Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Einfluss der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme auf die nukleäre Ca²⁺-Konzentration in ventrikulären Kardiomyozyten der Maus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annalena Leucht

aus Schwäbisch Hall

Würzburg, Dezember 2019



Referent:	Prof. Dr. Oliver Ritter
Korreferent:	Prof. Dr. Christoph Maack
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:01.12.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnisiii
II.	Tabellenverzeichnisiv
1.	Einleitung 1
1.1.	Elektromechanische Kopplung1
1.2.	Der mitochondriale Ca ²⁺ -Haushalt1
1.	2.1. Ca ²⁺ -Aufnahme in die Mitochondrienmatrix
1.	2.2. Ca ²⁺ -Abgabe aus der Mitochondrienmatrix
1.3.	IP ₃ -Signalweg3
1.4.	Ca ²⁺ -Regulation im Zellkern4
1.5.	Energiehaushalt der Zelle5
1.6.	Atmungskette – Funktionsweise und Regulation5
1.7.	Gentranskription – Funktionsweise und Regulation, sowie als Grundlage von
	Erkrankungen/hypertrophes Signalling6
1.8.	Zielsetzung der Arbeit
2.	Methoden 10
2. 2.1.	Methoden
2. 2.1. 2.2.	Methoden10Kardiomyozytenisolation10Substanzen und Lösungen11
2. 2.1. 2.2. 2.	Methoden
2. 2.1. 2.2. 2. 2.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13
2. 2.1. 2.2. 2. 2. 2.3.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14
2. 2.1. 2.2. 2. 2. 2.3. 2.4.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15
2. 2.1. 2.2. 2. 2. 2.3. 2.4. 2.5.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15 Messung der [Ca ²⁺]-Transienten 16
2. 2.1. 2.2. 2. 2.3. 2.4. 2.5. 2.6.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15 Messung der [Ca ²⁺]-Transienten 16 Statistik 18
2. 2.1. 2.2. 2. 2.3. 2.4. 2.5. 2.6. 3.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15 Messung der [Ca ²⁺]-Transienten 16 Statistik 18 Material 19
2. 2.1. 2.2. 2. 2.3. 2.4. 2.5. 2.6. 3. 4.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15 Messung der [Ca ²⁺]-Transienten 16 Statistik 18 Material 19 Ergebnisse 21
2. 2.1. 2.2. 2. 2.3. 2.3. 2.4. 2.5. 2.6. 3. 4. 4.1.	Methoden 10 Kardiomyozytenisolation 10 Substanzen und Lösungen 11 2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung 11 2.2. Konfokale Mikroskopie 13 Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie 14 Grundlagen der Fluoreszenz 15 Messung der [Ca ²⁺]-Transienten 16 Statistik 18 Material 19 Ergebnisse 21 Konzentrationsabhängige Wirkung von Angiotensin II auf die diastolische

4.2.	Ca ²⁺ -Aufnahme in die Mitochondrien	23
4.3.	Einfluss der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahmeblocker auf Kardiomyozyten	24
4.	.3.1. Einfluss auf die mitochondriale Ca ²⁺ -Konzentration	24
4.	.3.2. Einfluss der mitochondrialen Blockierung auf die nukleäre	und
	zytoplasmatische Ca ²⁺ -Konzentration ohne Ang II Stimulation	25
4.4.	Einfluss der mitochondrialen Blockierung auf das nukleäre	und
	zytoplasmatische Ca ²⁺ nach Ang II Stimulation	27
5.	Diskussion	29
6.	Zusammenfassung	34
7.	Literaturverzeichnis	35
8.	Abkürzungsverzeichnis	39
9.	Konferenzbeitrag; Stipendium	41

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CaMKII Signalweg (nach Abbildung in (Wu, Zhang, Bossuyt, et al., 2006)) 7
Abbildung 2: Calcineurin Signalweg nach (Molkentin, Lu, Antos, et al., 1998)
Abbildung 3: Strahlengang konfokales Mikroskop; nach John Innes Centre
Abbildung 4: Line Scan (nach (Ljubojevic, Radulovic, Leitinger, et al., 2014))
Abbildung 5: Effekt der IP ₃ -vermittelten Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem SR auf die diastolische
zytosolische und nukleäre Ca ²⁺ -Konzentration
Abbildung 6: Effekt von Angiotensin auf das mitochondriale Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_m$) in elektrisch
stimulierten Myozyten23
Abbildung 7: Einfluss der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahmeblocker auf das [Ca ²] _m 24
Abbildung 8: Effekte der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahmeblocker in unbehandelten
Kardiomyozyten auf das Zytosol, den Zellkern und die Kinetik
Kardiomyozyten auf das Zytosol, den Zellkern und die Kinetik 26 Abbildung 9: Effekte der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahme-Blocker auf das diastolische
Kardiomyozyten auf das Zytosol, den Zellkern und die Kinetik 26 Abbildung 9: Effekte der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahme-Blocker auf das diastolische [Ca ²⁺] _{cyto+nuc} in Ang II behandelten Kardiomyozyten

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stocklösung (1 Liter) für Kardiomyozytenisolierung	. 11
Tabelle 2: Perfusionslösung	. 11
Tabelle 3: Verdaulösung	. 11
Tabelle 4: Stop-1 Lösung	. 12
Tabelle 5: Stop-2 Lösung	. 12
Tabelle 6: PBS	. 12
Tabelle 7: Tyrode	. 13
Tabelle 8: Lösungen für Konfokalmikroskopie	. 13

1. Einleitung

1.1.Elektromechanische Kopplung

Als elektromechanische Kopplung wird der Prozess bezeichnet, der vom Aktionspotential zur Kontraktion des Kardiomyozyten führt. Durch die Depolarisierung der Zellmembran werden spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle geöffnet, die zu einem Ca²⁺-Einstrom führen. Durch diesen wird die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch benachbarte Typ 2 Ryanodinrezeptoren (RyR) getriggert. Die erhöhte Ca²⁺-Konzentration führt dazu, dass Ca²⁺ an Troponin C bindet und Aktin- und Myosinfilamente, der sogenannte kontraktile Apparat, ineinander gleiten können (Bers, 2002).

Um die Kontraktion zu stoppen und der Zelle die Relaxation zu ermöglichen, muss das Ca²⁺ wieder aus dem Zytoplasma transportiert werden. Dazu gibt es vier Wege, die einen unterschiedlichen Stellenwert einnehmen: 1) über die Sarkoplasmatische Ca²⁺ ATPase (SERCA) zurück in das SR, 2) aus der Zelle heraus über die sarkolemmale Ca²⁺-ATPase, 3) über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) und 4) die Aufnahme in die Mitochondrien (Bassani, Bassani & Bers, 1992). Der Großteil des Ca²⁺ wird über die SERCA wieder in das SR gepumpt und nur ein kleiner Teil wird in die Mitochondrien aufgenommen. Die vorübergehende [Ca²⁺]-Erhöhung in Myozyten wird als [Ca²⁺]-Transient bezeichnet.

1.2.Der mitochondriale Ca²⁺-Haushalt

Mitochondrien sind große Zellorganellen, die in der Lage sind Energie zu produzieren. Sie haben eine Doppelmembran, welche die Mitochondrien in 2 Kompartimente teilt: den Intermembranraum und die Matrix. Mitochondrien können Ca²⁺ aufnehmen und speichern. Die äußere Membran ist für Ca²⁺-Ionen aufgrund großer Kanäle (sog. "Voltage dependent anion channel" (VDAC)) permeabel. Im Intermembranraum findet sich daher dieselbe Konzentration an Ca²⁺-Ionen, wie im Zytoplasma. Die innere Mitochondrienmembran ist für Ca²⁺-Ionen impermeabel. So kann die Ca²⁺-Konzentration in der Matrix exakt kontrolliert werden und ihre regulativen Funktionen erfüllen. Die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration reguliert die ATP-Produktion, schützt Kardiomyozyten vor vorübergehender Ca²⁺-Überladung und vermittelt die Signalwege für den Zelltod. Trotz dieser wichtigen Funktionen wird die physiologische mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme kontrovers diskutiert. Es ist bisher noch nicht abschließend geklärt, ob das Ca²⁺ im Mitochondrium ([Ca²⁺]_{mito}) langsam akkumuliert oder ob es wie der zytosolische [Ca²⁺]-Transient oszilliert (Dedkova & Blatter, 2013).

1.2.1. Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrienmatrix

Zur Ca²⁺ Aufnahme exprimieren Mitochondrien verschiedene Ionenkanäle auf ihrer inneren Membran. Der wichtigste Transportweg ist der MCU. Die Aufnahme in die Mitochondrien wird durch den hohen elektrochemischen Gradienten von -180 mV angetrieben. Der MCU besteht aus zwei transmembranen Domänen, die die Pore des MCU-Komplexes bildet. Weitere Moleküle gehören zu dem Komplex und regulieren die Ca²⁺-Aufnahme. Dazu gehören MICU1, MICU2, MCUR1 und EMRE (Foskett & Philipson, 2015). Die Affinität des MCU für Ca²⁺ ist bei der durchschnittlichen systolischen Ca²⁺-Konzentration von 500 nM im Zytoplasma gering (Bers, 2002). In Myozyten liegen jedoch das SR und Mitochondrien nur etwa 50-100 nm auseinander, so dass sich Mikrodomänen ausbilden, in denen die Ca²⁺-Konzentration auf 10-20 µM ansteigt. So kann ein signifikanter Einstrom über MCU-Kanäle stattfinden. Dieser beträgt nur etwa ein Prozent des gesamten Ca²⁺-Ausstroms aus dem Zytoplasma. Bei erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen, wenn Kanäle wie SERCA und NCX gesättigt sind, kann ein größerer Anteil an Ca²⁺ in Mitochondrien gepumpt werden (Williams, Boyman, Chikando, *et al.*, 2013).

