Aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmologie, Campus Benjamin Franklin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Mitochondrien in der Genese von Herzalternans und der Einfluss der Überexpression von Serca2a in Mauskardiomyozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Victoria Stary

aus Templin

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

| I | NHA | LTSVERZEICHNIS | 2 |
|----|-----|--|----|
| A | BST | RAKT | 4 |
| A | BKÜ | ĴRZUNGSVERZEICHNIS | 8 |
| A | BBI | LDUNGSVERZEICHNIS | 9 |
| | | | 10 |
| 1 | ABE | LLENVERZEICHNIS | 10 |
| 1. | J | EINLEITUNG | 11 |
| | 1.1 | Bedeutung von Alternans | 11 |
| | 1.2 | Calcium als Hauptmediator | 13 |
| | 1.3 | Die Rolle von Mitochondrien – Kraftwerke der Zelle oder doch mehr? | 14 |
| | 1.4 | Calciumtransport bei Alternans | 16 |
| 2. | , J | FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE | 18 |
| 3. | . I | METHODEN | 20 |
| | 3.1 | Versuchstiere | 20 |
| | 3 | 3.1.1 Charakteristika und Haltung | 20 |
| | 3 | 3.1.2 Serca2a-Maus | 21 |
| | 3.2 | Isolation von Kardiomyozyten | 22 |
| | | 3.2.1 Chemikalien und Reagenzien | 22 |
| | | 3.2.2 Durchführung | 23 |
| | 3.3 | Eine neue Methode zur Darstellung von Calcium | 26 |
| | | 3.3.1 Anwendung | 26 |
| | 2 | 3.3.2 Calciumindikatoren | 26 |
| | 2 | 3.3.3 Aufbau und Funktionsweise | 28 |
| | | 3.3.4 Inkubation von Calciumindikatoren | 31 |
| | 3.4 | Experimente | 32 |
| | | 3.4.1 Versuch A: Nachweis von Calciumindikatoren in zwei verschiedenen zellulären Kompartimenten | 32 |
| | | 3.4.2 Versuch B: Calciuminhalt des SR in Kardiomyozyten von Serca2a- überexprimierenden Mäusen und | l |
| | J | Kontroll-Mäusen | 34 |
| | 3 | 3.4.3 Versuch C: Änderung der Calcium-Homöostase durch verschiedene Chemikalien, die Mitochondrien | L |
| | ł | peeinflussen | 34 |
| | 3 | 3.4.4 Versuch D: Reversibilität der Alternansänderung in Kardiomyozyten durch Beeinflussung von | |
| | ľ | Mitochondrien | 35 |
| | 3 | 3.4.5 Versuch E: Unterschiede zwischen den Erholungskurven nach Stimulation von Kardiomyozyten von | |
| | I | Kontroll- und Serca2a-Mäusen | 36 |
| | 3.5 | Datenanalyse und Statistik | 37 |
| 4. | . 1 | ERGEBNISSE | 39 |

Inhaltsverzeichnis

| 4.1 | Isolation von Kardiomyozyten und Nachweis der Calciumindikatoren in unterschiedlichen | |
|-------|---|----|
| | Kompartimenten | 39 |
| 4.2 | Erhöhter Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums in Serca2a-Zellen | 41 |
| 4.3 | Beeinflussbarkeit der Calcium-Homöostase durch verschiedene Chemikalien | 43 |
| 4.4 | Reversibilität der durch Beeinflussung von Mitochondrien hervorgerufenen Änderung der Alternans | 52 |
| 4 | .4.1 Verbesserung der Alternansratio nach Gabe eines Antagonisten in Kontroll- und Serca2a-Zellen | 52 |
| 4 | .4.2 Verbesserungen der Alternans sind in den Mitochondrien am Größten | 55 |
| 4.5 | Steilere Erholungskurve in Serca2a-Zellen | 55 |
| 5. D | DISKUSSION | 59 |
| 5.1 | Lokalisation der Calciumindikatoren | 59 |
| 5.2 | Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums in Kontroll- und Serca2a-Zellen | 61 |
| 5.3 | Wirkungen der Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien auf Alternans | 62 |
| 5.4 | Möglichkeiten der Reversibilität von Alternans | 65 |
| 5.5 | Wirkungen der Überexpression der Serca2a auf die Erholung | 67 |
| 5.6 | Potenzielle Limitationen der Studie | 70 |
| 6. L | ITERATURVERZEICHNIS | 73 |
| LEBEN | NSLAUF | 86 |
| PUBLI | IKATIONSLISTE | 89 |
| EIDES | STATTLICHE VERSICHERUNG | 91 |
| DANK | SAGUNG | 92 |

Abstrakt

Obwohl der plötzliche Herztod zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Länder zählt, sind die Zusammenhänge, die zu seiner Entwicklung führen, wenig verstanden. Als ein zelluläres Korrelat für die elektrische Instabilität der Repolarisation des Herzens, spielt Alternans eine Rolle bei der Entwicklung von Arrhythmien. Neben einer reduzierten Ejektionsfraktion und weiteren Parametern sind Alternans der T-Welle ein anerkannter Risikofaktor für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes. Der Begriff Herzalternans beschreibt u.a. auch eine Veränderung des Calciumtransienten, die als charakteristisches ABAB-Muster auftritt. Calcium ist das wichtigste Ion für die Funktion des Herzens. Die Serca2a-ATPase pumpt Calcium in der Diastole zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum. Mitochondrien spielen zudem eine signifikante Rolle in der Calciumhomöostase. Hieraus resultiert die Überlegung, ob eine Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien einen Einfluss auf die Genese von Herzalternans hat und wie sich eine Überexpression der Serca2a auf Alternans auswirkt.

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode angewendet, die es erlaubt mittels Fluoreszenzmikroskopie Calciumtransienten in zwei Kompartimenten der Zelle gleichzeitig darzustellen. Es wurden Kardiomyozyten von Kontroll-Mäusen sowie transgenen Serca2aüberexprimierten Mäusen isoliert und mit Calciumfluoreszenzmarkern geladen. Die Beladungungskonditionen der Calciumindikatoren mussten ermittelt und die Lokalisation bewiesen werden. Der Calciuminhalt von Kontroll- und Serca2a-Zellen wurde verglichen. Dann wurde Herzalternans erzeugt und das Verhalten bei der Zugabe von Inhibitoren der Mitochondrienfunktion beobachtet. Zur Beurteilung vor und nach Applikation wurden Alternansratio errechnet. Außerdem wurde geprüft, ob die Veränderungen reversibel sind und eine Überführung von Alternans zu normalen Calciumtransienten gelingt.

