entscheidende Parameter ist (Goonasekera and Molkentin, 2012). Hier stoßen experimentelle Ansätze an ihre Grenzen, wenn eine unabhängige Veränderung der einzelnen Parameter nicht möglich ist. In manchen Fragen könnten Modellierung bei der Differenzierung der Effekte hilfreich sein (Winslow et al., 2016, Goonasekera and Molkentin, 2012). Rechenmodelle erleichtern außerdem, über Frequenz oder Amplitude hinausgehende, kumulative Signale zu untersuchen. Eines davon ist der sog. duty cycle, ein Parameter, den Hunt et al. als Vermittler des prohypertrophen Effekts von  $\text{IP}_3$  vorschlagen (Hunt et al., 2020). Der duty cycle bezeichnet den Anteil des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, in dem  $\text{Ca}^{2+}$  den Wert übersteigt, ab welchem der Calcineurin/NFAT-Signalweg durch  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst wird (threshold). Er wird berechnet als Quotient aus der area under the curve (AUC) des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der maximal möglichen Fläche (= Amplitude  $A$  \* Periodendauer  $T$ ) (Abb. 20). In dem Modell, welches auf Experimenten mit adulten Ventrikelmyozyten von Ratten basiert, kommt es in der Folge einer Stimulation des  $\text{IP}_3\text{R}$  zur Aktivierung des NFAT (Hunt et al., 2020). Dieser Effekt konnte nur unzureichend durch die jeweiligen  $\text{IP}_3$ -induzierten Veränderungen von Amplitude, Frequenz oder diastolischem  $\text{Ca}^{2+}$  erklärt werden. Dahingegen identifizieren die Autoren den duty cycle als relevanten Parameter, der die  $\text{IP}_3$ -induzierten Veränderungen u.a. von Frequenz und Amplitude abbildet und den aktivierenden  $\text{IP}_3$ -Effekt auf NFAT vermittelt.





**Abbildung 20: Duty cycle**

Schemazeichung zur Berechnung des duty cycle von  $Ca^{2+}$ -Transienten mithilfe folgender Parameter: Amplitude  $A$ ,  $AUC(U)$  = area under the curve, Period ( $T$ ) = Periodendauer, Spike Width ( $\Delta$ ) = Breite des  $Ca^{2+}$ -Transienten am Schwellenwert (threshold).

Abbildung nach (Hunt et al., 2020) mit Genehmigung von Elsevier.

Für künftige Untersuchungen, die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgreifen und weiterführen, wäre es interessant, neben einzelnen Parametern wie z.B. der Amplitude auch kumulative Parameter wie den duty cycle im Zusammenhang mit dem  $IP_3$ -mRyR1-Weg und möglicher prohypertropher Effekte zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

In Herzmuskelzellen spielt Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als Signalmolekül eine zentrale Rolle, u.a. für die Vermittlung von Kontraktion und Relaxation, die Regulation des mitochondrialen Stoffwechsels und der Einfluss auf die Genexpression im Zellkern (Bers, 2008). Diese komplexen Prozesse erfordern eine präzise Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den verschiedenen Kompartimenten. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) im Rahmen eines Kontraktionszyklus erfolgt vornehmlich über Ryanodin-Rezeptoren. Daneben setzen auch  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren, aktiviert vom Botenstoff  $\text{IP}_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR frei. Diese  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale führen zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Mitochondrien, wo sie die Atmungskettenaktivität und die antioxidative Kapazität steigern (Seidlmayer et al., 2016). Für diese privilegierten Kommunikationswege zwischen SR und Mitochondrium sind neben räumlicher Nähe auch spezialisierte Strukturen notwendig (Seidlmayer et al., 2019). Diese Kontaktstellen zwischen SR und Mitochondrien werden bei pathologischen Umbauprozessen der Zelle, wie sie z.B. bei der Herzinsuffizienz auftreten, gestört. In Zusammenspiel mit weiteren strukturellen und funktionellen Veränderungen ist die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme beeinträchtigt. Die Folge sind ein Energiedefizit und eine Einschränkung der kontraktile Funktion (Kohlhaas et al., 2017). Des Weiteren zirkulieren bei Herzinsuffizienz durch die Aktivierung des neurohumoralen Systems vermehrt Hormone wie AngII, welches u.a. AT1-R-vermittelt die intrazelluläre  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert und in Herzmuskelzellen u.a. als Hypertrophie-Signal wirkt.

Dieser Arbeit geht die Vermutung voraus, dass eine beeinträchtigte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, vermittelt durch Veränderung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die hypertrophe Genexpression beeinflussen kann. Die Arbeit hat untersucht, wie zytosolischer und nukleärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient sich verändern, wenn Kardiomyozyten mit AngII, welches AT1-R-vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, stimuliert werden und die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme entweder durch Blockade des mRyR1 oder des MCU gestört ist. Dazu erfolgten konfokalmikroskopische Messungen an intakten ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Mäusen mit kardiospezifischem MCU Knock-out (MCU KO) und ihren wildtypischen Geschwistertieren (WT). Zum Vergleich wurden Zellen mit dem  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol stimuliert, um den Effekt des  $\beta$ -adrenerg vermittelten,  $\text{IP}_3$ -unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs im Zytosol auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern zu untersuchen. Die Experimente wurden bei elektrischer Stimulation mit 1 und 4 Hz durchgeführt, um die Frequenzabhängigkeit der Effekte zu untersuchen.