Ein weiterer Transporter in der inneren Mitochondrienmembran ist der mitochondriale Ryanodinrezeptor (mRyR) (Beutner, Sharma, Giovannucci, *et al.*, 2001). Dieser ist dem RyR Typ I, der vor allem im Skelettmuskel exprimiert wird, sehr ähnlich. Sobald Ca²⁺ aus dem SR freigesetzt wird, wird der mRyR aktiviert und erreicht bei einer Konzentration von 10-40 μ M seine maximale Aktivität (Beutner, Sharma, Lin, *et al.*, 2005).

2

1.2.2. Ca²⁺-Abgabe aus der Mitochondrienmatrix

Die Ca²⁺-Abgabe aus dem Matrixraum der Mitochondrien in das Zytoplasma kann natriumabhängig oder –unabhängig erfolgen. In kardialen Mitochondrien wird hauptsächlich der natriumabhängige Weg über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (mNCX) genutzt. Die Natriumabhängigkeit des mNCX ist sigmoidal. Bei einer Natriumkonzentration von 4-8 mM ist die halbmaximale Aktivität erreicht. Das ist die Natriumkonzentration, die in ruhenden Kardiomyozyten physiologisch ist (Bers, Barry & Despa, 2003). Trotz intensiver Forschung ist bisher noch nicht abschließend geklärt, ob für ein Ca²⁺-Ion zwei oder drei Na⁺-Ionen ausgetauscht werden. Das hat Relevanz, da der Transporter entweder elektrisch neutral oder eine positive Nettoladung transportiert. Die meisten Daten sprechen dafür, dass drei Na⁺-Ionen gegen ein Ca²⁺ -Ion ausgetauscht werden. Das hat zur Folge, dass der elektrochemische Gradient zur Ca²⁺-Aufnahme reduziert wird und somit unter physiologischen Bedingungen, die Ca²⁺-Abgabe aus Mitochondrien favorisiert wird.

1.3.IP₃-Signalweg

Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) ist ein Second Messenger, der Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, wie dem SR, durch IP₃-Rezeptoren freisetzen kann. Es wird gebildet durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat (PIP₂) durch die Phospholipase C. Signalstoffe wie Angiotensin II (Ang II) und Endothelin-1 (ET-1) lösen diese Signalkaskade aus. Da IP₃ wasserlöslich ist, kann der Signalstoff von der Plasmamembran zu den entsprechenden Rezeptoren diffundieren.

Von den Rezeptoren für IP₃ sind 3 Subtypen bekannt. Im Herz wird jedoch hauptsächlich Typ 2 exprimiert (Perez, Ramos-Franco, Fill, *et al.*, 1997). Sie sind im Vergleich zu Ryanodinrezeptoren viel seltener in Ventrikelzellen vorhanden. Auf einen IP₃R kommen in etwa hundert RyR (Kockskämper, Zima, Roderick, *et al.*, 2008). Daher war lange unklar und ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, ob und welchen Effekt IP₃R in Kardiomyozyten haben, da die Ca²⁺ Menge die freigesetzt wird, im Vergleich zu den RyR sehr gering ist. Es hat sich gezeigt, dass die Amplitude des Ca²⁺-Transienten durch IP₃ erhöht wird (Domeier, Zima, Maxwell, *et al.*, 2008). Des Weiteren haben sie einen positiv inotropen Effekt, indem sie das aus dem SR freigesetzte Ca²⁺ erhöhen. Hierbei resultiert eine Ca²⁺-Freisetzung über den IP₃R am ehesten in einen Anstieg der diastolischen Ca²⁺-Konzentration, wohingegen die systolische Ca²⁺-Freisetzung unbeeinflusst bleibt. Für Endothelin-1 konnte gezeigt werden, dass es spontane diastolische Ca²⁺-Transienten auslöst, was zu Arrhythmien führen kann (Proven, Roderick, Conway, *et al.*, 2006).

1.4.Ca²⁺-Regulation im Zellkern

Der Kern wird aus einer Kernhülle gebildet. Diese steht in Kontakt mit dem SR und dient als Ca²⁺-Speicher. Die Kernhülle wird von den Kernporenkomplexen durchbrochen. Die nukleäre Ca²⁺-Konzentration, die wichtig für die Regulation der Gentranskription im Zellkern ist, besteht aus einem passiven und einem aktiven Teil. Während eines zytoplasmatischen Ca²⁺-Transienten kommt es durch Diffusion durch den Kernporenkomplex zu einem Anstieg der nukleären Ca²⁺-Konzentration. Somit kommt es durch jeden zytoplasmatischen Ca²⁺-Transienten zu einem nukleären Ca²⁺-Transienten (Kockskämper, Seidlmayer, Walther, *et al.*, 2008).

Der aktive Teil der Regulation des nukleären Ca²⁺ wird über Rezeptoren gesteuert. Ein großer Anteil der IP₃-Rezeptoren liegt auf der Kernhülle (Zima, Bare, Mignery, *et al.*, 2007) und anderen Membranen in der Nähe des Kerns. So kann aus der Kernhülle direkt das Ca²⁺ in den Kern freigesetzt werden und dadurch die z.B. hypertrophe Gentranskription aktiviert werden (Kockskämper, Seidlmayer, Walther, *et al.*, 2008). Auch ET-1 und Ang II-Rezeptoren liegen auf der äußeren Kernmembran und können nach Stimulation IP₃ vermittelt, das nukleäre Ca²⁺ erhöhen (Ljubojevic & Bers, 2015).

Zur Reduktion der nukleären Ca²⁺-Konzentration muss Ca²⁺ erst aus dem Zellkern diffundieren. Da SERCA hauptsächlich auf der äußeren Kernhülle lokalisiert ist, kann Ca²⁺ erst außerhalb des Zellkerns wieder in Ca²⁺-Speicher wie das SR und die Kernhülle aufgenommen werden. Das hat zur Folge, dass der nukleäre Ca²⁺-Transient eine langsamere Kinetik hat (Ljubojevic, Radulovic, Leitinger, *et al.*, 2014).

4

1.5. Energiehaushalt der Zelle

Die Arbeitsbelastung einer Myozyte verändert sich ständig. Daher muss die Synthese von ATP ständig dem aktuellen Bedarf angepasst werden. Zeitgleich muss auch die Produktion von NADH, dem Hauptelektronendonor der Atmungskette, gesteigert werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass die ATP-Produktion über ADP und Pi gesteuert wird. Durch die Hydrolyse von ATP wird ADP und P_i frei, das über einen Feedbackmechanismus die Produktion von ATP steigert (Chance & Williams, 1955). Diese Versuche wurden an isolierten Mitochondrien durchgeführt und konnten in intakten Herzen nicht bestätigt werden. In intakten Kardiomyozyten hat sich gezeigt, dass die metabolischen Intermediate trotz erhöhtem Energieverbrauchs nahezu konstant bleiben und somit nicht über einen Feedbackmechanismus geregelt werden. Bei der Frage, wie die Zelle stattdessen auf unterschiedliche Energieanforderungen reagieren kann, wurde ein Modell der parallelen Aktivierung entwickelt (Balaban, 2002). Dieses Modell geht von einem Signal aus, das sowohl den Verbrauch als auch die Produktion von ATP stimuliert. Ein Signalmolekül, das dafür in Frage kommt, ist Ca²⁺. Ca²⁺ aktiviert die Enzyme, die hauptsächlich für den Verbrauch von ATP verantwortlich sind. Das sind zum einen die Myosin-ATPase und zum anderen die SERCA. Gleichzeitig stimuliert Ca²⁺ einige wichtige Dehydrogenasen im Zitratzyklus, wie die Pyruvatdehydrogenase und die Isocitratdehydrogenase, die wichtig für die Energieproduktion sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch Ca²⁺ die F₀/F₁-ATPase aktiviert wird (Territo, Mootha, French, et al., 2000).

1.6.Atmungskette – Funktionsweise und Regulation

Eine wichtige Funktion der Mitochondrien besteht darin, der Zelle Energie bereitzustellen. Dies wird durch die Atmungskette gewährleistet. Sie ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus 4 Komplexen. Die Aufgabe der Atmungskette besteht darin, einen Protonengradienten zwischen der Matrix und dem Intermembranraum aufzubauen. Die treibende Kraft dafür sind Elektronen, die von Reduktionsäquivalenten wie NADH und FADH₂ über die verschiedenen Komplexe der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden. Dabei werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Die Reduktionsäquivalente entstehen bei der Glykolyse, im Zitratzyklus und anderen Stoffwechselwegen. Der Protonengradient dient als treibende Kraft, um die F₀/F₁-ATPase anzutreiben, die aus ADP und anorganischem Phosphat ATP bildet. Der Sauerstoff reagiert mit zwei Protonen zu Wasser.

Die Aktivität der Atmungskette wird über den ADP-Gehalt der Zelle und den Protonengradienten gesteuert. Ist der ADP-Gehalt hoch und wird deswegen viel ATP gebildet, flacht der Protonengradient ab. So wird weniger Energie benötigt, um Protonen in den Intermembranraum zu pumpen, dadurch können die Protonen schneller in den Intermembranraum gepumpt werden. Wenn dagegen viel ATP vorliegt, ist auch der Protonengradient hoch und die benötigte Energie, um weitere Protonen in den Intermembranraum zu groß, sodass die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen kommt (Schartl, Gessler & Eckardstein, 2013, p.182-202).