Durch die pharmakologische Blockierung spezifischer Funktionen von Mitochondrien wurde Alternans im Zytosol und Mitochondrien verstärkt. Die folgenden Beobachtungen bestätigten die Hypothese, dass Serca2a eine kardioprotektive Wirkung hat, die auf Zellebene erklärt werden kann: Veränderungen der Alternansratio in den Serca2a-Zellen nach Exposition mit Chemikalien waren geringer als in Kontroll-Zellen, und Serca2a-Zellen zeigten eine schnellere Erholung. Außerdem konnte festgestellt werden, dass es in Kardiomyozyten, welche zuvor mit einer oxidierenden Chemikalie behandelt wurden, nach der Supplementation mit einem Antioxidans, teilweise zur Normalisierung von Alternans kam.

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal das simultane Auftreten von Herzalternans im Zytosol und Mitochondrien in Mauskardiomyozyten. Die Hauptaussage dieser Studie ist, dass

Abstrakt

die Beeinträchtigung der mitochondrialen Calciumhomöostase und Energieproduktion zu einer Verschlechterung von Herzalternans in beiden Kompartimenten führt und, dass diese Veränderungen bei Überexpression von Serca2a kleiner ausfallen. Es konnte bestätigt werden, dass die Überexpression der Serca2a zu einer verringerten Anfälligkeit für elektrische Instabilität bei metabolisch gestressten Kardiomyozyten führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad von Alternans moduliert werden kann. Das demonstriert einen Zusammenhang zwischen Alternans, sarkoplasmatischem Calciuminhalt, mitochondrialer Dysfunktion und trägt zum Verständnis von Veränderungen der Calciumhomöostase auf Zellebene bei.

Abstrakt

The role of mitochondria in the genesis of cardiac alternans and the influence of Serca2a upregulation in mouse cardiomyocytes

Cardiac alternans stands for a wide range of physiologic and pathologic conditions, such as an increased risk for ventricular and atrial arrhythmias and, as a sign for electrical instability, is a strong marker of sudden cardiac death besides others, such as reduced ejection fraction and electrocardiographic parameters. At the cellular level, alternans describes the beat-to-beat variation in calcium transient. Calcium is the most important ion for the function of the heart and mitochondria play a significant role in calcium signaling. The aim of this study was to investigate the effect of impaired mitochondrial function in the genesis of alternans and to establish a nouvelle technique to further understand how mishandling of calcium leads to pathologic conditions.

Cardiomyocytes were freshly isolated from control and transgenic Serca2a upregulated mice. The same cell solution was loaded with two different calcium indicators to enhance the accumulation in the mitochondria and the cytosol, measured with a custom-made Fluorescence System. Alternans was elicited by field stimulation. Once stable alternans was established, the superfusing solution was switched to a chemical influencing mitochondrial metabolism and calcium cycling.

Based on this method we altered different calcium pathways and examined their effect on alternans. We blocked complex I and II, cytochrome c oxidase, F_0F_1 - synthase, α -ketoglutarate dehydrogenase of the electron transport chain, inhibited calcium uptake via mitochondrial calcium uniporter and exposed cells to an oxidizing agent. Every intervention increased alternans in the cytosol and mitochondria in a specific range. Changes in Serca2a mice, that had higher sarcoplasmic calcium content, were always less severe than those observed in control mice during exposure with the chemical. We next examined if the observed changes of alternans are reversible using agonists of mitochondrial function.

This study presents the first simultaneous description of cardiac alternans in the cytosol and mitochondria observed in cardiomyocytes of control as well as in Serca2a mice hearts. The major findings of this study are that the impairment of mitochondrial calcium cycling and energy production leads to a higher alternans ratio in both control and Serca2a mice but changes in Serca2a mice are less severe, indicating that Serca2a mice are more capable to sustain electrical stability also during stress. Moreover it was possible to partly rescue alternans. This demonstrates a relationship between alternans, sarcoplasmic calcium content and mitochondrial dysfunction, which will help to understand the changes in calcium signaling in myocytes from patients with heart diseases, leading to new targets for therapeutic interactions.

Abkürzungsverzeichnis

- ADP = Adenosindiphosphat AM = Acetoxymethylester α MHC = α -Myosin-Heavy-Chain-Promotor ASCII = American Standard Code for Information Interchange ATP = Adenosintriphosphatau = arbitrary units, willkürliche Einheit BDM = 2,3-Butandionmonoxim CaMKII = Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II CGP = CGP-37157d.h. = das heißtDMSO = Dimethylsulfoxid EGTA = Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure FCCP = Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone i.p. = intraperitoneal KMVA = 2-Keto-3-methylvaleric-acid MCU = mitochondrialer Calcium-Uniporter mPTP = mitochondriale Transitionspore NAC = N-Acetyl-L-cysteinNADH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid NCX = Natrium-Calcium-Austauscher PhCMV = Humanes Zytomegalievirus-Promotor PKA = Proteinkinase A PMT = Photomultiplier Tube (Photoelektronenvervielfacher) RR = Ruthenium Red rpm = Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) rtTA = reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator sek = Sekunden SERCA = Sarkoplasmatische Retikulum-ATPase SR = Sarkoplasmatisches Retikulum
- TG = Thapsigargin
- TRE = Tetrazyklin-Response-Element

Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1: Beispiel von Alternans11 |
|---|
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung der binären transgenen Serca2a-Maus 21 |
| Abbildung 3: Bilder zur Durchführung der Präparation des Herzens |
| Abbildung 4: Zeitstrahl zur Isolation von adulten Kardiomyozyten |
| Abbildung 5: Fotoaufnahme des Messsystems |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Hyperswitch |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der zwei möglichen Indikator-Varianten |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs |
| Abbildung 10: Repräsentative Aufnahmen von isolierten Maus-Kardiomyozyten |
| Abbildung 11: Messung von Calciumindikatoren in Zytosol und Mitochondrien40 |
| Abbildung 12: SR-Calciumgehalt nach der Applikation von Koffein in Kontroll- und Serca2a- |
| Mäusen |
| Abbildung 13: Änderung der Alternansratio bei der Exposition der Kontroll-Zellen und Serca2a- |
| Zellen mit Rotenone und Antimycin |
| Abbildung 14: Änderung der Alternansratio bei der Exposition der Kontroll-Zellen und Serca2a- |
| Zellen mit Oligomycin und Natriumcyanid45 |
| Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel von Alternans vor und nach FCCP-Gabe |
| Abbildung 16: Änderung der Alternansratio bei der Exposition der Kontroll-Zellen und Serca2a- |
| Zellen mit FCCP und KMVA |
| Abbildung 17: Alternans vor und nach Gabe von Ruthenium Red in Kontroll- und Serca2a-Maus |
| |
| Abbildung 18: Vergleich der Alternansratio mit CGP und Cyclosporin A bei Kontroll- und51 |
| Abbildung 19: Vergleich der Alternansratio vor H2O2, während H2O2 und während der Gabe von |
| N-Acethylcystein bei Kontroll- und Serca2a-Mäusen |
| Abbildung 20: Repräsentatives Beispiel von Alternans in einer Zelle einer Kontroll-Maus vor |
| und nach Gabe des H2O2-Antagonisten N-Acethylcystein54 |
| Abbildung 21: Repräsentativer Ausschnitt aus einem S1-S2-Protokoll bei einer Kontroll-Maus |
| und einer Serca2a-Maus |
| Abbildung 22: Darstellung der Erholungskurven für jeden Calciumindikator bei Kontroll- und |
| Serca2a-Mäusen |

Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1: Zusammensetzung der CIB-Lösung | 22 |
|---|----|
| Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung | 22 |
| Tabelle 3: Weitere Lösungen und deren Bestandteile | 23 |
| Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, ihre Wirkung und Konzentration | 35 |
| Tabelle 5: Zeitkonstante τ in Millisekunden | 58 |

1.1 Bedeutung von Alternans

Einer der häufigsten Todesursachen in den westlichen Ländern ist der plötzliche Herztod. Schätzungen der Inzidenz variieren zwischen 50-100 unter 100.000 Personen in den westlichen Nationen [1]. In den USA sterben 450.000 Patienten pro Jahr aufgrund eines plötzlichen Herztodes [2] und auch in Deutschland erliegen 75.000-100.000 Menschen jedes Jahr den Folgen eines irreversiblen Kreislaufstillstandes [3]. Trotz dieser Zahlen sind die komplexen Zusammenhänge, die zur Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien führen, auf zellulärer Ebene wenig verstanden. Es ist bekannt, dass Herzalternans, neben einer reduzierten Ejektionsfraktion [4, 5] und weiteren Parametern [6], ein bedeutender Marker für das Risiko ist, einen plötzlichen Herztod zu erleiden [7], insbesondere nach Myokardinfarkt und bei chronischem Herzversagen mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion [8]. Das Auftreten von Alternans ist ein Zeichen von elektrischer Instabilität und Heterogenität der Erregungsrückbildung des Herzens [9].



Abbildung 1: Beispiel von Alternans

Links von der roten vertikalen Linie sind reguläre, normale Calciumtransienten aus dem Zytosol einer Kardiomyozyte einer Maus bei Kontraktion dargestellt. Rechts von der roten vertikalen Linie erfolgt der plötzliche Wechsel in Herzalternans im typischen ABAB-Muster. au = arbitrary units, sek = Sekunden

Der Begriff Herzalternans beschreibt auf zellulärer Ebene eine Veränderung des Calciumtransienten, des Aktionspotentials und der Kontraktionskraft. Herzalternans tritt als charakteristisches ABAB-Muster immer im Wechsel auf. Erstmals beschrieben durch Hering im Jahre 1908 [10], ist Alternans ein Phänomen mit multifaktoriellen Ursachen [11], welche bislang nicht im Detail erforscht sind. Hering erzeugte mit Hilfe von Glyoxylsäure am freipräparierten

Herzen eines Hundes alternierende Ventrikelkontraktionen von normaler und reduzierter Größe. Schon einige Jahre vorher (1872) beschrieb Traube Pulsus Alternans als klinisches Zeichen für Herzerkrankungen [12]. Sehr bald nach der Einführung des Elektrokardiogramms wurde von Lewis 1910 erstmals Alternans im EKG beschrieben [13], worin Alternans als spezifische Veränderung im ST-Segment zu erkennen ist [14]. Das Verständnis der Definition von Alternans hat sich im Laufe der Jahre allerdings weiterentwickelt. Der Begriff Herzalternans umfasst eine Reihe von physiologischen und pathologischen Besonderheiten, die sich jedoch in Bezug auf Ätiologie, klinischer Signifikanz und Ursache unterscheiden [15]. Das Auftreten von Alternans spielt nicht nur eine Rolle bei der Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien [16, 17], sondern ist auch ein Risikofaktor für Vorhofflimmern, welches die Genese von Embolien begünstigt [18]. Es ist bekannt, dass speziell Alternans der T-Welle assoziiert ist mit dem Auftreten von ventrikulärer Tachykardie und ventrikulärer Fibrillation nach myokardialer Ischämie [19, 20] sowie mit dem Long-QT-Syndrom [21]. Studien haben gezeigt, dass T-Wellen-Alternans primär durch Alternans der Repolarisationsphase verursacht wird und mit steigender Herzfrequenz zunimmt [20, 22]. Ebenso kann Alternans auch im gesunden Herzen unter chronotroper Stimulation oder signifikantem metabolischen Stress auftreten [23].

Von allen Ionen, die an der Arbeit des Herzens beteiligt sind, ist Calcium das Wichtigste. Es gibt Hinweise für die Annahme, dass der Hauptgrund für Arrhythmien und kontraktiler Dysfunktion in einer Dysbalance der Calciumhomöostase der Zellen liegt [24]. Außerdem wird das Entstehen von Alternans einem veränderten Umgang der Zelle mit Calcium und Veränderungen dieses Ions zugeschrieben [25]. Das Aufrechterhalten der Calciumhomöostase ist das Resultat eines komplexen Netzwerkes. Besonders das Verständnis der Bedeutung von Mitochondrien bei der Entstehung von Krankheiten hat sich aufgrund der Forschungsergebnisse der vergangenen zehn Jahre gewandelt. Es besteht Einigkeit darüber, dass Mitochondrien eine signifikante Rolle im Zellsignalweg und der Calciumhomöostase einnehmen. So konnte gezeigt werden, dass diese Zellorganellen in der Pathogenese und der Entwicklung von Erkrankungen des Herzen wie u.a. Herzinsuffizienz, dem Reperfusionsschaden nach Ischämie und Kardiomyopathien wesentlich beteiligt sind [26, 27].