Bei 1 Hz Stimulationsfrequenz induzierte AngII in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten eine mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, welche durch Blockade des mRyR1 mit Dantrolen signifikant abgeschwächt wurde. Als Folge der gestörten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme kam es in den WT-Zellen zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Zellkern. Damit konnte in dieser Arbeit an murinen Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Störung der AngII-induzierten mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den mRyR1 zu gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern führt. Bei 4 Hz Stimulationsfrequenz war dieser Effekt im Vergleich zu 1 Hz weniger deutlich ausgeprägt: die AngII-induzierte mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei 4 Hz fiel geringer aus und entsprechend stiegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Zytosol und Zellkern als Folge der Blockade des mRyR1 weniger stark an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der AngII-induzierte  $\text{IP}_3$ -mRyR1-Signalweg bei 1 Hz größeren Einfluss hat als bei 4 Hz. Im nächsten Schritt wurde mit dem  $\beta$ -Agonisten Iso stimuliert. Iso steigerte die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in WT-Kardiomyozyten, nicht aber in MCU KO-Kardiomyozyten. Die Blockade des MCU schwächte den Iso-Effekt also signifikant ab. In Zytosol und Kern steigerte Iso insbesondere die systolischen Spitzenwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und MCU KO-Zellen zeigten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Blockade der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unterschiedlich auf den nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auswirkt: Bei Stimulation mit AngII, welches AT1-R-vermittelt die  $\text{IP}_3$ -Konzentration steigert, kam es in Folge der Blockade des mRyR1, nicht aber in Folge der Blockade des MCU, zur Steigerung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation hingegen veränderte die Blockade des MCU oder des mRyR1 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Kern nicht signifikant. Das verdeutlicht die Bedeutung der  $\text{IP}_3$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung für die Kontrolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. Ein Zusammenhang der beschriebenen Veränderung des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei gestörter mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme mit der Regulation der hypertrophen Genexpression durch AngII scheint möglich und sollte in anknüpfenden Arbeiten untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALTSCHAFL, B. A., BEUTNER, G., SHARMA, V. K., SHEU, S.-S. & VALDIVIA, H. H. 2007. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmaco-kinetic profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768, 1784-1795.
- ANTOONS, G., MUBAGWA, K., NEVELSTEEN, I. & SIPIDO, K. R. 2002. Mechanisms Underlying the Frequency Dependence of Contraction and  $[Ca^{2+}]_i$  Transients in Mouse Ventricular Myocytes. *The Journal of Physiology*, 543, 889-898.
- BALABAN, R. S. 2002. Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 1259-1271.
- BALABAN, R. S. 2009a. Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 832-41.
- BALABAN, R. S. 2009b. The role of  $Ca^{2+}$  signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1334-41.
- BARE, D. J., KETTLUN, C. S., LIANG, M., BERS, D. M. & MIGNERY, G. A. 2005. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 280, 15912-20.
- BAUGHMAN, J. M., PEROCCHI, F., GIRGIS, H. S., PLOVANICH, M., BELCHER-TIMME, C. A., SANCAK, Y., BAO, X. R., STRITTMATTER, L., GOLDBERGER, O., BOGORAD, R. L., KOTELIANSKY, V. & MOOTHA, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341-345.
- BERNSTEIN, S. A. & MORLEY, G. E. 2006. Gap Junctions and Propagation of the Cardiac Action Potential. KARGER.
- BERS, D. M. 2001. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, Dordrecht ; Boston, Kluwer Academic Publishers.
- BERS, D. M. 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415, 198-205.
- BERS, D. M. 2006. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology*, 21, 380-387.
- BERS, D. M. 2008. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70, 23-49.
- BERTERO, E. & MAACK, C. 2018a. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation Research*, 122, 1460-1478.
- BERTERO, E. & MAACK, C. 2018b. Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 15, 457-470.
- BEUTNER, G., SHARMA, V. K., GIOVANNUCCI, D. R., YULE, D. I. & SHEU, S.-S. 2001. Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 21482-21488.
- BEUTNER, G., SHARMA, V. K., LIN, L., RYU, S.-Y., DIRKSEN, R. T. & SHEU, S.-S. 2005. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1717, 1-10.
- BEZPROZVANNY, I. 2005. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, 38, 261-72.

- BONDARENKO, A. I., JEAN-QUARTIER, C., MALLI, R. & GRAIER, W. F. 2013. Characterization of distinct single-channel properties of Ca<sup>2+</sup> inward currents in mitochondria. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 465, 997-1010.
- BOOTMAN, M. D., HARZHEIM, D., SMYRNIAI, I., CONWAY, S. J. & RODERICK, H. L. 2007. Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1. *Cell Calcium*, 42, 489-501.
- BRAUNWALD, E. 2013. Heart Failure. *JACC: Heart Failure*, 1, 1-20.
- CHAHINE, M. N., MIOULANE, M., SIKKEL, M. B., O'GARA, P., DOS REMEDIOS, C. G., PIERCE, G. N., LYON, A. R., FÖLDES, G. & HARDING, S. E. 2015. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovascular Research*, 105, 31-43.
- CHAPMAN, C. B., FISHER, J. N. & SPROULE, B. J. 1960. Behavior of stroke volume at rest and during exercise in human beings. *Journal of Clinical Investigation*, 39, 1208-1213.
- CHEN, Y., CSORDÁS, G., JOWDY, C., SCHNEIDER, T. G., CSORDÁS, N., WANG, W., LIU, Y., KOHLHAAS, M., MEISER, M., BERGEM, S., NERBONNE, J. M., DORN, G. W. & MAACK, C. 2012. Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses Via Interorganelle Ca<sup>2+</sup> Crosstalk. *Circulation Research*, 111, 863-875.
- COLELLA, M., GRISAN, F., ROBERT, V., TURNER, J. D., THOMAS, A. P. & POZZAN, T. 2008. Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency decoding in cardiac cell hypertrophy: Role of calcineurin/NFAT as Ca<sup>2+</sup> signal integrators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 2859-2864.
- CONRAD, N., JUDGE, A., TRAN, J., MOHSENI, H., HEDGE COTT, D., CRESPILO, A. P., ALLISON, M., HEMINGWAY, H., CLELAND, J. G., MCMURRAY, J. J. V. & RAHIMI, K. 2018. Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *The Lancet*, 391, 572-580.
- CORTASSA, S., AON, M. A., MARBÁN, E., WINSLOW, R. L. & O'ROURKE, B. 2003. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys J*, 84, 2734-55.
- DAVIDSON, S. M., YELLON, D. & DUCHEN, M. R. 2007. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol Biol*, 372, 421-30.
- DE LA FUENTE, S., FERNANDEZ-SANZ, C., VAIL, C., AGRA, E. J., HOLMSTROM, K., SUN, J., MISHRA, J., WILLIAMS, D., FINKEL, T., MURPHY, E., JOSEPH, S. K., SHEU, S.-S. & CSORDÁS, G. 2016. Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 23343-23362.
- DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A., TEARDO, E., SZABÒ, I. & RIZZUTO, R. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 336-340.
- DEDKOVA, E. N. & BLATTER, L. A. 2012. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 48-61.
- DEDKOVA, E. N. & BLATTER, L. A. 2013. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 58, 125-33.