1.7.Gentranskription – Funktionsweise und Regulation, sowie als Grundlage von Erkrankungen/hypertrophes Signalling

Bei der Gentranskription wird DNA in mRNA umgeschrieben und im Zytoplasma an den Ribosomen in Proteine übersetzt. Um die Transkription zu starten, gibt es spezifische DNA-Sequenzen sogenannte Promotoren, an denen RNA-Polymerasen binden können. Um die Affinität der RNA-Polymerase zu erhöhen, binden zusätzlich Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Darüber kann die Ausprägung der Transkription gesteuert werden.

Wie bei der elektromechanischen Kopplung spielt Ca²⁺ auch bei der Regulation der Transkription eine wichtige Rolle. Dabei werden hauptsächlich pro-hypertrophe Transkriptionswege reguliert. Der Einfluss des Ca²⁺ auf die Gentranskription erfolgt über mehrere Wege.

Ein Weg führt über die Ca^{2+/}Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII). Durch lokale Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration durch IP₃R im Zellkern bindet Calmodulin (CaM) an die CaMKII. Dadurch wird die CaMKII aktiviert. Zusätzlich autophosphoryliert sich die

6

CaMKII, wodurch der aktivierte Zustand länger bestehen bleibt. Die Stimulation zur Autophosphorylation ist abhängig von der Frequenz des Ca²⁺-Transienten (Koninck & Schulman, 1998). Im aktivierten Zustand kann die CaMKII HDAC5 phosphorylieren, das daraufhin aus dem Zellkern exportiert wird. HDAC5 ist ein Repressor der Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF-2) abhängigen Transkription. Durch den Export aus dem Zellkern von HDAC5 wird seine inhibierende Wirkung aufgehoben und dadurch die prohypertrophe Gentranskription angeschaltet (Wu, Zhang, Bossuyt, *et al.*, 2006). PCaMKII phosphoryliert auch weitere Transkriptionsfaktoren wie CREB (cAMP response element binding protein). CREB fördert die Transkription von c-fos (Maier & Bers, 2002).



Abbildung 1: CaMKII Signalweg (nach Abbildung in (*Wu, Zhang, Bossuyt,* et al., 2006)) Durch Erhöhung des [Ca²⁺] im Zellkern durch IP₃R bindet Calmodulin (CaM) an die CaMKII. Das führt zu einer Aktivierung der CaMKII. Nun kann die CaMKII HDAC5 phosphorylieren, das daraufhin aus dem Zellkern exportiert wird. Dadurch wird seine inhibierende Wirkung aufgehoben und die prohypertrophe Gentranskription angeschaltet.

Ein weiterer Weg führt über Calcineurin. Calcineurin wird über die Bindung von Ca²⁺ und CaM aktiviert und dephosphoryliert NFAT (nuclear factor of activated T-cells), das im Zytoplasma der Kardiomyozyten vorliegt. In Kardiomyozyten liegen vier Isoformen des NFAT (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4) vor (Rooij, Doevendans, Theije, *et al.*, 2002). Die häufigste Isoform in Kardiomyozyten ist NFATc2 (Bourajjaj, Armand, Martins, *et al.*, 2008). Jede dieser Isoformen des NFAT kann von Calcineurin dephosphoryliert werden. Daraufhin wird das dephosphorylierte NFAT in den Kern transportiert und wirkt zusammen mit GATA4 als Transkriptionsfaktor. Diese Aktivierung spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung der kardialen Hypertrophie. Ein Gen, das dadurch verstärkt transkribiert wird, ist das BNP (Molkentin, Lu, Antos, *et al.*, 1998) (Rooij, Doevendans, Theije, *et al.*, 2002).



Abbildung 2: Calcineurin Signalweg nach (Molkentin, Lu, Antos, et al., 1998)

Calcineurin wird über die Bindung von Ca²⁺ und CaM aktiviert und dephosphoryliert NFAT. Das dephosphorylierte NFAT wird in den Kern transportiert und wirkt zusammen mit GATA4 als Transkriptionsfaktor.

1.8.Zielsetzung der Arbeit

Mitochondrien fungieren über die Aufnahme von Ca²⁺ als Ca²⁺-Puffer der Zelle. Sie können so direkt die zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration beeinflussen.

Der nukleäre Ca²⁺-Transient ist ein wichtiger Regulator der Gentranskription. Er setzt sich im Wesentlichen aus einer aktiven und einer passiven Komponente zusammen. Die aktive Komponente resultiert aus einer gezielten Freisetzung von Ca²⁺ aus der Kernhülle in das Nukleosol. Die passive Komponente besteht aus der Diffusion des zytosolischen Ca²⁺ durch die Kernporen und ist somit unmittelbar von der Höhe des zytosolischen Ca²⁺. Transienten abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern Mitochondrien über die Beeinflussung der passiven Komponente Einfluss auf die nukleäre Ca²⁺-Konzentration und in der Konsequenz auf die Gentranskription nehmen. Unsere Hypothese ist, dass intakte Mitochondrien über die Aufnahme von Ca²⁺ die Entstehung von Hypertrophie der Kardiomyozyten verzögern können.

2. Methoden

2.1.Kardiomyozytenisolation

Vor der Kardiomyozytenisolierung wurden die Mäuse mittels 300 µl Isofluran betäubt und anschließend mit Hilfe einer Pinzette die cervicale Dislokation durchgeführt. Nun erfolgte die Entnahme des Herzens. Dieses wurde in gekühlter Perfusionslösung (s. Tabelle 2) gewaschen. Die Aorta wurde kanüliert und das Herz mit einem Seidenfaden fixiert. Nun wurde das Herz mit kalter Perfusionslösung retrograd perfundiert. Dabei sollten die Koronarien blutleer werden.

Im Anschluss wurde das Herz an ein vorgewärmtes Langendorff-Perfusionssystem angeschlossen. Zunächst wurde das Herz 3 min lang mit der vorgewärmten Perfusionslösung perfundiert mit einer Rate von 100 ml/h. Anschließend wurde 12 Minuten mit einer Verdaulösung (s. Tabelle 3), die Trypsin und Liberase enthielt, mit einer Rate von 100,6 ml/h perfundiert. Dadurch lösen sich die Zell-Zell-Verbindungen. Das Herz wurde zerschnitten und die Zellen durch vorsichtige mechanische Manipulation aus dem Verband gelöst. Die Suspension wurde anschließend gefiltert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Ca²⁺-Lösungen verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen recalcifiziert. Hierbei erhielten die Zellen Zeit auf den Boden des Reagenzglases abzusinken und ein festes Pellet zu bilden. Der Überstand wurde dann entfernt und durch Calciumlösungen mit steigender Calciumkonzentration ersetzt. Nach jeder Zugabe von Calciumlösung wurden die Zellen resuspendiert. Die Calciumlösungen hatten die Konzentration 0,125, 0,25 und 0,5 mM.

2.2. Substanzen und Lösungen

2.2.1. Adulte Kardiomyozytenisolierung

Stocklösung (1 Liter) für Kardiomyozytenisolierung

Substanz	MG (g/mol)	Menge (g)	Endkonzentration
NaCl	58,4	7,884	135 mM
KCI	74,6	0,35062	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	136,1	0,08166	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	138	0,0828	0,6 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	246,5	0,2958	1,2 mM
HEPES	238,31	4,7662	20 mM
Taurin	125,1	3,753	30 mM
dH ₂ O		Auf 1 l auffüllen	
NaOH (titrieren)			рН 7,4

Tabelle 1: Stocklösung (1 Liter) für Kardiomyozytenisolierung

Perfusionslösung

Substanz	Menge
Stocklösung	333 ml
Glucose	600 mg
BDM	350 mg

Tabelle 2: Perfusionslösung

Verdaulösung

Substanz	Menge
Perfusionslösung	60 ml
Liberase	150 μl
Trypsin	300 μl
Ca ²⁺ (10 mM)	67 μl

Tabelle 3: Verdaulösung

Stop-1 Lösung

Substanz	Menge
Perfusionslösung	2,25 ml
FCS	250 μl
Ca ²⁺ (10 mM)	3,125 μl

Tabelle 4: Stop-1 Lösung

Stop-2 Lösung

Substanz	Menge
Perfusionslösung	19 ml
FCS	1 ml
Ca ²⁺ (10 mM)	25 μΙ

Tabelle 5: Stop-2 Lösung

PBS

Substanz	MG (g/mol)	Menge/ 5I	Konzentration
NaCl	58,44	40 g	137 mM
KCI	74,56	1 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	177,99	7,2 g	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	136,09	1,02 g	1,5 mM

Tabelle 6: PBS

2.2.2. Konfokale Mikroskopie

Tyrode

Substanz	MG (g/mol)	Menge/I	Endkonzentration
NaCl	58,44	7,89 g	135 mM
КСІ	74,56	298 mg	4 mM
Glucose	180,16	1,8 g	10 mM
Hepes	238,3	2,38 g	10 mM
MgCl ₂ (1M)	95,21	1 ml	1 mM
CaCl2 (1M)	110,99	1 ml	1 mM
dH ₂ O		Auf 1 l auffüllen	
NaOH (titrieren)			рН 7,3

Tabelle 7: Tyrode

Lösungen für Konfokalmikroskopie

Substanz	Konzentration		
Laminin	50 μg/ml	50 μl Aliquot (1mg/ml) + 950 μl Tyrode	
Fluo4		Stock: 1 Vial Fluo4 + 45,6 μl Pluronic + 400 μl Tyrode	
		200μl Stocklösung + 800 μl Tyrode	
Ang II	2 μΜ	100 μl (2mM) in 100 ml	
Caffeine	20 mM	388 mg in 100 ml Tyrode	
Ru 360	181,6 µM	81,6 μM Stock: 1 Vial (100 μg) in 1 ml desoxy H ₂ O	
	10 µM	55 μl Stock in 945 μl Tyrode	
	1 μΜ	468 μl Stock in 85 ml Tyrode	
Dantrolen	0,5 M	Stock: 10,5 mg in 62,5 μl DMSO	
		Zwischenschritt: 10 μ l in 1 ml -> 5 mM	
	1 μM	Davon 20 μl in 100 ml Tyrode	

Tabelle 8: Lösungen für Konfokalmikroskopie

2.3. Funktionsprinzip konfokale Mikroskopie

Der Vorteil des konfokalen Mikroskops gegenüber einem Lichtmikroskop besteht in einer besseren Auflösung. Der Unterschied besteht darin, dass zwei Lochblenden verwendet werden. Die eine Lochblende ist vor der Lichtquelle, die andere vor dem Detektor.