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Teil der zugrunde liegenden Pathophysiologien bei Herzalternans auf zellulärer Ebene zu beleuchten und Impulse zu geben für mögliche therapeutische Ziele. Zudem ist noch nicht geklärt, wie sich Calcium im Mitochondrium bei Herzalternans verhält und wie diese Vorgänge beeinflusst werden können. In der vorliegenden Arbeit kommt eine neue Methode zur Anwendung, die es erlaubt, Calciumtransienten in verschiedenen Kompartimenten in frisch isolierten kontraktionsfähigen Kardiomyozyten

darzustellen und elektrisch Alternans zu erzeugen. Es soll untersucht werden, wie sich eine Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien und ein erhöhter Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) auf Herzalternans auswirkt. Zur Bearbeitung dieser Fragen kommen neben Kardiomyozyten von Wild-Typ-Mäusen auch Zellen von transgenen Mäusen mit einem erhöhten Calciuminhalt des SR zur Anwendung.

1.2 Calcium als Hauptmediator

In Kardiomyozyten ist Calcium der Hauptmediator der Kopplung von Erregung und Kontraktion und ist somit ausschlaggebend für die Tätigkeit und Relaxation der Herzkammern [28]. Der Begriff der elektromechanischen Kopplung beschreibt die Erregung einer Herzmuskelzelle und ihrer darauffolgenden Kontraktion.

Während des Aktionspotentials strömt Calcium in die Zelle durch Calcium-Kanäle vom L-Typ ein, die durch Depolarisation aktiviert werden. Der Zustrom von Calcium in der Plateauphase der Erregung führt zu einer von Calcium induzierten Freisetzung von Calciumionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum durch die Ryanodinrezeptoren, worauf sich die intrazelluläre Konzentration von Calcium erhöht. Die Menge an Calcium, die das SR verlässt, ist proportional zur Kontraktionskraft und hängt im Wesentlichen von folgenden Faktoren ab: der Menge an Calcium, das durch den L-Typ Kanal einströmt, der Menge an Calcium im SR und der Freisetzung von Calcium aus dem SR, was durch die Erholungszeit des Ryanodinrezeptors bestimmt wird [28].

Calcium fungiert als direkter Aktivator des Myofilaments Troponin C. Das Binden des Ions an Troponin C führt zu einer Lageveränderung des Troponin I und somit zu Verschiebung des Tropomyosins, dadurch werden die Myosinbindungsstellen an den Aktinuntereinheiten freigegeben. ATP wird am Myosin gebunden, Myosin löst sich von Aktin, die Myosin-ATPase spaltet ATP in ADP und ein Phosphat. Es kommt daraufhin zu einer erneuten Anlagerung vom Myosin an Aktin. Die Abgabe des Phosphats führt zu einem Abkippen des Kopf-Halswinkels von 90° auf 45° und zu einer Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente. Die Sarkomere verkürzen sich und in der Summe kommt es so zur Kontraktion. Calcium ist daher als Initiator der Kontraktionen essentiell für die Aktivität des Herzens.

Für die Relaxation in Folge der Kontraktion muss die Calciumkonzentration in der Zelle abnehmen. Vier Mechanismen sind dafür verantwortlich: Die sarkoplasmatische Retikulum-ATPase (Serca), der Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellwand, die Calcium-ATPase in der Zellwand und der Calcium-Uniporter in den Mitochondrien. Ob die mitochondriale Transitionspore (mPTP) zu einem Abfall von Calcium unter nicht pathologischen Bedingungen

beiträgt, wird kontrovers diskutiert [29]. Der quantitative Anteil jedes Mechanismus ist allerdings je nach Spezies unterschiedlich [30]. Im Allgemeinen trägt die Serca den größten Teil zum Abfall der Calciumkonzentration im Zytosol bei, indem sie Calcium in der Diastole zurück in das SR pumpt. Es gibt 3 verschiedene Unterformen der Serca (Serca 1-3), welche in verschiedenen Geweben exprimiert werden [31]. Davon ist Serca2a die primäre Isoform des Herzens [32]. Bei Herzinsuffizienz ist die Expression der Serca reduziert, während der Natrium-Calcium-Austauscher vermehrt exprimiert wird. So kommt es zu einem reduzierten Calciumangebot im SR, welches wiederum zu einer verminderten Freisetzung von Calcium aus dem SR im Zuge einer Kontraktion führt. Diese beiden Mechanismen sind als Hauptursache des kontraktilen Defizits bei Herzinsuffizienz anzusehen [33].

Es ist bekannt, dass Calcium in der Physiologie und Pathophysiologie von einigen Erkrankungen eine Hauptrolle einnimmt. Trotzdem war die Darstellung von Calcium in lebenden Zellen aufgrund technischer Limitationen bisher nur unzureichend möglich [34]. Bis dato gab es keine Möglichkeit in lebenden, kontrahierenden Herzzellen Calcium in verschiedenen Kompartimenten der Zelle gleichzeitig darzustellen und zum Beispiel bei Herzalternans auf diese Weise direkt zu untersuchen. Als wichtige Kompartimente, die zur Calciumregulierung beitragen, werden immer mehr die Mitochondrien gesehen, was die Frage aufwirft, welche Rolle Mitochondrien bei der Genese von Alternans spielen und ob es Möglichkeiten gibt, in dieses Zusammenspiel einzugreifen.

1.3 Die Rolle von Mitochondrien – Kraftwerke der Zelle oder doch mehr?

Seit den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wird davon ausgegangen, dass Mitochondrien aus prokaryotischen Zellen hervorgegangen sind, im Zuge der Evolution in eine eukaryotische Wirtszelle aufgenommen wurden und mit ihnen eine Endosymbiose eingegangen sind [35, 36]. Im Laufe der Zeit müssen Regulationswege entstanden sein, die es möglich machen, die Energieproduktion der Mitochondrien an den Energiebedarf der Zelle anzupassen.