- DENTON, R. M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 1309-1316.
- DENTON, R. M., MCCORMACK, J. G. & EDGELL, N. J. 1980. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ruthenium red on the Ca<sup>2+</sup>-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem J*, 190, 107-17.
- DESAI, K. H., SATO, R., SCHAUBLE, E., BARSH, G. S., KOBILKA, B. K. & BERNSTEIN, D. 1997. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol*, 272, H1053-61.
- DESPA, S., ISLAM, M. A., WEBER, C. R., POGWIZD, S. M. & BERS, D. M. 2002. Intracellular Na<sup>+</sup> Concentration Is Elevated in Heart Failure But Na/K Pump Function Is Unchanged. *Circulation*, 105, 2543-2548.
- DEWENTER, M., VON DER LIETH, A., KATUS, H. A. & BACKS, J. 2017. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 121, 1000-1020.
- DHEIN, S., MOHR, F. W. & DELMAR, M. 2005. *Practical methods in cardiovascular research*, Springer.
- DIBB, K. M., EISNER, D. A. & TRAFFORD, A. W. 2007. Regulation of systolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and cellular Ca<sup>2+</sup> flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca<sup>2+</sup>, L-type Ca<sup>2+</sup> current and diastolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *The Journal of Physiology*, 585, 579-592.
- DOLMETSCH, R. E., LEWIS, R. S., GOODNOW, C. C. & HEALY, J. I. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386, 855-858.
- DOMEI, T. L., ROBERTS, C. J., GIBSON, A. K., HANFT, L. M., MCDONALD, K. S. & SEGAL, S. S. 2014. Dantrolene suppresses spontaneous Ca<sup>2+</sup> release without altering excitation-contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307, H818-29.
- DOMEI, T. L., ZIMA, A. V., MAXWELL, J. T., HUK, S., MIGNERY, G. A. & BLATTER, L. A. 2008. IP<sub>3</sub> receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H596-604.
- DORN, G. W. & MAACK, C. 2013. SR and mitochondria: Calcium cross-talk between kissing cousins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55, 42-49.
- EISNER, D. A., CALDWELL, J. L., KISTAMÁS, K. & TRAFFORD, A. W. 2017. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research*, 121, 181-195.
- ELLIS, K. O., BUTTERFIELD, J. L., WESSELS, F. L. & CARPENTER, J. F. 1976. A comparison of skeletal, cardiac, and smooth muscle actions of dantrolene sodium--a skeletal muscle relaxant. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 224, 118-32.
- FEDERICO, M., VALVERDE, C. A., MATTIAZZI, A. & PALOMEQUE, J. 2020. Unbalance Between Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Uptake and Release: A First Step Toward Ca<sup>2+</sup> Triggered Arrhythmias and Cardiac Damage. *Frontiers in Physiology*, 10.

- FENG, S., LI, H., TAI, Y., HUANG, J., SU, Y., ABRAMOWITZ, J., ZHU, M. X., BIRNBAUMER, L. & WANG, Y. 2013. Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 11011-11016.
- FOSKETT, J. K., WHITE, C., CHEUNG, K.-H. & MAK, D.-O. D. 2007. Inositol Trisphosphate Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channels. *Physiological Reviews*, 87, 593-658.
- GEE, K. R., BROWN, K. A., CHEN, W. N. U., BISHOP-STEWART, J., GRAY, D. & JOHNSON, I. 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27, 97-106.
- GEORGAKOPOULOS, D. & KASS, D. A. 2001. Minimal force-frequency modulation of inotropy and relaxation of murine heart. *The Journal of Physiology*, 534, 535-545.
- GHEORGHIADE, M., SOPKO, G., DE LUCA, L., VELAZQUEZ, E. J., PARKER, J. D., BINKLEY, P. F., SADOWSKI, Z., GOLBA, K. S., PRIOR, D. L., ROULEAU, J. L. & BONOW, R. O. 2006. Navigating the Crossroads of Coronary Artery Disease and Heart Failure. *Circulation*, 114, 1202-1213.
- GIACOMELLO, M., DRAGO, I., BORTOLOZZI, M., SCORZETO, M., GIANELLE, A., PIZZO, P. & POZZAN, T. 2010. Ca<sup>2+</sup> Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca<sup>2+</sup> Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Molecular Cell*, 38, 280-290.
- GLANCY, B. & BALABAN, R. S. 2012. Role of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry*, 51, 2959-2973.
- GOONASEKERA, S. A. & MOKKENTIN, J. D. 2012. Unraveling the secrets of a double life: contractile versus signaling Ca<sup>2+</sup> in a cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 317-22.
- GROENEWEGEN, A., RUTTEN, F. H., MOSTERD, A. & HOES, A. W. 2020. Epidemiology of heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 22, 1342-1356.
- HARZHEIM, D., MOVASSAGH, M., FOO, R. S. Y., RITTER, O., TASHFEEN, A., CONWAY, S. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2009. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca<sup>2+</sup> transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 11406-11411.
- HARZHEIM, D., TALASIL, A., MOVASSAGH, M., FOO, R. S. Y., FIGG, N., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2010. Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels*, 4, 67-71.
- HIGAZI, D. R., FEARNLEY, C. J., DRAWNEL, F. M., TALASIL, A., CORPS, E. M., RITTER, O., MCDONALD, F., MIKOSHIBA, K., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2009. Endothelin-1-Stimulated InsP3-Induced Ca<sup>2+</sup> Release Is a Nexus for Hypertrophic Signaling in Cardiac Myocytes. *Molecular Cell*, 33, 472-482.
- HOLMSTRÖM, K. M., PAN, X., LIU, J. C., MENAZZA, S., LIU, J., NGUYEN, T. T., PAN, H., PARKS, R. J., ANDERSON, S., NOGUCHI, A., SPRINGER, D., MURPHY, E. & FINKEL, T. 2015. Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 85, 178-182.