Der Strahlengang ist in Abbildung 3 abgebildet. Die Lichtquelle wird durch eine Lochblende geleitet und durch einen dichromaten Spiegel auf das Objekt projiziert. Das Licht aus dem Fokus (grün) wird vom Detektor aufgenommen. Licht aus danebenliegenden Stellen (rosa) wird durch eine zweite Lochblende vor dem Detektor abgeschirmt. Dadurch werden Lichtstrahlen, die nicht aus dem Fokus kommen, nicht aufgenommen und der Kontrast verbessert. Somit kann eine hohe Auflösung erzeugt werden.



Abbildung 3: Strahlengang konfokales Mikroskop; nach John Innes Centre

Die Lichtquelle wird durch eine Lochblende geleitet und durch einen dichromaten Spiegel auf das Objekt projiziert. Das Licht aus dem Fokus (grün) wird vom Detektor aufgenommen. Licht aus danebenliegenden Stellen (rosa) wird durch eine zweite Lochblende vor dem Detektor abgeschirmt. Dadurch werden Lichtstrahlen, die nicht aus dem Fokus kommen, nicht aufgenommen. Es wird nicht das ganze Bild aufgenommen, sondern die einzelnen Punkte werden nacheinander abgefahren und erst danach von einem Computer zu einem vollständigen Bild verrechnet (Volgger, 2008, pp.193–210).

Um die Geschwindigkeit einer Serienaufnahme zu vergrößern, kann anstatt eines 2D-Bildes nur eine Linie über den zeitlichen Verlauf aufgenommen werden. Dies nennt man Line-Scan. Dabei wird eine Linie gewählt, die durch die zu beobachtenden Strukturen läuft.



Abbildung 4: Line Scan (nach (Ljubojevic, Radulovic, Leitinger, et al., 2014)) Links: 2D Bild einer Kardiomyozyte, mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen, Mitte: Schemazeichnung mit Auswahl der Linie, Rechts: Line Scan durch Zytoplasma (schwarz) und Zellkern (rot).

2.4.Grundlagen der Fluoreszenz

Manche Moleküle besitzen die Eigenschaft, nachdem sie von kurzwelligem Licht angeregt wurden, langwelligeres Licht abzustrahlen. Dies bezeichnet man als Fluoreszenz. Durch die Energie des kurzwelligen Lichts können Elektronen kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gebracht werden. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau wird wieder Energie frei; unter anderem auch als Lichtenergie. Da es energieärmer als das Anregungslicht ist, hat es jedoch eine größere Wellenlänge. Diese Lichtabgabe dauert nur wenige Millisekunden an. Verschiedene Moleküle haben ein unterschiedliches Spektrum von Anregungslicht und daraus resultierendem emittiertem Licht (Volgger, 2008, pp.163–173).

2.5.Messung der [Ca²⁺]-Transienten

Die Messungen der Calciumtransienten fanden an einem konfokalen Mikroskop LSM 780 von ZEISS statt.

Um die Zellen unter dem Mikroskop betrachten zu können, wurden die Zellen zunächst auf einem Objektträger fixiert. Dazu wurde 170 µl Laminin (s. Tabelle 8) auf den Objektträger pipettiert. Dies wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Zellsuspension auf den Objektträger gegeben. Diese wurde wiederum für eine Stunde inkubiert. Die Zellen waren nun auf dem Objektträger fixiert.

Färbung mit Fluo 4-AM

Fluo 4 (Life Technologie, F14201) ist ein Ca²⁺-sensitiver Farbstoff. Die Farbstoffmoleküle fluoreszieren nur nach Bindung an Ca²⁺ Ionen, so dass über Änderungen der Fluoreszenz Änderungen der Ca²⁺-Konzentration abgeschätzt werden können. Er reichert sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern an. Zunächst liegt der Farbstoff gebunden mit einem Acetoxymethylester vor und wird erst nach Aufnahme in die Zelle durch Esterasen gespalten und kann dadurch nicht mehr aus der Zelle diffundieren. Der Farbstoff wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, was zu einer gleichmäßigen Verteilung der Farbstoffmoleküle in Zellkern und Zytoplasma führte. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit Tyrode (s. Tabelle 7) gewaschen, um nichtdeesterisierte Farbstoffmoleküle entfernen basales zu und ein stabiles Fluoreszenzniveau zu erhalten.

Messung der zytoplasmatischen und nukleären [Ca²⁺]-Transienten

Zur Aufnahme am Mikroskop wurde ein Ölimmersionsobjektiv Apochromat C mit 63facher Vergrößerung genutzt. Fluo 4 wurde mit einem Argonlaser bei 488nm angeregt und die Fluoreszenz bei 500 – 540nm aufgenommen. Die Messungen wurden mit dem Line Scan (s. 2.3) durchgeführt. Die Linie wurde so gewählt, dass sowohl Zytoplasma, der Zellkern sowie der Hintergrund darauf abgebildet waren. Die Zellen wurden mit 0,5 Hertz stimuliert. Gemessen wurden zuerst 4 Transienten mit Tyrode zur Kontrolle. Dann jeweils 4 Transienten 2, 5, 7 und 10 Minuten nach Beginn der Zugabe von Ang II.

Färbung mit X-Rhod-1

X-Rhod-1 ist ebenfalls ein Ca²⁺-sensitiver Farbstoff. Er besitzt eine negative Nettoladung und wird daher präferentiell in Mitochondrien aufgenommen. Der Farbstoff wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1mM CoCl₂ für mindestens 15 Minuten dazugegeben. CoCl₂ bindet den Farbstoff und unterdrückt damit die Fluoreszenz. Es wird jedoch nicht in die Mitochondrien aufgenommen, sondern nur ins Zytoplasma. Dadurch wird es ermöglicht spezifisch die zytoplasmatische Fluoreszenz zu blockieren und nur das mitochondriale Ca²⁺ darzustellen.

Messung des mitochondrialen [Ca²⁺]

Zur Aufnahme am Mikroskop wurde ebenfalls das Apochromat C mit 63-facher Vergrößerung benutzt. X-Rhod wurde bei 543 nm angeregt und das emittierte Licht bei 552-617 nm aufgenommen. Es wurden 2D Aufnahme angefertigt.

Blockierung mit Ru 360

Zur Blockierung des MCU wurde Ru360 (Calbiochem, Bestellnummer: 557440) verwendet. Nach Fixation der Zellen auf dem Objektträger, wurde der Überstand abgenommen und ein Tropfen von einer 10 µM Ru 360-Lösung zugegeben. Dies wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Färbungen durchgeführt. Während der Messungen wurde eine 1µM Ru 360 Lösung zugegeben. Bei den Versuchen zur Einwaschung des Blockers wurden die Zellen zunächst gefärbt und 4 Transienten mit Tyrode gemessen. Danach wurde Ru360 zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach 60, 65, und 70 Minuten wurden jeweils 4 Transienten gemessen.

Blockierung mit Dantrolen

Zur Blockierung des mitochondrialen RyR wurde Dantrolen (Sigma, Bestellnummer: D9175) verwendet. Nach Färbung mit dem jeweiligen Farbstoff, wurden die Zellen mit einer 1µM Dantrolenlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Versuchen zur Einwaschung des Blockers wurden die Kardiomyozyten zunächst gefärbt und 4 Transienten mit Tyrode gemessen. Danach wurde Dantrolen zugegeben. Nach 10, 15 und 20 Minuten wurden jeweils 4 Transienten gemessen.

2.6.Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem t-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von *p<0,05 und **p<0,01 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde als signifikant erachtet.