Lange Zeit wurden Mitochondrien lediglich als Kraftwerke der Zelle gesehen. Über 90 % des benötigten ATP für die physiologische Kontraktion wird von den Mitochondrien produziert [37]. Besonders viele Mitochondrien sind in Zellen mit hohem Energiebedarf wie in Herzmuskelzellen anzutreffen. Sie versorgen die Zelle mit Energie für die Kontraktion, für ATP-abhängige Calciumpumpen wie die Serca, die zellwandständige Calcium-ATPase und liefern ATP für Phosphorylierungsprozesse. So wird das Regulatorprotein Phospholamban durch die Proteinkinase A mit Hilfe von ATP phosphoryliert, dadurch wird vermehrt Calcium durch die Serca in das SR aufgenommen. Obwohl Mitochondrien unbestritten der Ort der ATP-Synthese

sind, ist nicht vollständig geklärt, wie der Bedarf vom Zytosol an die Mitochondrien weitergeleitet wird. Frühere Studien gingen von einem Feedbackmechanismus von ATP-Produktion in den Mitochondrien und ATP-Hydrolyse im Zytosol aus [38, 39]. Das heißt, dass die Konzentration von ADP und P im Zytosol proportional zur Arbeitslast des Herzens steigt. Im Gegensatz dazu wird heute davon ausgegangen, dass das Herz in der Lage ist, die Metabolite relativ konstant zu halten. Das Aufrechterhalten dieser Homöostase ist das Resultat eines komplexen Netzwerkes. Studien an Tiermodellen [40, 41] und Menschen [42, 43] haben gezeigt, dass der ATP-Umsatz sich bei steigender Arbeitslast erhöht, die Konzentration aber gleich bleibt. Diese metabolische Homöostase scheint sich bis in die Mitochondrien fortzusetzen, da auch NADH dort bei steigender Arbeit konstant gehalten wird [38].

Der mitochondrialen Permeabilitätspore wird eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zelltod zugesprochen [44]. Erstmals beschrieben durch Hunter und Haworth 1979 [45-47] führt die Induktion der Permeabilitätspore unter pathologischen Bedingungen zur Schwellung der Zelle und schließlich zur Apoptose. Ihr wird die Hauptrolle beim Zellschaden nach Ischämie, wie zum Beispiel bei einem Myokardinfarkt zugeteilt [48]. Mit dem Verständnis, dass Mitochondrien Apoptose regulieren können [49, 50], änderte sich das Bild von den Kraftwerken der Zelle hin zu einem möglichen Ziel von Therapiestrategien [51, 52] und Kardioprotektion [53, 54].

Calcium ist der Regulator der oxidativen Phosphorylierung [55], aktiviert mitochondriale Dehydrogenasen [56-58] und gilt auch als möglicher wichtiger Signalweg vom Zytosol ins Mitochondrium [59]. Es besteht Uneinigkeit darüber, ob Mitochondrien Calcium schnell, also pro Schlag aufnehmen [60-63] oder ob sie Calcium eher langsam integrieren [63, 64]. Frühere Studien gingen davon aus, dass die Calciumaufnahme und -abgabe zu langsam erfolge, sodass Mitochondrien nicht in der Lage wären mit einer zeitlich adäquaten Veränderung ihrer Calciumkonzentration auf die Calciumkonzentration im Zytosol bei veränderter Arbeitslast des Herzens zu reagieren [65]. Die Entwicklung neuer technischer Methoden, Calcium in Mitochondrien zu untersuchen, führte zu der Erkenntnis, dass eine schnelle Integration des Ions ins Mitochondrium möglich ist. Die in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschriebene Methode soll zur weiteren Klärung dieser Frage beitragen.

Zudem gibt es einerseits Anhaltspunkte, dass Störungen der mitochondrialen Homöostase auch Auswirkungen auf Alternans im Zytosol haben, wobei Effekte auf mitochondrialer Ebene nicht untersucht wurden [66]. Denkbar ist anderseits, dass das Exponieren mit Antagonisten des mitochondrialen Calciumhaushalts einen untergeordneten Einfluss auf Herzalternans des

Zytosols hat. Die daraus resultierende Frage, ob Mitochondrien auch bei Herzalternans eine beeinflussbare Rolle einnehmen, soll in dieser Arbeit geklärt werden.

1.4 Calciumtransport bei Alternans

Das Entstehen von Alternans scheint in einem veränderten Umgang der Zelle mit Calcium zu liegen [25]. Studien weisen darauf hin, dass dem Calciumzyklus besonders im SR hohe Bedeutung bei der Genese von Alternans beigemessen werden muss [22, 67, 68]. Zwei Rolle: Calciumaufnahme Parameter spielen eine signifikante und -abgabe des Sarkoplasmatischen Retikulums. Faktoren, die zu einer Erhöhung der Calciumabgabe aus dem SR oder zu einer reduzierten Einfuhr von Calcium in das SR in der Diastole führen, begünstigen das Entstehen von Alternans. Die Serca2a (sarkoplasmatische Retikulum-ATPase) und die Ryanodinrezeptoren sind der Schlüssel für die Balance im Calciumhaushalt. Um das Gleichgewicht zu erhalten, muss die Menge an Calcium zur Kontraktion, die aus dem SR ins Zytosol strömt, der Menge entsprechen, die in der Diastole das Zytosol durch die Serca2a und den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) wieder verlässt. Bei einer verminderten Expression oder Funktionsfähigkeit der Serca [69] und erhöhter Expression des NCX [70] wie bei Herzinsuffizienz, kann das nur bei jedem alternierenden Schlag passieren, was die Entstehung von Alternans fördert. Zudem konnte von Armoundas et al. gezeigt werden, dass es in Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der Funktion der L-Typ Kanäle und einem ineffektiven Abtransport von Calcium aus dem Zytosol ins SR kommt, welcher örtlich inhomogen ist, je nachdem, wo sich die Zelle im linken Ventrikel befindet [71].