- HUNT, H., TILÛNAITÉ, A., BASS, G., SOELLER, C., RODERICK, H. L., RAJAGOPAL, V. & CRAMPIN, E. J. 2020. Ca<sup>2+</sup> Release via IP<sub>3</sub> Receptors Shapes the Cardiac Ca<sup>2+</sup> Transient for Hypertrophic Signaling. *Biophysical Journal*, 119, 1178-1192.
- HÜSER, J., BLATTER, L. A. & SHEU, S.-S. 2000. Mitochondrial Calcium in Heart Cells: Beat-to-Beat Oscillations or Slow Integration of Cytosolic Transients? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32, 27-33.
- JIANG, D., ZHAO, L. & CLAPHAM, D. E. 2009. Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. *Science*, 326, 144-147.
- JONES, N. R., ROALFE, A. K., ADOKI, I., HOBBS, F. D. R. & TAYLOR, C. J. 2019. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Heart Failure*, 21, 1306-1325.
- KATZ, L. A., SWAIN, J. A., PORTMAN, M. A. & BALABAN, R. S. 1989. Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *Am J Physiol*, 256, H265-74.
- KEMINER, O. & PETERS, R. 1999. Permeability of Single Nuclear Pores. *Biophysical Journal*, 77, 217-228.
- KHALILIMEYBODI, A., DANESHMEHR, A. & SHARIF KASHANI, B. 2018. Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin/NFAT signaling in  $\beta$ -adrenergic-induced cardiac hypertrophy. *Gen Physiol Biophys*, 37, 41-56.
- KIESS, T.-O. & KOCKSKÄMPER, J. 2019. SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10.
- KIRICHOK, Y., KRAPIVINSKY, G. & CLAPHAM, D. E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427, 360-364.
- KOBAYASHI, S., YANO, M., SUETOMI, T., ONO, M., TATEISHI, H., MOCHIZUKI, M., XU, X., UCHINOUMI, H., OKUDA, S., YAMAMOTO, T., KOSEKI, N., KYUSHIKI, H., IKEMOTO, N. & MATSUZAKI, M. 2009. Dantrolene, a Therapeutic Agent for Malignant Hyperthermia, Markedly Improves the Function of Failing Cardiomyocytes by Stabilizing Interdomain Interactions Within the Ryanodine Receptor. *Journal of the American College of Cardiology*, 53, 1993-2005.
- KOCKSKAMPER, J., SEIDLMEYER, L., WALTHER, S., HELLENKAMP, K., MAIER, L. S. & PIESKE, B. 2008. Endothelin-1 enhances nuclear Ca<sup>2+</sup> transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores. *Journal of Cell Science*, 121, 186-195.
- KOCKSKÄMPER, J., ZIMA, A. V., RODERICK, H. L., PIESKE, B., BLATTER, L. A. & BOOTMAN, M. D. 2008. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45, 128-147.
- KOHLHAAS, M., LIU, T., KNOPP, A., ZELLER, T., ONG, M. F., BÖHM, M., O'ROURKE, B. & MAACK, C. 2010. Elevated Cytosolic Na<sup>+</sup> Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. *Circulation*, 121, 1606-1613.
- KOHLHAAS, M. & MAACK, C. 2013. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular Research*, 98, 259-268.
- KOHLHAAS, M., NICKEL, A. G. & MAACK, C. 2017. Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of Physiology*, 595, 3753-3763.



- KWONG, J. Q. 2017. The mitochondrial calcium uniporter in the heart: energetics and beyond. *The Journal of Physiology*, 595, 3743-3751.
- KWONG, J. Q., LU, X., CORRELL, R., SCHWANNEKAMP, J., R., V., M., S., A., Y., ZHANG, J., BERS, D. M. & MOLKENTIN, J. D. 2015. The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Reports*, 12, 15-22.
- LALA, A. & DESAI, A. S. 2014. The role of coronary artery disease in heart failure. *Heart Fail Clin*, 10, 353-65.
- LANGENDORFF, O. 1895. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflüger, Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere*, 61, 291-332.
- LEHNART, S. E., MAIER, L. S. & H., G. 2009. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Failure Reviews*, 14, 213-224.
- LEUCHT, A.-L. 2019. Einfluss der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme auf die nukleäre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in ventrikulären Kardiomyozyten der Maus. Universität Würzburg.
- LI, X., ZIMA, A. V., SHEIKH, F., BLATTER, L. A. & CHEN, J. 2005. Endothelin-1-Induced Arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> Signaling Is Abolished in Atrial Myocytes of Inositol-1,4,5-Trisphosphate(IP<sub>3</sub>)-Receptor Type 2-Deficient Mice. *Circulation Research*, 96, 1274-1281.
- LIPP, P., THOMAS, D., BERRIDGE, M. J. & BOOTMAN, M. D. 1997. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *Embo j*, 16, 7166-73.
- LJUBOJEVIC, S., RADULOVIC, S., LEITINGER, G., SEDEJ, S., SACHERER, M., HOLZER, M., WINKLER, C., PRITZ, E., MITTLER, T., SCHMIDT, A., SEREINIGG, M., WAKULA, P., ZISSIMOPOULOS, S., BISPING, E., POST, H., MARSCHKE, G., BOSSUYT, J., BERS, D. M., KOCKSKÄMPER, J. & PIESKE, B. 2014. Early Remodeling of Perinuclear Ca<sup>2+</sup> Stores and Nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> Signaling During the Development of Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation*, 130, 244-255.
- LJUBOJEVIĆ, S., WALTHER, S., ASGARZOEI, M., SEDEJ, S., PIESKE, B. & KOCKSKÄMPER, J. 2011. In Situ Calibration of Nucleoplasmic versus Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Concentration in Adult Cardiomyocytes. *Biophysical Journal*, 100, 2356-2366.
- LU, X., GINSBURG, K. S., KETTLEWELL, S., BOSSUYT, J., SMITH, G. L. & BERS, D. M. 2013. Measuring Local Gradients of Intramitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in Cardiac Myocytes During Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release. *Circulation Research*, 112, 424-431.
- LU, X., KWONG, J. Q., MOLKENTIN, J. D. & BERS, D. M. 2016. Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings. *Circulation Research*, 118, 834-841.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019. Taschenlehrbuch Histologie. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