3. Material

Substanz	Firma	Catalog-Nr.
2-APB	Sigma	D9754
Acrylamid	Sigma	A9099
Ammonium Persulfat 10%	Sigma	A7460
Angiotensin II	Sigma	A9525
BDM	Sigma	B0753
BSA	Sigma	A2153
CaCl ₂ (1M)	Sigma	21115
Caffeine	Sigma	C0750
CoCl ₂	Roth	7095.1
Cumarin-Acid Pulver	Sigma	C9008
Dantrolen	Sigma	D9175
Dextrose	Merck	1.08342
DMSO	Sigma	D8418
DNAse	Sigma	DN25
EDTA	Sigma	03690
FCS	Biochrome	S0615
Fluo4	Life Technologie	F14201
Glucose	Sigma	G5767
HCI	Sigma	35328
Hepes	Sigma	H3375
КСІ	Merck	104.936
KH ₂ PO ₄	Merck	104.873
Laminin	Sigma	L2020
L-Glutamin	Sigma	G8540-25G
Liberase	Roche	05401151001
Loading buffer	Cell Signaling	7722S

Luminol	Sigma	A4685
MgCl*6H ₂ O	Merck	1.05833
MgCl ₂ (1M)	Sigma	M1028
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck	105.886
Na Ortovanadate	Sigma	S6508
Na ₂ HPO ₄	SAFC	RES20908-A702X
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	Merck	106.346
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma	P8010
NaCl	Sigma	31434 1KG-R
NaFl	Sigma	S1504
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck	1.06346
NaHCO ₃	Sigma	S-5761
NaOH	Merck	1.091.371.000
Pluronic	Invitrogen	P3000MP
Ru 360	Calbiochem	557440
SDS	Sigma	C4509
Taurin	Sigma	T0625
TEMED	Sigma	T9281
Tris Base	Sigma	T6066
Tris-HCl	Sigma	T3253
Trypsin	Gibco	15090
Tween 20	Roth	9127.1
X-Rhod	Thermo Fisher	X14210

4. Ergebnisse

4.1.Konzentrationsabhängige Wirkung von Angiotensin II auf die diastolische zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Konzentration

Im Vorfeld konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass über den IP₃-Rezeptor freigesetztes Ca²⁺ in die Mitochondrien aufgenommen wird und dort die ATP-Produktion erhöht (Daten nicht veröffentlicht). Zunächst wurden adulte Kardiomyozyten der Maus mit dem IP₃R-Agonisten Angiotensin II (Ang II) stimuliert. Da IP₃-Agonisten selber nicht nur einen positiv inotropen Effekt besitzen, sondern über einen im Vergleich zum Zytosol überproportionalen Anstieg der nukleären Ca²⁺-Konzentration auch hypertrophe Gentranskription aktivieren, wurden verschiedene Konzentrationen von Ang II getestet. Ziel war es, eine Konzentration zu finden, die stark genug ist um die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration zur Folge hat.

Es wurden Versuche mit 2 und 3 µM Ang II durchgeführt. Abbildung 5A zeigt die Veränderung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration in Zytosol (schwarz) und Zellkern (rot) in Abhängigkeit der Stimulation mit 3 μ M Ang II (durchgezogenen Linie, Zytosol: +31 ± 14%, Zellkern: +37 ± 26%) und 2 μM Ang II (gestrichelte Linie, Zytosol: +11% ± 4%, Zellkern: +13% ± 6%) über 10 min Beobachtungszeit. Abbildung 5B zeigt die im selben Zeitraum gemessene Veränderung der Amplitude des zytosolischen (schwarz) und nukleären Ca²⁺-Transienten (rot). Aus den Daten geht deutlich hervor, dass die Stimulation der Kardiomyozyten mit 2 µM Ang II nicht zu einer Beeinflussung der zytosolischen und nukleären diastolischen Ca²⁺-Konzentration führt. Auch die Amplitude des Ca²⁺-Transienten in Zytosol und Zellkern blieben unter der Stimulation mit 2 μ M Ang II stabil. Die Stimulation mit 3 µM Ang II hingegen, führt zu einer Steigerung der diastolischen nukleären und zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Effekte von 2 und 3 µM Ang II wurde der Quotient der maximalen diastolischen Änderungen der Ca²⁺-Konzentration in Zellkern und Zytosol gebildet (Abbildung 5C). Dieser zeigt, dass durch 3 µM Ang II vor allem die Ca²⁺-Konzentration im Zellkern ansteigt.



Abbildung 5: Effekt der IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR auf die diastolische zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Konzentration.

Veränderung des diastolischen [Ca²⁺] (A) und Amplitude (B) in Zytosol (schwarz) und Zellkern (rot) in Abhängigkeit der Stimulation mit 3 μ M Ang II (durchgezogene Linie) und 2 μ M Ang II (gestrichelte Linie) über 10 Minuten Beobachtungszeit. Die Stimulation mit 2 μ M Ang II führt zu keiner Beeinflussung der Kardiomyozyten, während die Stimulation mit 3 μ M Ang II zu einer Erhöhung des diastolischen [Ca²⁺] führt.

C: Verhältnis des $[Ca^{2+}]_{nuc}$ und $[Ca^{2+}]_{cyto}$ nach 10 Minuten Beobachtungszeit. Durch Stimulation mit 3 μ M Angiotensin steigt vor allem das $[Ca^{2+}]_{nuc}$ an, während unter Stimulation mit 2 μ M Angiotensin $[Ca^{2+}]_{cyto+nuc}$ stabil bleibt.

4.2.Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrien

Ca²⁺ wird hauptsächlich über den mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU) und auch über den mitochondrialen RyR in Mitochondrien aufgenommen (s. Kapitel 1.2.1). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Stimulation mit dem IP₃R-Agonisten Endothelin-1 (ET-1) zur Ca²⁺-Aufnahme in Mitochondrien in adulten Ventrikelkardiomyozyten der Maus führte (Seidlmayer, Kuhn, Berbner, *et al.*, 2016). Da in dieser Arbeit der IP₃R-Agonist Ang II in elektrisch stimulierten Zellen verwendet werden sollte, um die Interaktionen von mitochondrialem, zytosolischem und nukleärem Ca²⁺-Haushalt zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob die Stimulation der Myozyten mit 2 μ M Ang II in elektrisch stimulierten Zellen in einer messbaren Beeinflussung der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration resultiert.

Dazu wurden die Kardiomyozyten mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff X-Rhod gefärbt, mit 0,5 Hz stimuliert und 2 μ M Ang II behandelt. Infolge der Ang II Behandlung stieg die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration nach 20 Minuten um +15% ± 2% in Relation zur unbehandelten Kontrolle an.

Obwohl die Gabe von 2 μ M Ang II keinen Effekt auf den zytosolischen und nukleären Ca²⁺-Haushalt hatte (siehe Abbildung 5), kommt es dennoch zu einem Anstieg der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration (Abbildung 6; grau 2 μ M Ang II; schwarz 3 μ M Ang II). Daher wurden alle nachfolgenden Versuche mit 2 μ M Ang II durchgeführt.



Abbildung 6: Effekt von Angiotensin auf das mitochondriale Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_m$) in elektrisch stimulierten Myozyten.

Messung des mitochondrialen [Ca²⁺] nach Gabe von 2μ M und 3μ M Ang II. Unabhängig von der Ang II-Konzentration steigt das [Ca²⁺]_m an.

4.3.Einfluss der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahmeblocker auf Kardiomyozyten

4.3.1. Einfluss auf die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration

Um die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme zu blockieren, wurden Blocker des mitochondrialen Ca²⁺ Uniporters (MCU, Blocker Ru360) und des mitochondrialen Ryanodinrezeptors (mRYR1, Blocker Dantrolen) verwendet. Vor der Verwendung der Substanzen wurden zur Charakterisierung der Blockereffekte beide Substanzen nach Stimulierung mit 2 μ M Angiotensin II einzeln eingewaschen und der Blockereffekt beobachtet. Beide Substanzen reduzierten in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten signifikant die mitochondriale Ca²⁺ Aufnahme. Beide Substanzen reduzierten die mitochondriale Ca²⁺ durch Ru360 um 22% reduziert, während durch Dantrolen das mitochondriale Ca²⁺ um 26% reduziert wurde (Abbildung 7).





Untersuchung der Effekte von Ru 360 (Blocker des MCU) und Dantrolen (Blocker des mRYR1) auf das mitochondriale [Ca²⁺] in Kardiomyozyten, die mit 2µM Ang II stimuliert wurden. Nach Einwaschen von Ru 360 und Dantrolen zeigt sich eine Abnahme des mitochondrialen [Ca²⁺] um 15% nach 5 Minuten für beide Blocker und um 22 % (Ru360) und 26% (Dantrolen) nach 10 Minuten im Vergleich zur Kontrolle.

4.3.2. Einfluss der mitochondrialen Blockierung auf die nukleäre und zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration ohne Ang II Stimulation

Auch die Effekte der Blocker auf die zytosolische und die nukleäre Ca²⁺-Konzentration und die Kinetik des Ca²⁺-Transienten wurden untersucht. Dantrolen hatte in elektrisch stimulierten Zellen keinen Einfluss auf die Ca²⁺-Konzentration von Zytosol und Zellkern. Auch die Kinetik des [Ca²⁺]-Transienten wurde durch Dantrolen nicht beeinflusst. In Abbildung 8A+B werden Änderungen der zytosolischen und nukleären Ca²⁺-Konzentration nach Behandlung mit Dantrolen gezeigt. Nach 20 Minuten Beobachtungszeit blieb sowohl das zytosolische Ca²⁺ als auch das nukleäre Ca²⁺ konstant. In der Abbildung 8C wird gezeigt, dass die Kinetik durch Dantrolen allein nicht beeinflusst wird.

Das Einwaschen von Ru360 hingegen führte in elektrisch stimulierten Zellen zu einem Anstieg der zytosolischen und nukleären diastolischen Ca²⁺-Konzentration, welche am ehesten durch eine Verlangsamung des Zurückpumpens von Ca²⁺ in die intrazellulären Speicher am Ende des [Ca²⁺] Transienten bedingt ist.

In Abbildung 8D+E wird das zytosolische und nukleäre Ca²⁺ nach Behandlung mit Ru360 gezeigt. Hier bleibt das zytosolische Ca²⁺ konstant, während das nukleäre Ca²⁺ ansteigt. In Abbildung 8F zeigt sich jedoch, dass sich die Kinetik des nukleären [Ca²⁺]-Transienten verändert. Die Anwesenheit von Ru360 führt zu einer schnelleren Freisetzung von Ca²⁺ in den Zellkern und zu einer langsameren Wiederaufnahme des Ca²⁺ in die Kernhülle nach Abschluss des [Ca²⁺]-Transienten.