Allerdings gibt es einige Kompensationsmechanismen, die der Etablierung von Alternans entgegenwirken. So kommt es bei der Erhöhung der Herzfrequenz zu einer Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Kinase II, welche den Inhibitor der Serca2a Phospholamban phosphoryliert und so zu einer verbesserten Funktion der Serca2a führt [70]. Dieser Mechanismus ist allerdings ebenfalls bei Patienten mit Herzinsuffizienz gestört [72]. Die eben beschriebenen Effekte sind synergistisch [73]. Eine verminderte Serca2a-Funktion führt: a) zur Erhöhung des zytosolischen Calciums, dadurch zur Inaktivierung des Calciumeinstromes ins Zytosol und zur verminderten Freisetzung von Calcium über die Ryanodinrezeptoren und b) zum verminderten Calciumangebot im SR, was weiterführend die Calciumabgabe durch die Ryanodinrezeptoren senkt.

Mit den folgenden Experimenten soll geprüft werden, ob es möglich ist, diesen Kreislauf durch die Regulierung eines Mitspielers, nämlich durch die Überexpression der Serca2a und damit der Erhöhung des Calciuminhalts des SR, zu durchbrechen und die Entstehung von

Alternans zu verhindern. Eine Studie zeigte ein vermindertes Auftreten von ventrikulären Arrhythmien nach Serca2a-Überexpression bei Reperfusionsschaden [74]. Ob die vermehrte Expression von Serca2a eine Auswirkung auf Alternans hat oder sogar der Effekt dadurch erklärt werden kann, wurde nicht festgestellt und genaue Wirkungen auf die gesamte Zelle sind bis jetzt noch nicht im Detail erforscht.

Die Calciumabgabe und -aufnahme innerhalb von Herzzellen hängt im Wesentlichen von zwei Faktoren ab: einerseits von der Verfügbarkeit von ATP, um Calciumpumpen anzutreiben und als Substrat für Phosphorylierungen zu fungieren, sowie anderseits von calciumspeichernden Organellen. Für beides sind Mitochondrien zuständig. Hieraus resultiert die Überlegung, ob eine Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien einen Einfluss auf die Genese von Herzalternans hat.

Während das Beladen und die spezifische Lokalisierung von einigen Calciumindikatoren sehr gut beschrieben und untersucht sind [75], ist das spezifische Beladen von Mitochondrien sowie des SR als eher problematisch anzusehen [76]. Die Inkubationskonditionen müssen empirisch ermittelt werden und mögliche Calciumindikatoren auf deren Lokalisation im Mitochondrium hin untersucht werden. Das Laden eines Calciumindikators in das SR von Kardiomyozyten ist nicht sehr weit verbreitet. Das mag an der im Vergleich zu zytosolischen Calciumproben verlängerten Inkubationszeit liegen. Nach dem erfolgreichen Laden in das SR, müssen die Zellen immer noch qualitativ so hochwertig sein, dass sie bei elektrischer Stimulation für mehrere Minuten eine gleichbleibend gute Kinetik zeigen und chemische Interventionen überstehen ohne vor Experimentende zu sterben. Fraglich ist außerdem, ob es gelingt, Kardiomyozyten gleichzeitig mit zwei Indikatoren für Calcium zu beladen und verwertbare Fluoreszenzsignale zu generieren.

2. Fragestellungen und Ziele

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, eine genauere Aussage über die Rolle von Mitochondrien bei der Entstehung von Herzalternans zu treffen. Insbesondere soll das Zusammenspiel von Mitochondrium und SR bezüglich der Genese von Alternans untersucht werden und damit zur Klärung der Frage beitragen, wodurch das antiarrhythmogene Potential bei Serca2a-Überexpression ausgelöst wird und ob diese Überexpression einen signifikanten Einfluss auch auf Herzalternans hat.

Um dieses Ziel zu erreichen, beantwortet die vorliegende Studie folgende Fragestellungen:

A) Ist der Nachweis von Calciumindikatoren in zwei verschiedenen zellulären Kompartimenten experimentell möglich?

Zunächst muss geklärt werden, ob es möglich ist, Calciumindikatoren selektiv in verschiedene Kompartimente der Zelle zu laden und wenn ja, ob es gelingt, zwei verschiedene Calciumindikatoren in zwei verschiedene Kompartimente (Zytosol/SR, Zytosol/Mitochondrium, SR/Mitochondrium) gleichzeitig zu laden.

B) Ist der Calciuminhalt des SR in Kardiomyozyten von Serca2a-überexprimierenden Mäusen höher als in jenen von Kontroll-Mäusen?

Weiter ist die Beobachtung zu überprüfen, ob transgene Mäusen nach siebentägiger Doxycyclingabe Serca2a überexprimieren (in weiterer Folge als "Serca2a-Maus" bezeichnet), es zu einem signifikant vermehrten SR-Calciuminhalt kommt und dieser höher liegt als in Wild-Typ-Mäusen (in weiterer Folge als "Kontroll-Maus" bezeichnet). Die Erstbeschreiber der transgenen Serca2a-Maus berichten eine Erhöhung des Calciuminhalts im SR von 45 % [77].

C) Kann die Calciumhomöostase durch verschiedene Chemikalien, die Mitochondrien beeinflussen, verändert werden?

Mittels unterschiedlicher Calciumindikatoren soll geprüft werden, ob Herzalternans auch in den Mitochondrien nachweisbar ist und wie sich zuvor etablierte Alternans im Zytosol und gegebenenfalls im Mitochondrium bei Beeinflussung der mitochondrialen Integrität und Funktion ändert.

D) Ist die Änderung der Alternans in Kardiomyozyten durch Beeinflussung von Mitochondrien reversibel?

Sollte das Exponieren der Kardiomyozyten mit Chemikalien, die einen Einfluss auf Calciumhomöostase und die Funktion von Mitochondrien haben, auch Alternans beeinflussen, so ist es in weiterer Folge interessant, ob dieser Effekt reversibel ist. Fraglich ist, ob es durch die Gabe eines entsprechenden Antagonisten der zuvor eingesetzten Chemikalien wieder zu einer Stabilisierung von Alternans, also zur Normalisierung der Calciumtransienten, kommt.

E) Gibt es einen Unterschied zwischen den Erholungskurven nach Stimulation von Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäusen?

Bei einer erhöhten Expression von Serca2a stehen mehr Calciumpumpen am SR bereit, um Calcium in der Diastole zurück in das SR zu pumpen. Die Calciumabnahme des Zytosols und die Repolarisation können schneller und fraglich auch effektiver stattfinden. Möglich ist, dass damit mehr Calcium für die Kontraktion im nächsten Zyklus zur Verfügung steht und dieser Mechanismus gegebenenfalls die in C und D gesehenen Veränderungen erklärt. Dies soll durch die Untersuchung der Erholungskurven von Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäusen ermittelt werden.