- LUONGO, T. S., LAMBERT, J. P., YUAN, A., ZHANG, X., GROSS, P., SONG, J., SHANMUGHAPRIYA, S., GAO, E., JAIN, M., HOUSER, S. R., KOCH, W. J., CHEUNG, J., MADESH, M. & ELROD, J. 2015. The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Reports*, 12, 23-34.
- LYON, A. R., MACLEOD, K. T., ZHANG, Y., GARCIA, E., KANDA, G. K., LAB, M. J., KORCHEV, Y. E., HARDING, S. E. & GORELIK, J. 2009. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 6854-6859.
- MAACK, C., CORTASSA, S., AON, M. A., GANESAN, A. N., LIU, T. & O'ROURKE, B. 2006. Elevated Cytosolic Na<sup>+</sup> + Decreases Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 99, 172-182.
- MAACK, C. & O'ROURKE, B. 2007. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Research in Cardiology*, 102, 369-392.
- MACKAY, J. & MENSAH, G. A. 2004. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, World Health Organization.
- MACKENZIE, L., BOOTMAN, M. D., LAINE, M., BERRIDGE, M. J., THURING, J., HOLMES, A., LI, W. H. & LIPP, P. 2002. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca<sup>2+</sup> signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 541, 395-409.
- MARINELLI, F., ALMAGOR, L., HILLER, R., GILADI, M., KHANANSHVILI, D. & FARALDO-GÓMEZ, J. D. 2014. Sodium recognition by the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>exchanger in the outward-facing conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E5354-E5362.
- MEISSNER, A., SZYMANSKA, G. & MORGAN, J. P. 1996. Effects of dantrolene sodium on intracellular Ca<sup>2+</sup>-handling in normal and Ca<sup>2+</sup>-overloaded cardiac muscle. *European Journal of Pharmacology*, 316, 333-342.
- MICHELS, G., KHAN, I. F., ENDRES-BECKER, J., ROTTLAENDER, D., HERZIG, S., RUHPARWAR, A., WAHLERS, T. & HOPPE, U. C. 2009. Regulation of the Human Cardiac Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake by 2 Different Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Circulation*, 119, 2435-2443.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J.-R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. 1998. A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*, 93, 215-228.
- NAKAMURA, T. Y., IWATA, Y., ARAI, Y., KOMAMURA, K. & WAKABAYASHI, S. 2008. Activation of Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> Exchanger 1 Is Sufficient to Generate Ca<sup>2+</sup> Signals That Induce Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation Research*, 103, 891-899.
- NAKAYAMA, H., BODI, I., MAILLET, M., DESANTIAGO, J., DOMEIER, T. L., MIKOSHIBA, K., LORENZ, J. N., BLATTER, L. A., BERS, D. M. & MOLKENTIN, J. D. 2010. The IP<sub>3</sub> Receptor Regulates Cardiac Hypertrophy in Response to Select Stimuli. *Circulation Research*, 107, 659-666.
- NEUMANN, T., BIERMANN, J., ERBEL, R., NEUMANN, A., WASEM, J., ERTL, G. & DIETZ, R. 2009. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*, 106, 269-75.

- NICKEL, A., VON HARDENBERG, A., HOHL, M., KOHLHAAS, M., BECKER, J., REIL, J.-C., KAZAKOV, A., BONNEKOH, J., STADELMAIER, M., PUHL, S.-L., WAGNER, M., BOGESKI, I., CORTASSA, S., KAPPL, R., PASIEKA, B., LAFONTAINE, M., KÄSTNER, L., LIPP, P., ZELLER, T., MÜLLER, C., KNOPP, A., LAUFS, U., BÖHM, M., HOTH, M. & MAACK, C. 2015. Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metabolism*, 22, 472-484.
- O'ROURKE, B., ASHOK, D. & LIU, T. 2021. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in heart failure: Not enough or too much? *J Mol Cell Cardiol*, 151, 126-134.
- O'ROURKE, B. & BLATTER, L. A. 2009. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake: tortoise or hare? *J Mol Cell Cardiol*, 46, 767-74.
- O-UCHI, J., JHUN, B. S., HURST, S., BISETTO, S., GROSS, P., CHEN, M., KETTLEWELL, S., PARK, J., OYAMADA, H., SMITH, G. L., MURAYAMA, T. & SHEU, S. S. 2013. Overexpression of ryanodine receptor type 1 enhances mitochondrial fragmentation and Ca<sup>2+</sup>-induced ATP production in cardiac H9c2 myoblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, H1736-51.
- O-UCHI, J., PAN, S. & SHEU, S.-S. 2012. Molecular identities of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanism: Updated passwords for accessing mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-linked health and disease. *Journal of General Physiology*, 139, 435-443.
- OHLMEIER, C., MIKOLAJCZYK, R., FRICK, J., PRÜTZ, F., HAVERKAMP, W. & GARBE, E. 2015. Incidence, prevalence and 1-year all-cause mortality of heart failure in Germany: a study based on electronic healthcare data of more than six million persons. *Clinical Research in Cardiology*, 104, 688-696.
- OHMAE, M. 2011. Endothelin-1 levels in chronic congestive heart failure. *Wiener klinische Wochenschrift*, 123, 714-717.
- OLIVARES-FLOREZ, S., CZOLBE, M., RIEDIGER, F., SEIDLMEYER, L., WILLIAMS, T., NORDBECK, P., STRASEN, J., GLOCKER, C., JÄNSCH, M., EDER-NEGRIN, P., ARIAS-LOZA, P., MÜHLFELDER, M., PLAČKIĆ, J., HEINZE, K. G., MOLKENTIN, J. D., ENGELHARDT, S., KOCKSKÄMPER, J. & RITTER, O. 2018. Nuclear calcineurin is a sensor for detecting Ca<sup>2+</sup> release from the nuclear envelope via IP3R. *Journal of Molecular Medicine*, 96, 1239-1249.
- OXENOID, K., DONG, Y., CAO, C., CUI, T., SANCAK, Y., MARKHARD, A. L., GRABAREK, Z., KONG, L., LIU, Z., OUYANG, B., CONG, Y., MOOTHA, V. K. & CHOU, J. J. 2016. Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533, 269-273.
- PALTY, R., SILVERMAN, W. F., HERSHFINKEL, M., CAPORALE, T., SENSI, S. L., PARNIS, J., NOLTE, C., FISHMAN, D., SHOSHAN-BARMATZ, V., HERRMANN, S., KHANANSHVILI, D. & SEKLER, I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 436-441.
- PAN, X., LIU, J., NGUYEN, T. T., LIU, C., SUN, J., TENG, Y., FERGUSSON, M. M., ROVIRA, I. I., ALLEN, M., SPRINGER, D. A., APONTE, A. M., GUCEK, M., BALABAN, R. S., MURPHY, E. & FINKEL, T. 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*, 15, 1464-1472.

- PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2019. Physiologie. In: PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. (eds.) *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- PESKOFF, A. & LANGER, G. A. 1998. Calcium concentration and movement in the ventricular cardiac cell during an excitation-contraction cycle. *Biophys J*, 74, 153-74.
- PHILLIPS, D., COVIAN, R., APONTE, A. M., GLANCY, B., TAYLOR, J. F., CHESS, D. & BALABAN, R. S. 2012. Regulation of oxidative phosphorylation complex activity: effects of tissue-specific metabolic stress within an allometric series and acute changes in workload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302, R1034-48.
- PIESKE, B. 2003.  $[Na^+]_i$  handling in the failing human heart. *Cardiovascular Research*, 57, 874-886.
- PIESKE, B., BEYERMANN, B., BREU, V., LÖFFLER, B. M., SCHLOTTHAUER, K., MAIER, L. S., SCHMIDT-SCHWEDA, S., JUST, H. R. & HASENFUSS, G. 1999. Functional Effects of Endothelin and Regulation of Endothelin Receptors in Isolated Human Nonfailing and Failing Myocardium. *Circulation*, 99, 1802-1809.
- PIESKE, B., MAIER, L. S., PIACENTINO, V., WEISSER, J., HASENFUSS, G. & HOUSER, S. 2002. Rate Dependence of  $[Na^+]_i$  and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation*, 106, 447-453.
- PLAČKIĆ, J., PREISSEL, S., NIKONOVA, Y., PLUTEANU, F., HEIN, L. & KOCKSKÄMPER, J. 2016. Enhanced nucleoplasmic  $Ca^{2+}$  signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101, 58-68.
- PONIKOWSKI, P., VOORS, A. A., ANKER, S. D., BUENO, H., CLELAND, J. G. F., COATS, A. J. S., FALK, V., GONZÁLEZ-JUANATEY, J. R., HARJOLA, V.-P., JANKOWSKA, E. A., JESSUP, M., LINDE, C., NIHOYANNOPOULOS, P., PARISSIS, J. T., PIESKE, B., RILEY, J. P., ROSANO, G. M. C., RUILOPE, L. M., RUSCHITZKA, F., RUTTEN, F. H. & VAN DER MEER, P. 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, 37, 2129-2200.
- PROVEN, A. 2006. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *Journal of Cell Science*, 119, 3363-3375.
- RASMUSSEN, T. P., WU, Y., JOINER, M.-L. A., KOVAL, O. M., WILSON, N. R., LUCZAK, E. D., WANG, Q., CHEN, B., GAO, Z., ZHU, Z., WAGNER, B. A., SOTO, J., MCCORMICK, M. L., KUTSCHKE, W., WEISS, R. M., YU, L., BOUDREAU, R. L., ABEL, E. D., ZHAN, F., SPITZ, D. R., BUETTNER, G. R., SONG, L.-S., ZINGMAN, L. V. & ANDERSON, M. E. 2015. Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 9129-9134.
- REMUS, T. P., ZIMA, A. V., BOSSUYT, J., BARE, D. J., MARTIN, J. L., BLATTER, L. A., BERS, D. M. & MIGNERY, G. A. 2006. Biosensors to Measure Inositol 1,4,5-Trisphosphate Concentration in Living Cells with Spatiotemporal Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 608-616.

- RIZZUTO, R. & POZZAN, T. 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*, 86, 369-408.
- ROSCA, M. G. & HOPPEL, C. L. 2013. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 18, 607-622.
- RYU, S.-Y., BEUTNER, G., KINNALLY, K. W., DIRKSEN, R. T. & SHEU, S.-S. 2011. Single Channel Characterization of the Mitochondrial Ryanodine Receptor in Heart Mitoplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 21324-21329.
- SALAZAR-RAMÍREZ, F., RAMOS-MONDRAGÓN, R. & GARCÍA-RIVAS, G. 2021. Mitochondrial and Sarcoplasmic Reticulum Interconnection in Cardiac Arrhythmia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- SANCAK, Y., MARKHARD, A. L., KITAMI, T., KOVACS-BOGDAN, E., KAMER, K. J., UDESHI, N. D., CARR, S. A., CHAUDHURI, D., CLAPHAM, D. E., LI, A. A., CALVO, S. E., GOLDBERGER, O. & MOOTHA, V. K. 2013. EMRE Is an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex. *Science*, 342, 1379-1382.
- SEIDLMEYER, L. K., JUETTNER, V. V., KETTLEWELL, S., PAVLOV, E. V., BLATTER, L. A. & DEDKOVA, E. N. 2015. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia–reperfusion: contributions of Ca<sup>2+</sup>, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovascular Research*, 106, 237-248.
- SEIDLMEYER, L. K., KUHN, J., BERBNER, A., ARIAS-LOZA, P.-A., WILLIAMS, T., KASPAR, M., CZOLBE, M., KWONG, J. Q., MOKKENTIN, J. D., HEINZE, K. G., DEDKOVA, E. N. & RITTER, O. 2016. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum–mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca<sup>2+</sup>uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 112, 491-501.
- SEIDLMEYER, L. K., MAGES, C., BERBNER, A., EDER-NEGRIN, P., ARIAS-LOZA, P. A., KASPAR, M., SONG, M., DORN, G. W., KOHLHAAS, M., FRANTZ, S., MAACK, C., GERULL, B. & DEDKOVA, E. N. 2019. Mitofusin 2 Is Essential for IP<sub>3</sub>-Mediated SR/Mitochondria Metabolic Feedback in Ventricular Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10.
- SOELLER, C., JACOBS, M. D., JONES, K. T., ELLIS-DAVIES, G. C., DONALDSON, P. J. & CANNELL, M. B. 2003. Application of two-photon flash photolysis to reveal intercellular communication and intracellular Ca<sup>2+</sup> movements. *J Biomed Opt*, 8, 418-27.
- SPARAGNA, G. C., GUNTER, K. K., SHEU, S.-S. & GUNTER, T. E. 1995. Mitochondrial Calcium Uptake from Physiological-type Pulses of Calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 27510-27515.
- STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A. & LOPASCHUK, G. D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85, 1093-129.
- STATISTISCHES BUNDESAMT 2016. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Wiesbaden.
- STATISTISCHES BUNDESAMT 2017. Todesursachen in Deutschland. Wiesbaden.
- STÖRK, S., HANDROCK, R., JACOB, J., WALKER, J., CALADO, F., LAHOZ, R., HUPFER, S. & KLEBS, S. 2017. Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clinical Research in Cardiology*, 106, 913-922.