Abbildung 8: Effekte der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahmeblocker in unbehandelten Kardiomyozyten auf das Zytosol, den Zellkern und die Kinetik.

In unbehandelten Kardiomyozyten wurde der Einfluss von Dantrolen und Ru 360 auf das zytosolische und nukleäre [Ca²⁺] und den [Ca²⁺]-Transienten gemessen. Nach Gabe von Dantrolen zeigt sich keine Änderung des zytosolischen (A) und nukleären [Ca²⁺] (B) innerhalb von 20 Minuten. Auch der [Ca²⁺]-Transient ändert sich nicht (C). Nach Gabe von Ru 360 bleibt das zytosolisch [Ca²⁺] (D) stabil, während das nukleäre [Ca²⁺] (E) ansteigt. Auch der nukleäre [Ca²⁺]-Transient (F) ändert sich. Ru 360 führt zu einer schnelleren Freisetzung von Ca²⁺ in den Zellkern und zu einer verlangsamten Wiederaufnahme in die Kernhülle.

4.4.Einfluss der mitochondrialen Blockierung auf das nukleäre und zytoplasmatische Ca²⁺ nach Ang II Stimulation

Nach der separaten Charakterisierung der Blocker und der Wirkung von Ang II, wurden jetzt zur Beantwortung der Fragestellung mit 2 µM Ang II behandelt und gleichzeitig die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme mit den beschriebenen Blockern der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme gehemmt. Es wurden mitochondriale, zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Änderungen gemessen. Zur Messung der zytosolischen und nukleären Ca²⁺-Änderungen wurden die Zellen für 20 min mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fluo-4 beladen.

Abbildung 9A zeigt die Veränderung des diastolischen [Ca²⁺] im Zytoplasma nach der Gabe von 2μ M Ang II (grau) (5 Minuten: + 5% ± 4%, 10 Minuten: +11% ± 4%) und zusätzlicher Gabe von Ru360 (blau) (5 Minuten: +13% ± 3%, 10 Minuten: +20% ± 4%) oder Dantrolen (grün) (5 Minuten: +13% ± 2%, 10 Minuten: +21 ± 2%) nach 5 und nach 10 Minuten nach Beginn der Gabe in Relation zum [Ca²⁺] vor Beginn. Sowohl nach 5 als auch nach 10 Minuten steigt das [Ca²⁺] im Zytoplasma nach Blockierung der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme im Gegensatz zur alleinigen Gabe von Ang II an, unabhängig von der Blockersubstanz. Abbildung 9B zeigt entsprechend die Veränderung des diastolischen [Ca²⁺] im Zellkern. Nach 5 Minuten steigt das [Ca²⁺] nach Blockierung mit Dantrolen (+21% ± 5%) im Zellkern an, während nach Blockierung mit Ru360 (+12% \pm 4%) das [Ca²⁺] im Vergleich zur alleinigen Gabe von Ang II (+13% \pm 5%) nicht ansteigt. Nach 10 Minuten steigt auch das [Ca²⁺] im Zellkern nach Ru360 Gabe leicht an (+16% ± 5%), jedoch nicht so stark wie nach Gabe von Dantrolen (+24% ± 4%). Das diastolische [Ca²⁺] im Zellkern nach alleiniger Gabe von Ang II steigt nach 10 Minuten nicht weiter an (+13% ± 6%). Zur Verdeutlichung des Effektes auf das nukleäre [Ca²⁺] wurde der Quotient aus nukleärem und zytosolischem [Ca²⁺] gebildet (Abbildung 9C). Dabei zeigt sich, dass das [Ca²⁺] im Zellkern nach Gabe von Dantrolen überproportional stärker ansteigt als nach Gabe von Ru360. Das weist darauf hin, dass der mRyR eine Rolle in der Regulierung des nukleären [Ca²⁺] spielt.



Abbildung 9: Effekte der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme-Blocker auf das diastolische [Ca²⁺]_{cyto+nuc} in Ang II behandelten Kardiomyozyten.

A zeigt die Veränderung des diastolischen [Ca²⁺] im Zytoplasma nach der Gabe von 2µM Ang II (grau) und zusätzlicher Gabe von Ru360 (blau) oder Dantrolen (grün) nach 5 und nach 10 Minuten nach Beginn der Gabe in Relation zum Ca²⁺ vor Beginn. Unabhängig von der Blockersubstanz steigt das [Ca²⁺] im Zytoplasma im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit Ang II an. B zeigt entsprechend das diastolische nukleäre [Ca²⁺]. Durch Gabe von Dantrolen steigt das nukleäre [Ca²⁺] deutlich stärker an, als nach Gabe von Ru 360. Dies wird in C mit dem Verhältnis vom nukleären zum zytoplasmatischen [Ca²⁺] noch einmal verdeutlicht: Nach Gabe von Dantrolen steigt das [Ca²⁺] im Nukleus überproportional stärker an, als nach Gabe von Ru 360.

5. Diskussion

Die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme ist ein wichtiger Prozess in der Zelle. Die Ca²⁺-Konzentration in Mitochondrien beeinflusst die Energiebereitstellung der Zelle, sowie initiiert bei Ca²⁺-Überladung die Apoptose.

In den letzten Jahrzehnten wurde zudem die Bedeutung von Mitochondrien in der Entstehung von Krankheiten bewusst. In der Herzinsuffizienz ist die räumliche Struktur der Kardiomyozyten zunehmend ungeordnet. Die Mitochondrien, die sich normalerweise zwischen den Myofibrillen befinden, kommen außerhalb zu liegen. Zudem variiert die Größe der Mitochondrien zwischen sehr klein und sehr groß (Schaper, Froede, Hein, *et al.*, 1991). Dadurch kann die Funktion der Mitochondrien eingeschränkt sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob eine gestörte, durch IP₃ vermittelte Ca²⁺-Aufnahme in Mitochondrien von Kardiomyozyten die Ca²⁺-Konzentration im Zellkern beeinflusst wird und darüber die Gentranskription gesteuert wird.

Ang II, das unter anderem in der Herzinsuffizienz vermehrt produziert wird, führt zu einer Steigerung des nukleären und zytosolische Ca²⁺-Transienten. Daher wurde zunächst eine Ang II-Konzentration gesucht, die keine Beeinflussung des zytosolischen und nukleären Ca²⁺-Transienten zur Folge hat. Da durch die nukleäre Ca²⁺-Konzentrationserhöhung durch IP₃-Agonisten eine Aktivierung der hypertrophen Gentranskription erfolgen kann. Bei Versuchen zum Vergleich von 2 und 3 µM Ang II zeigte sich, dass 3 µM Ang II die zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Konzentration erhöht, während 2 µM Ang II keine Erhöhung zur Folge hat.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch den IP₃-Agonisten ET-1 das mitochondriale [Ca²⁺] erhöht wird. Hier wurden die Versuche mit Ang II wiederholt. Das mitochondriale Ca²⁺ stieg sowohl nach Stimulation mit 3 μ M als auch nach 2 μ M signifikant an.

Wir konnten zeigen, dass durch die Blockade des mRyR und MCU durch Dantrolen und Ru360 die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme nach Ang II-Stimulation blockiert wird.

29

Dantrolen ist spezifisch für den Typ 1 und 3 RyR und hat keinen Einfluss auf den Typ 2 RyR, der im SR von Kardiomyozyten exprimiert wird (Zhao, Li, Chen, *et al.*, 2001).

Wir testeten in Versuchen ohne Ang II, ob die Gabe von Dantrolen Einfluss auf das zytosolische und nukleäre Ca²⁺ hat. Hier zeigte sich keinerlei Änderung der Ca²⁺- Transienten. Dies zeigt, dass die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR nicht gestört wird. Zum anderen wird ohne Stimulation mit Ang II kaum Ca²⁺ in Mitochondrien aufgenommen, das durch Dantrolen blockiert werden könnte, sodass auch hierdurch keine Änderung des zytosolischen Ca²⁺ resultieren würde.

Übereinstimmend mit anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Dantrolen auf das zytoplasmatische und nukleäre Ca²⁺ keinen Einfluss hat (Domeier, Roberts, Gibson, *et al.*, 2014).

Ru360 führte bereits in elektrisch stimulierten Zellen alleine zu Veränderungen des [Ca²⁺]-Transienten im Zellkern, indem es die Kinetik des nukleären [Ca²⁺] verlangsamt. Auf den zytosolischen [Ca²⁺]-Transienten hat es keinen Einfluss. Dies konnte auch in Vordaten so gezeigt werden (Lu, Ginsburg, Kettlewell, *et al.*, 2013).

Durch die Blockade der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme in elektrisch stimulierten und mit Ang II behandelten Kardiomyozyten steigt die Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma an. Dieser Effekt konnte auch in weiteren Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden. So wird durch Herunterregulation des MCU in neonatalen Zellen die Amplitude des zytoplasmatischen [Ca²⁺]-Transienten erhöht (Drago, De Stefani, Rizzuto, *et al.*, 2012). In spezifisch im Myokard unterdrückter MCU-Expression zeigte sich auch ein erhöhtes zytoplasmatisches [Ca²⁺] (Rasmussen, Wu, Joiner, *et al.*, 2015). Eine Ursache hierfür kann außer der verminderten Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrien, eine verminderte ATP-Produktion sein. ATP wird in Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung gebildet, das durch Ca²⁺-abhängige Dehydrogenasen reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass nachfolgend auch die Ca²⁺-Konzentration im Zellkern steigt. Dies ist besonders nach der Blockade des mRyR durch Dantrolen zu beobachten. Durch Blockade des MCU durch Ru360 steigt zwar das Ca²⁺ im Zytosol an, jedoch kaum im Zellkern. Dies könnte an der geänderten Kinetik des nukleären [Ca²⁺] durch Ru360 liegen. Dadurch ist die Interpretation der Daten nahezu

30

unmöglich. Zur weiteren Klärung inwieweit die Blockierung des MCU Einfluss auf das nukleäre [Ca²⁺] hat, muss durch weiterführende Versuche wie etwa mit MCU-Knock Out Mäusen geklärt werden.