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Charakteristika und Haltung

Folgende Experimente wurden am Massachusetts General Hospital, Boston, USA, in der Zeit von September 2010-September 2011, Februar-April 2012 und Juli-Oktober 2012 im Labor von Antonis A. Armoundas, PhD, Cardiovascular Research Group, Navy Yard Building 149, 13th Street, Charlestown durchgeführt.

In den Experimenten wurden transgene Serca2a- und Wild-Typ-Mäuse (in weiterer Folge als "Kontroll-Maus" bezeichnet) genutzt. Es wurden Kardiomyozyten von männlichen als auch weiblichen 6-12 Wochen alten Tieren mit einem Gewicht von etwa 30 Gramm isoliert. Die Homogenität der adulten Versuchstiere ermöglichte eine höhere Reproduzierbarkeit der Isolation, weil wechselnde Herzgrößen eine Anpassung der Enzymmenge nötig machen. Außerdem ist bei der Isolation die Kanülierung eines zu kleinen Herzens schwierig. Da die Mäuse im Rahmen der Versuche euthanasiert wurden, können keine Angaben über das Überleben gemacht werden. Es wurden jedoch keine Unterschiede in Größe und Gewicht zu Wildtyp-Mäusen gefunden, was mit der bereits publizierten Charakterisierung der Mäuse konform ist [77].

Die Erstbeschreiber der Serca2a-Maus Suarez et al. treffen in der veröffentlichten Publikation auch Aussagen über den Calciumtransienten und über die Kontraktilität der Serca2ahochregulierten-Zellen [77]. Bei diesen Zellen zeigen die Calciumtransienten insgesamt einen höheren systolischen Gipfel und ein schnelleren Abfall. Zudem kann eine erhöhte Kontraktilität festgestellt werden. Das heißt, Serca2a-Zellen zeigen bei elektrischer Stimulation im Vergleich zu Wildtyp-Zellen prozentual eine höhere Zellverkürzung. Vergleichende Echokardiographien zwischen Serca2a-Zellen und Wildtyp-Zellen ergeben eine größere Verkürzungsfraktion sowie Hinterwanddicke für Serca2a-Zellen.

Die Versuchstiere wurden in der Einrichtung für Labortiere des Hauses gehalten und dort von Tierpflegern betreut. Maximal 4-5 Tiere, je nach Größe beziehungsweise Gewicht, waren in einem Polypropylen-Käfig untergebracht. Ein Käfig hatte die Größe von 19,7 cm x 30,5 cm und war 16,5 cm hoch. Wasser aus einer Polypropylen-Flasche und eine ausgeglichene Nahrung erhielten sie in Form von Pellets ad libitum. Bei der Verwendung von Serca2a-Mäusen wurde Doxycyclin (Doxycycline Hydrochloride 95 %, Fisher BioReagents, 200 mg/l) 7 Tage lang in autoklaviertes Trinkwasser gemischt. Normales, unbehandeltes Wasser stand den Versuchstieren in dieser Zeit nicht zu Verfügung.

Alle Protokolle wurden von dem "Subcommittee on Research Animal Care (SRAC)" begutachtet und in seiner Funktion als "Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)" gemäß der Leitlinien des "Public Health Service on Humane Care and Use of Laboratory Animals" und des "USDA Animal Welfare Act" genehmigt. Die Autorin dieser Arbeit erhielt eine Einweisung und ein Training des SRAC im Umgang mit Labortieren.

3.1.2 Serca2a-Maus

Die transgenen Serca2a-Mäuse [77] wurden von Dr. Suarez von der University of California-San Diego, La Jolla, Kalifornien, USA zur Verfügung gestellt. Die Besonderheit dieser Tiere liegt darin begründet, dass die Genexpression der Serca2a regulierbar ist, da es nach siebentägiger Tetrazyklingabe zu einer Überexpression der Serca2a kommt. Bei der Generierung von konditionell regulierbaren Mäusen sind zwei Zelllinien notwendig, die ein regulatorisches Element stabil in ihrem Genom tragen. Durch die Kreuzung dieser beiden Linien entstehen doppelt transgene Tiere, die über ein funktionsfähiges Expressionsmuster verfügen. Eine Möglichkeit zur Herstellung ist das von Gossen und Bujard vorgestellte Tet-On-Genexpressionssystem [78], das auch bei der Herstellung der Serca2a-Maus verwendet wurde. Suarez et al. nutzten Konstrukte aus zwei zuvor beschriebenen verschiedenen Mauslinien und pflanzten sie in fertilisierte Mauseier.







Überexpression der Serca2a kommt (Abbildung nach Suarez et al.[77]).

 α MHC-Promotor = α -Myosin-Heavy-Chain-Promotor, rt-Ta = Tetrazyklin-Transaktivator, TRE = Tetrazyklin-Response-Element, PhCMV = Humanes Zytomegalievirus-Promotor

In Abbildung 2 wird die Generierung der transgenen Serca2a-Maus schematisch dargestellt. Linie 1 [79] enthält einen reverse Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (rtTA) mit einem α-Myosin-Heavy-Chain-Promotor (α MHC-Promotor). Tetrazyklin sowie dessen Derivate können an dieses Regulatorprotein binden und bewirken eine Konformationsänderung des Transaktivators. Dieser ist nun in der Lage, in der Linie 2 [80] über das sogenannte Tetrazyklin-Response-Element (TRE) an das erste und zweite Intron des Flag-markierten-Serca2a Transgens zu binden und dessen Transkription zu fördern.