- SUGDEN, P. H. 2003. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 871-86.
- TANAI, E. & FRANTZ, S. 2015. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*, 6, 187-214.
- TERRITO, P. R., MOOTHA, V. K., FRENCH, S. A. & BALABAN, R. S. 2000. Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278, C423-35.
- TEWARI, S. G., CAMARA, A. K. S., STOWE, D. F. & DASH, R. K. 2014. Computational analysis of Ca<sup>2+</sup> dynamics in isolated cardiac mitochondria predicts two distinct modes of Ca<sup>2+</sup> uptake. *The Journal of Physiology*, 592, 1917-1930.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC 2010. The Molecular Probes® Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/mp-handbook-download.html>: Thermo Fisher Scientific.
- TRAFFORD, A. W., DÍAZ, M. E., NEGRETTI, N. & EISNER, D. A. 1997. Enhanced Ca<sup>2+</sup> current and decreased Ca<sup>2+</sup> efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content after depletion. *Circ Res*, 81, 477-84.
- VAN OORT, R. J., RESPRESS, J. L., LI, N., REYNOLDS, C., DE ALMEIDA, A. C., SKAPURA, D. G., DE WINDT, L. J. & WEHRENS, X. H. T. 2010. Accelerated Development of Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction in an RyR2-R176Q Knockin Mouse Model. *Hypertension*, 55, 932-938.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. 2008. Lichtmikroskopie-Theorie und Anwendung, on-line Ausgabe. *Skriptum, Universität Wien, Wien*. 29. Februar 2008 ed. <http://www.univie.ac.at/mikroskopie/>: University of Vienna.
- WEI, A.-C., LIU, T., WINSLOW, R. L. & O'ROURKE, B. 2012. Dynamics of matrix-free Ca<sup>2+</sup> in cardiac mitochondria: two components of Ca<sup>2+</sup> uptake and role of phosphate buffering. *Journal of General Physiology*, 139, 465-478.
- WEISSER-THOMAS, J. 2003. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 57, 974-985.
- WHO. 2017. *Cardiovascular diseases* [Online]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)): World Health Organisation. [Accessed 06.04.2021].
- WILHELM, S., GRÖBLER, B., GLUCH, M. & HEINZ, H. 2003. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. [https://www.cai.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/Mathematisch-Naturwissenschaftliche\\_Fakultaet/CAI/Literatur/Die\\_konfokale\\_Laser\\_Scanning\\_Mikroskopie.pdf](https://www.cai.hhu.de/fileadmin/redaktion/Fakultaeten/Mathematisch-Naturwissenschaftliche_Fakultaet/CAI/Literatur/Die_konfokale_Laser_Scanning_Mikroskopie.pdf): Carl Zeiss Jena.
- WILKINS, B. J., DAI, Y.-S., BUENO, O. F., PARSONS, S. A., XU, J., PLANK, D. M., JONES, F., KIMBALL, T. R. & MOKENTIN, J. D. 2004. Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 94, 110-118.
- WILLIAMS, G. S. B., BOYMAN, L., CHIKANDO, A. C., KHAIRALLAH, R. J. & LEDERER, W. J. 2013. Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 10479-10486.

- WINSLOW, R. L., WALKER, M. A. & GREENSTEIN, J. L. 2016. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8, 37-67.
- WU, X. & BERS, D. M. 2006. Sarcoplasmic Reticulum and Nuclear Envelope Are One Highly Interconnected Ca<sup>2+</sup> Store Throughout Cardiac Myocyte. *Circulation Research*, 99, 283-291.
- WU, X., ZHANG, T., BOSSUYT, J., LI, X., MCKINSEY, T. A., DEDMAN, J. R., N., O. E., J., C., H., B. J. & M., B. D. 2006. Local InsP<sub>3</sub>-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 675-682.
- WU, Y., RASMUSSEN, T. P., KOVAL, O. M., JOINER, M.-L. A., HALL, D. D., CHEN, B., LUCZAK, E. D., WANG, Q., ROKITA, A. G., WEHRENS, X. H. T., SONG, L.-S. & ANDERSON, M. E. 2015. The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. *Nature Communications*, 6, 6081.
- WULLSCHLEGER, M., BLANCH, J. & EGGER, M. 2017. Functional local crosstalk of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor- and ryanodine receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release in atrial cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 113, 542-552.
- WÜST, R. C. I., HELMES, M., MARTIN, J. L., VAN DER WARDT, T. J. T., MUSTERS, R. J. P., VAN DER VELDEN, J. & STIENEN, G. J. M. 2017. Rapid frequency-dependent changes in free mitochondrial calcium concentration in rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, 595, 2001-2019.
- XIE, A., SONG, Z., LIU, H., ZHOU, A., SHI, G., WANG, Q., GU, L., LIU, M., XIE, L. H., QU, Z. & DUDLEY, S. C. 2018. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Influx Contributes to Arrhythmic Risk in Nonischemic Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*, 7, e007805.
- ZHANG, T., MAIER, L. S., DALTON, N. D., MIYAMOTO, S., ROSS, J., BERS, D. M. & BROWN, J. H. 2003. The  $\delta$  C Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circulation Research*, 92, 912-919.
- ZHU, W., ZOU, Y., SHIOJIMA, I., KUDOH, S., AIKAWA, R., HAYASHI, D., MIZUKAMI, M., TOKO, H., SHIBASAKI, F., YAZAKI, Y., NAGAI, R. & KOMURO, I. 2000. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Kinase II and Calcineurin Play Critical Roles in Endothelin-1-induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 15239-15245.
- ZIMA, A. V., BARE, D. J., MIGNERY, G. A. & BLATTER, L. A. 2007. IP<sub>3</sub>-dependent nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 584, 601-611.
- ZIMA, A. V. & BLATTER, L. A. 2004. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *The Journal of Physiology*, 555, 607-615.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
β-AR	β-adrenerger Rezeptor
$\Delta\Psi_m$	Membranpotenzial
αMHC	engl. α-Myosin heavy chain
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethyl
AngII	Angiotensin II
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT1-R	Angiotensin 1-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyto</sub>	zytosolische Calciumkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>nuc</sub>	nukleäre Calciumkonzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>mito</sub>	mitochondriale Calciumkonzentration
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CICR	engl. Ca <sup>2+</sup> -induced Ca <sup>2+</sup> -release (Ca <sup>2+</sup> -induzierten Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung)
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAD	engl. early afterdepolarizations (frühe Depolarisation in der Repolarisationsphase eines Aktionspotenzials)
ECC	engl. excitation-contraction coupling (elektromechanische Kopplung)
ET-1	Endothelin 1
ETC	engl. electron transport chain (Atmungskette)
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FUNDC1	engl. FUN14 Domain containing 1



GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDP/GTP	Guanosin-di/tri-phosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
Hz	Hertz (1/s)
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
Iso	Isoproterenol
KO	engl. knock-out (Deletion)
L-Tubuli	longitudinale Tubuli des SR
MCU	Mitochondrialer Calcium-Uniporter
Mfn	Mitofusion
min	Minute
mol, mmol	Mol, Millimol
μmol, nmol	Mikromol, Nanomol
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mPTP	engl. mitochondrial permeability transition pore
mRyR1	mitochondrialer Ryanodin-Rezeptor 1
MW	Mittelwert
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
NCLX	mitochondrialer Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Li <sup>+</sup> permeabler Austauscher
NCX	sarkolemmaler Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
Nnt	mitochondriale NAD(P)-Transhydrogenase
Nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
OMM	engl. outer mitochondrial membrane (äußere Mitochondrienmembran)
PCR	engl. polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
ROS	engl. reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Ru360	Ruthenium Red 360
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
s, ms	Sekunde, Millisekunde
SEM	engl. standard error of the mean (Standardfehler)
SERCA	engl. sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubuli	Transversal Tubuli
WHO	engl. World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Elektromechanische Kopplung im Herzmuskel .....	5
Abbildung 2:	Mitochondrialer Energiestoffwechsel und antioxidative Kapazität.....	9
Abbildung 3:	Effekte einer gestörten mitochondrialen Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme auf Redoxstatus und Energiehaushalt .....	14
Abbildung 4:	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> auf die hypertrophe Genexpression.....	21
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.....	40
Abbildung 6:	Schematisches Prinzip und Strahlengang des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.....	41
Abbildung 7:	Messung von zytosolischen und nukleären Fluoreszenzsignalen mittels Line Scan .....	44
Abbildung 8:	Expressionslevel von MCU in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten ....	47
Abbildung 9:	Einfluss von Isoprenalin und Dantrolen auf cytosolische Ca <sup>2+</sup> -Transienten .....	49
Abbildung 10:	Mitochondriale Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten bei 1 Hz.....	51
Abbildung 11:	Zytosolisches Ca <sup>2+</sup> -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten in WT- und MCU KO-Mäusen 1 Hz .....	53
Abbildung 12:	Nukleäres Ca <sup>2+</sup> -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten in WT- und MCU KO-Mäusen 1 Hz .....	57
Abbildung 13:	Verlauf des zytosolischen und nukleären Ca <sup>2+</sup> -Signals in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten von WT-Mäusen mit Frequenzerhöhung von 1 Hz auf 4 Hz .....	61
Abbildung 14:	Mitochondriale Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme in WT- und MCU KO-Kardiomyozyten bei 4 Hz Stimulation.....	63
Abbildung 15:	Zytosolisches Ca <sup>2+</sup> -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten von WT-Mäusen bei 4 Hz .....	66
Abbildung 16:	Nukleäres Ca <sup>2+</sup> -Signal ventrikulärer Kardiomyozyten von WT-Mäusen bei 4 Hz .....	68
Abbildung 17:	Kaplan-Meier-Kurve zum Auftreten von arrhythmischen/instabilen Kardiomyozyten in der WT-Gruppe.....	71
Abbildung 18:	Übersicht intrazellulärer Signalwege .....	73
Abbildung 19:	Effekt von Dantrolen auf den intrazellulären Calciumstoffwechsel.....	74
Abbildung 20:	Duty cycle .....	91

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte .....	25
Tabelle 2:	Chemikalien und Substanzen .....	26
Tabelle 3:	Kommerzielle Kits und Lösungen.....	27
Tabelle 4:	PCR Primer .....	27
Tabelle 5:	RT-PCR .....	28
Tabelle 6:	Western Blot Antikörper .....	28
Tabelle 7:	Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 8:	Zusammensetzung der Stocklösung .....	29
Tabelle 9:	Zusammensetzung der Perfusionslösung .....	29
Tabelle 10:	Zusammensetzung der Verdaulösung .....	29
Tabelle 11:	Zusammensetzung der Stopplösungen 1 und 2.....	29
Tabelle 12:	Zusammensetzung der Calcium-Lösungen 1-3.....	30
Tabelle 13:	Zusammensetzung der Tyrode-Lösung .....	30
Tabelle 14:	Zusammensetzung der 50xTAE-Lösung .....	31
Tabelle 15:	MHC-Puffer.....	31
Tabelle 16:	Trenngel (7,5%) .....	31
Tabelle 17:	Sammelgel (4%) .....	32
Tabelle 18:	Sample-Puffer.....	32
Tabelle 19:	5xElektrophorese-Puffer .....	32
Tabelle 20:	5xPBS-Lösung.....	32
Tabelle 21:	Reaktionsansatz PCR.....	33
Tabelle 22:	PCR – Programm Thermocycler .....	34
Tabelle 23:	Arrhythmische oder instabile Zellen der WT-Gruppe bei 4 Hz Stimulationsfrequenz .....	70

#### **IV Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben. Einige Personen möchte ich besonders herausheben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Maack für die Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung. Mit seinem Elan und seinen kritischen aber stets konstruktiven Anregungen hat er mich immer dabei unterstützt, eigenständig zu arbeiten und dieses Projekt abzuschließen.

Meiner Betreuerin Priv.-Doz. Dr. Lea Seidlmayer danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas und die langjährige Betreuung.

Ich danke Dr. Michael Kohlhaas für seine geduldige Unterstützung, seine wertvollen Ratschläge und die vielen verständnis- und humorvollen Worte.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Maack und Gerull danken, die mich herzlich aufgenommen und neben der kompetenten Mithilfe auch eine sehr gute (Arbeits-)Atmosphäre geboten haben. Das gilt besonders für Annette Berbner, ohne deren Expertise und Hilfe im Labor das Projekt nicht realisierbar gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Familie: Meinen Eltern, Petra und Egid, die mich immer gestützt und mir Kraft gegeben und meinen Weg so erst möglich gemacht haben. Meinen Schwestern, Miriam und Isabel, ihr wart immer da für mich und habt mich ermutigt, den Blick nach vorne zu richten. Dem Familienkreis, in dem ich stets ein offenes Ohr und unterstützende Worte gefunden habe.

Mein Dank geht an meine Freunde nah und fern, es tut gut, euch an meiner Seite zu wissen.

Ich danke von ganzem Herzen Michael, der mich geduldig und verständnisvoll begleitet und zur rechten Zeit mahnende wie ermutigende Worte gefunden hat. Merci beaucoup!