Unsere Hypothese ist, dass durch Stimulation mit Ang II Ca²⁺ aus perinukleärem SR freigelassen wird. Wenn nun RyR1 auf den perinukleären Mitochondrien geblockt wird, kann mehr Ca²⁺ in den Zellkern gelangen. In der Folge steigt das nukleäre [Ca²⁺] an und das mitochondriale Ca²⁺ sinkt. Im Gegensatz dazu wird nach Blockierung des MCU die nukleäre Ca²⁺-Aufnahme nicht gesteigert, da nach Ang II Stimulation Ca²⁺ nicht primär über MCU in Mitochondrien aufgenommen wird. Da jedoch trotzdem beobachtet wird, dass nach Blockade des MCU das zytosolische [Ca²⁺] ansteigt, wird möglicherweise in andere Mitochondrien – nicht die perinukleären Mitochondrien- das durch IP₃ vermittelt freigesetzte Ca²⁺ über MCU aufgenommen.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst.



Durch Blockierung der Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrien durch Dantrolen, steigt die Ca²⁺-Konzentration im Zytoplasma und nachfolgend im Zellkern.

Versuche zum Nachweis von (p)NFAT durch Western Blots ließen sich aufgrund der zu geringen Spezifität der Antikörper nicht sinnvoll auswerten. In unserer Arbeitsgruppe ließ sich jedoch nachweisen, dass nach Stimulation mit Angiotensin, das nukleäre [Ca²⁺] ansteigt und über Calcineurin und NFAT vermittelt, die prohypertrophe Gentranskription aktiviert wird (Olivares-Florez, Czolbe, Riediger, *et al.*, 2018). Auch in

anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch den Anstieg des nukleären Ca2+ NFAT durch Ca²⁺-abhängige Phosphatasen dephosphoryliert und in den Zellkern transportiert wird, wo die NFAT-abhängige Gentranskription aktiviert wird. Mittlerweile konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass durch IP₃-Freisetzung NFAT aktiviert wird. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass NFAT in Vorhofzellen durch IP₃ direkt freigesetzt wird, während in Ventrikelzellen NFAT durch alleinige Stimulation mit IP₃ nicht ansteigt (Rinne & Blatter, 2010). Jedoch zeigte eine andere Gruppe, dass durch IP₃ eine hypertrophe Stimulation durch den Calcineurin/NFAT Signalweg vermittelt wird (Nakayama, Bodi, Maillet, et al., 2010). In Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation mit Endothelin, das auch zu einer IP₃-Erhöhung führt, über den CnA/NFAT- Weg zu einer Hypertrophie führt (Higazi, Fearnley, Drawnel, et al., 2009). Die Aufnahme von Ca²⁺ in Mitochondrien ist essentiell für eine adäguate Energiebereitstellung der Zelle. Wenn diese Aufnahme gestört ist, dann kann auf äußere Reize hin nicht genügend ATP produziert werden. Dies zeigt sich beispielsweise bei Fehlen des Proteins Mfn2. Mfn2 verbindet das SR und Mitochondrien. Bei Fehlen dieses Proteins weichen das SR und die Mitochondrien wenige Nanometer auseinander. Das reicht aus, dass die Ausbildung einer Ca²⁺-Mikrodomäne nicht stattfinden kann. Das hat zur Folge, dass Mitochondrien weniger Ca²⁺ aufnehmen können (Dorn & Maack, 2013). Auch bei chronischem Herzversagen zeigt sich die Relevanz der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme. Diese ist bei chronischem Herzversagen durch mehrere Faktoren gestört. In der Herzinsuffizienz ist die intakte räumliche Struktur insbesondere der Kontakt von SR und Mitochondrien gestört, was zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. Zudem kann das über die IP₃ freigesetzte Ca²⁺ nicht mehr in die Mitochondrien aufgenommen werden (Daten nicht publiziert). Des Weiteren ist der zytosolische Ca²⁺-Transient reduziert, da die SERCA Aktivität reduziert ist. Dies führt zu einer reduzierten Ca²⁺-Ladung des SR und somit zu einer verminderten Ca²⁺-Freisetzung nach einem Aktionspotential. Zudem ist das zytoplasmatische Na⁺ erhöht. Dadurch wird der Ca²⁺-Ausstrom aus dem Mitochondrium favorisiert.

Sowohl bei der physiologischen als auch in der pathologischen Hypertrophie ist das intrazelluläre [Ca²⁺] in Kardiomyozyten erhöht. Jedoch ist nur bei der pathologischen

32

Hypertrophie auch NFAT erhöht. Das zeigt, dass Kardiomyozyten auf eine Ca²⁺-Erhöhung unterschiedlich reagieren können, je nachdem auf welchen Reiz hin diese Erhöhung stattgefunden hat (Wilkins, Dai, Bueno, *et al.*, 2004). Bei der Entstehung der Herzinsuffizienz gibt es Veränderungen in den Kardiomyozyten, wie verminderte Invaginationen der Kernhülle und veränderte Expression von Ca²⁺-Kanälen. Dies führt zu einer veränderten nukleoplasmatischen Ca²⁺-Regulation. Diese Veränderungen treten so früh auf, dass sie in der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sein können (Ljubojevic, Radulovic, Leitinger, *et al.*, 2014). Nach chronischer Ang II-Stimulation, wie das in der Herzinsuffizienz der Fall ist, steigt das nukleäre [Ca²⁺] an. In der Folge werden Calcineurin vermittelt vermehrt IP₃R2 exprimiert, was zu einer Wirkverstärkung von IP₃ führt. Dadurch entsteht ein Circulus vitiosus, der eine zunehmende Hypertrophie zur Folge hat (Olivares-Florez, Czolbe, Riediger, *et al.*, 2018). So ist das nukleäre Ca²⁺ ein zentraler Faktor in der Entwicklung der Herzinsuffizienz, das nicht zuletzt auch über eine gestörte Ca²⁺-Aufnahme in Mitochondrien, erhöht sein kann.

6. Zusammenfassung

In kardiovaskulären Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz ist die Konzentration von Hormonen wie Angiotensin II und Endothelin-1, die in der Zelle eine IP₃ vermittelte Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR induzieren, erhöht (Munger, Gardner & Jarvis, 1990; Hürlimann, Enseleit, Noll, *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass nach der Stimulierung mit einem IP₃-Rezeptor Agonisten, die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme stimuliert wird. Wenn diese mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme durch Dantrolen oder Ru360 blockiert wird, dann steigt nachfolgend das zytosolische [Ca²⁺] an. Nach Blockierung des mRyR durch Dantrolen steigt zusätzlich durch die Beeinflussung der passiven Komponente des nukleären Ca²⁺-Transienten das nukleäre [Ca²⁺] an. Dieses erhöhte nukleäre [Ca²⁺] hat letztlich eine Hypertrophie zur Folge. Somit können Mitochondrien, die in ihrer Funktion gestört sind, zur Entwicklung der Hypertrophie beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- Balaban, R.S. (2002) Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. [Online] 34 (10), 1259–1271. Available from: doi:10.1006/jmcc.2002.2082.
- Bassani, R.A., Bassani, J.W. & Bers, D.M. (1992) Mitochondrial and sarcolemmal Ca2+ transport reduce [Ca2+]i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*. 453591–608.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. [Online] 415 (6868), 198–205. Available from: doi:10.1038/415198a.
- Bers, D.M., Barry, W.H. & Despa, S. (2003) Intracellular Na+ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. [Online] 57 (4), 897–912. Available from: doi:10.1016/S0008-6363(02)00656-9.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I., et al. (2001) Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*.
 [Online] 276 (24), 21482–21488. Available from: doi:10.1074/jbc.M101486200.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Lin, L., Ryu, S.-Y., et al. (2005) Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. [Online] 1717 (1), 1–10. Available from: doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.016.
- Bourajjaj, M., Armand, A.-S., Martins, P.A. da C., Weijts, B., et al. (2008) NFATc2 Is a Necessary Mediator of Calcineurin-dependent Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 283 (32), 22295–22303. Available from: doi:10.1074/jbc.M801296200.
- Chance, B. & Williams, G.R. (1955) Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation I. Kinetics of Oxygen Utilization. *Journal of Biological Chemistry*. 217 (1), 383–394.
- Dedkova, E.N. & Blatter, L.A. (2013) Calcium signaling in cardiac mitochondria. *Journal* of molecular and cellular cardiology. [Online] 58125–133. Available from: doi:10.1016/j.yjmcc.2012.12.021.
- Domeier, T.L., Roberts, C.J., Gibson, A.K., Hanft, L.M., et al. (2014) Dantrolene suppresses spontaneous Ca2+ release without altering excitation-contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. [Online] 307 (6), H818–H829. Available from: doi:10.1152/ajpheart.00287.2014.
- Domeier, T.L., Zima, A.V., Maxwell, J.T., Huke, S., et al. (2008) IP3 receptor-dependent Ca2+ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*.
 [Online] 294 (2), H596–H604. Available from: doi:10.1152/ajpheart.01155.2007.
- Dorn, G.W. & Maack, C. (2013) SR and mitochondria: Calcium cross-talk between kissing cousins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. [Online] 5542–49. Available from: doi:10.1016/j.yjmcc.2012.07.015.
- Drago, I., De Stefani, D., Rizzuto, R. & Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca2+ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca2+ peaks in cardiomyocytes. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America. [Online] 109 (32), 12986–12991. Available from: doi:10.1073/pnas.1210718109.

- Foskett, J.K. & Philipson, B. (2015) The Mitochondrial Ca2+ Uniporter Complex. *Journal of molecular and cellular cardiology*. [Online] 03–8. Available from: doi:10.1016/j.yjmcc.2014.11.015.
- Higazi, D.R., Fearnley, C.J., Drawnel, F.M., Talasila, A., et al. (2009) Endothelin-1-Stimulated InsP3-Induced Ca2+ Release Is a Nexus for Hypertrophic Signaling in Cardiac Myocytes. *Molecular Cell*. [Online] 33 (4), 472–482. Available from: doi:10.1016/j.molcel.2009.02.005.
- Hürlimann, D., Enseleit, F., Noll, G., Lüscher, T.F., et al. (2002) Endothelin antagonists and heart failure. *Current Hypertension Reports*. [Online] 4 (1), 85–92. Available from: doi:10.1007/s11906-002-0058-6.
- Kockskämper, J., Seidlmayer, L., Walther, S., Hellenkamp, K., et al. (2008) Endothelin-1 enhances nuclear Ca2+ transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P3dependent Ca2+ release from perinuclear Ca2+ stores. *Journal of Cell Science*. [Online] 121 (2), 186–195. Available from: doi:10.1242/jcs.021386.
- Kockskämper, J., Zima, A.V., Roderick, H.L., Pieske, B., et al. (2008) Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *Journal of molecular* and cellular cardiology. [Online] 45 (2), 128–147. Available from: doi:10.1016/j.yjmcc.2008.05.014.
- Koninck, P.D. & Schulman, H. (1998) Sensitivity of CaM Kinase II to the Frequency of Ca2+
 Oscillations. *Science*. [Online] 279 (5348), 227–230. Available from: doi:10.1126/science.279.5348.227.
- Ljubojevic, S. & Bers, D.M. (2015) Nuclear Calcium in Cardiac Myocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*. [Online] 65 (3), 211–217. Available from: doi:10.1097/FJC.0000000000174.
- Ljubojevic, S., Radulovic, S., Leitinger, G., Sedej, S., et al. (2014) Early Remodelling of Perinuclear Ca2+ Stores and Nucleoplasmic Ca2+ Signalling During the Development of Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation*. [Online] 130 (3), 244–255. Available from: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008927.
- Lu, X., Ginsburg, K.S., Kettlewell, S., Bossuyt, J., et al. (2013) Measuring Local Gradients of Intramitochondrial [Ca²⁺] in Cardiac Myocytes During Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release. *Circulation Research*. [Online] 112 (3), 424–431. Available from: doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300501.
- Maier, L.S. & Bers, D.M. (2002) Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. [Online] 34 (8), 919–939. Available from: doi:10.1006/jmcc.2002.2038.
- Molkentin, J.D., Lu, J.-R., Antos, C.L., Markham, B., et al. (1998) A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 93 (2), 215–228.
- Munger, M.A., Gardner, S.F. & Jarvis, R.C. (1990) Endocrinologic Warfare: The Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Congestive Heart Failure. *Journal of Pharmacy Practice*. [Online] 3 (5), 318–331. Available from: doi:10.1177/089719009000300506.
- Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., et al. (2010) The IP3 Receptor Regulates Cardiac Hypertrophy in Response to Select Stimuli. *Circulation*

Research. [Online] 107 (5), 659–666. Available from: doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220038.

- Olivares-Florez, S., Czolbe, M., Riediger, F., Seidlmayer, L., et al. (2018) Nuclear calcineurin is a sensor for detecting Ca2+ release from the nuclear envelope via IP3R. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. [Online] 96 (11), 1239–1249. Available from: doi:10.1007/s00109-018-1701-2.
- Perez, P.J., Ramos-Franco, J., Fill, M. & Mignery, G.A. (1997) Identification and Functional Reconstitution of the Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor from Ventricular Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 272 (38), 23961–23969. Available from: doi:10.1074/jbc.272.38.23961.
- Proven, A., Roderick, H.L., Conway, S.J., Berridge, M.J., et al. (2006) Inositol 1,4,5trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *Journal of Cell Science*. [Online] 119 (16), 3363– 3375. Available from: doi:10.1242/jcs.03073.
- Rasmussen, T.P., Wu, Y., Joiner, M.A., Koval, O.M., et al. (2015) Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Online] 112 (29), 9129–9134. Available from: doi:10.1073/pnas.1504705112.
- Rinne, A. & Blatter, L.A. (2010) Activation of NFATc1 is directly mediated by IP3 in adult cardiac myocytes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. [Online] 299 (5), H1701–H1707. Available from: doi:10.1152/ajpheart.00470.2010.
- Rooij, E. van, Doevendans, P.A., Theije, C.C. de, Babiker, F.A., et al. (2002) Requirement of Nuclear Factor of Activated T-cells in Calcineurin-mediated Cardiomyocyte Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 277 (50), 48617–48626. Available from: doi:10.1074/jbc.M206532200.
- Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., et al. (1991) Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. [Online] 83 (2), 504–514. Available from: doi:10.1161/01.CIR.83.2.504.
- Schartl, M., Gessler, M. & Eckardstein, A. von (2013) *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Urban & Fischer.
- Seidlmayer, L.K., Kuhn, J., Berbner, A., Arias-Loza, P., et al. (2016) IP3 mediated SRmitochondrial crosstalk influences ATP production via mitochondrial Ca2+ uptake through the mRyR1 in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. [Online] cvw185. Available from: doi:10.1093/cvr/cvw185.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A. & Balaban, R.S. (2000) Ca2+ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F0/F1-ATPase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 278 (2), C423–C435.
- Volgger, M. (2008) *Lichtmikroskopie Theorie und Anwendung*. [Online]. 29 February 2008. Available from: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/pdf/Lichtmikroskopie.pdf [Accessed: 16 January 2017].

- Wilkins, B.J., Dai, Y.-S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., et al. (2004) Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*. [Online] 94 (1), 110–118. Available from: doi:10.1161/01.RES.0000109415.17511.18.
- Williams, G.S.B., Boyman, L., Chikando, A.C., Khairallah, R.J., et al. (2013) Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Online] 110 (26), 10479–10486. Available from: doi:10.1073/pnas.1300410110.
- Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., et al. (2006) Local InsP3-dependent perinuclear Ca2+ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*. [Online] 116 (3), 675–682. Available from: doi:10.1172/JCl27374.
- Zhao, F., Li, P., Chen, S.R.W., Louis, C.F., et al. (2001) Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca2+ release channels: molecular mechanism and isoform selectivity. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] Available from: doi:10.1074/jbc.M006104200 [Accessed: 30 January 2017].
- Zima, A.V., Bare, D.J., Mignery, G.A. & Blatter, L.A. (2007) IP3-dependent nuclear Ca2+ signalling in the mammalian heart. *The Journal of Physiology*. [Online] 584 (Pt 2), 601–611. Available from: doi:10.1113/jphysiol.2007.140731.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ang II	Angiotensin II
АТР	Adenosintriphosphat
BNP	B-type natriuretisches Peptid
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinder Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺]	Calcium-Konzentration
[Ca ²⁺] _{mito}	mitochondriale Calcium-Konzentration
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ^{2+/} Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP response element binding protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetal calf serum
HDAC	Histon-Deacetylasen
IE	internationale Einheiten
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol 1, 4, 5-triphosphat-Rezeptoren
MCU	Mitochondrialer Calcium Uniporter
MEF-2	myocyte enhancer factor 2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mRyR	mitochondrialer Ryanodinrezeptor
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher

NFAT	nuclear factor of activated T-cells
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Pi	anorganisches Phosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pCaMKII	Phosphorylierte Ca ^{2+/} Calmodulin-abhängige Proteinkinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat
RyR	Ryanodinrezeptor
mRyR	mitochondrialer Ryanodinrezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatischen Retikulum
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ ATPase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VDAC	Voltage dependent anion channel

9. Konferenzbeitrag; Stipendium

Annalena Leucht, Annette Berbner, Oliver Ritter, Lea Seidlmayer Nuclear Ca²⁺ homeostasis is influenced by mitochondria DGK Herbsttagung 08-10.10.2015

Stipendiatin des Otto-Hess-Promotionsstipendiums der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gebührt mein Dank Prof. Dr. Oliver Ritter für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Forschungsgruppe anfertigen zu können. Seine konstruktive Kritik hat mich stets ein Stück weiter voran gebracht.

Herr Prof. Dr. Christoph Maack danke ich für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. med. Lea Seidlmayer. Sie hat mich von Anfang an unterstützt und mir wichtige theoretische Grundlagen erläutert. Später halfen mir die Diskussionen über die Ergebnisse für den weiteren Verlauf dieser Arbeit. Nach missglückten Versuchen, hat sie mich immer wieder motiviert, nicht aufzugeben.

Vielen Dank an Annette Berbner, die mir bei den praktischen Tätigkeiten im Labor immer zur Seite stand. Die Arbeit zusammen hat mir immer großen Spaß gemacht.

Ich danke auch der gesamten Arbeitsgruppe. Das Arbeitsklima war sehr harmonisch. Man konnte immer auf eure Unterstützung zählen.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie, insbesondere Tobias danken. Ihr habt mich immer unterstützt und wieder motiviert, wenn ich am Aufgeben war.