3.2 Isolation von Kardiomyozyten

3.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Basisreagenzien wurden circa einmal pro Woche hergestellt und bei 4 °C gelagert. Es wurde sterilisiertes, doppelt destilliertes Wasser (Ultra Pure Water) für alle Reagenzien benutzt. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Kurz vor jeder Isolation wurden die benötigten Lösungen, wie in 3.2.2 beschrieben, hergestellt.

| Name | Konzentration in | Molekulares | CAS-Nummer | Hersteller |
|---|------------------|-------------------------|------------|-------------------|
| | mM | <i>Gewicht in g/mol</i> | | |
| NaCl | 130 | 58,43 | 7647-14-5 | Fisher Scientific |
| KCl | 5,4 | 74,55 | 7447-40-7 | Fisher Scientific |
| 1M MgCl ₂ -6H ₂ O | 0,5 | 95,21 | 7786-30-3 | Sigma-Aldrich |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,33 | 119,98 | 7558-80-7 | Sigma-Aldrich |
| Glucose | 22 | 180,16 | 50-99-7 | Sigma-Aldrich |
| HEPES | 25 | 238,30 | 7365-45-9 | Sigma-Aldrich |

Tabelle 1: Zusammensetzung der CIB-Lösung

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

| Name | Konzentration in | Molekulares | CAS-Nummer | Hersteller |
|---|------------------|------------------|------------|-------------------|
| | тM | Gewicht in g/mol | | |
| NaCl | 140 | 58,43 | 7647-14-5 | Fisher Scientific |
| KCl | 5,4 | 74,55 | 7447-40-7 | Fisher Scientific |
| 1M MgCl ₂ -6H ₂ O | 0,5 | 95,21 | 7786-30-3 | Sigma-Aldrich |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,33 | 119,98 | 7558-80-7 | Sigma-Aldrich |
| Glucose | 11 | 180,16 | 50-99-7 | Sigma-Aldrich |
| HEPES | 5 | 238,30 | 7365-45-9 | Sigma-Aldrich |
| CaCl ₂ | 1,8 | 147.01 | 10035-04-8 | Sigma-Aldrich |

| Reagenz | Bestandteile | Konzentration | CAS- Nummer | Hersteller |
|-----------------|---|---------------------|----------------|-------------------|
| BSA-Reagenz | Albumin in 15 ml H ₂ O | 50 mg/ml Albumin | 9048-46-8 | Sigma-Aldrich |
| EGTA Reagenz | EGTA in 1 M NaOH | 400 mM EGTA | 67-42-5 | Sigma-Aldrich |
| Insulin-Reagenz | Insulin (boviner Pankreas) in 0,1 mM HCl | 1 U/ml Insulin | 11070-73-8 | Sigma-Aldrich |
| 1 M NaOH | NaOH in H ₂ O | 1 M NaOH | 1310-73-2 | Fisher Scientific |
| 0,1 mM HCl | 5 mM HCl-Lösung in H ₂ O | 0,1 mM HCl | 7647-01-0 | Fisher Scientific |

Tabelle 3: Weitere Lösungen und deren Bestandteile

3.2.2 Durchführung

Zunächst musste die Technik der Isolation von Herzmuskelzellen im Labor etabliert werden. Die Protokolle folgen einem gemeinsamen Prinzip, benutzen aber zum Teil verschiedene Chemikalien.

Mit dem Protokoll von Shioya et al. [81] gelang, im Gegensatz zu dem von Liao et al. [82] vorgestellten Prozedere, die Isolation von Calcium-resistenteren und langlebigeren Zellen. Liao et al. nutzten für die Elimination von Calcium 2,3-Butandionmonoxim (BDM). Es ist allerdings bekannt, dass BDM die Kontraktilität von Kardiomyozyten negativ beeinflusst [83-85]. Statt BDM nutzt das Protokoll von Shioya Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure (EGTA) und als Besonderheit auch Insulin. Im Hinblick auf die zu erwartenden langen Inkubationszeiten wurde daher mit dem Protokoll von Shioya weitergearbeitet. Die Zellen wurden jeweils täglich isoliert, bei Raumtemperatur in 1,8 mM Calcium Tyrode-Lösung unfixiert aufbewahrt, bis zu 8 Stunden für Experimente verwendet und dann entsorgt.

Zunächst wurde die Maus in einen geschlossenen Behälter transferiert. Ein zuführender Plastikschlauch enthielt 5 % des Anästhetikums Isofluran (Isoflurane, Baxter AG, 250 ml Flasche) und Sauerstoff mit einem Fluss von 100 ml/min. Dann wurde die Maus heparinisiert (Heparin Sodium Injection, USP, 1,000 Units/ml, App Pharmaceuticals, 0,2 ml i.p.), auf das chirurgische Brett verlagert und fixiert. Die Schnauze wurde in einen Schlauch geschoben, der Isofluran und Sauerstoff förderte, sodass bis zuletzt ein suffizienter Kreislauf mit Protektion des Gewebes erreicht werden konnte. Nach einer ausreichender Anästhesie der Maus, wurde Isofluran auf eine Erhaltungsdosis von 3 % reduziert. Das Abdomen wurde eröffnet, Rippen und Sternum entfernt, um mit einer Pinzette das Herz von dorsal anzuheben und sämtliche Gefäße zu

durchschneiden. Circa 5 mm von der Aortenklappe entfernt, wurde die Aorta durchtrennt. Sofort wurde das Herz in eine Petrischale mit eiskalter CIB-Lösung mit 0,4 mM EGTA und 50 µU/ml Insulin (EGTA-CIB) transferiert und extrakardiales Gewebe entfernt. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta präpariert und mittels einer selbstentworfenen fixen Einrichtung, bestehend aus Kanüle, Spritze mit eiskalter EGTA-CIB-Lösung, einem Klemmarm und Halteständer (Fisher Scientific) kanüliert, sodass die Spitze der Kanüle nicht die Koronarostien verlegte. Dann wurde die Aorta mittels eines 4-0 Vicryl-Fadens und einer Gefäßklemme (Dieffenbach, 35 mm) fixiert. Das in der Petrischale befindliche kanülierte und mit der Gefäßklemme fixierte Herz mit der Spritze ist in Abbildung 3 A dargestellt. Sofort wurde eiskalte EGTA-CIB-Lösung infundiert, um das restliche Blut aus den Gefäßen herauszuwaschen. Dies bewirkte die Elimination von Calcium, Verringerung der Zellkontraktion und Glukoseverbrauchs, was zum Schutz der Kardiomyozyten beitrug. Das kanülierte Herz wurde an einen Langendorff-Perfusionsapparat angeschlossen und so mit 37 °C warmer EGTA-CIB-Lösung über die Koronarostien für 3 Minuten perfundiert, um Calcium weiter auszuspülen (Abbildung 3 B). Mit Hilfe des Langendorff-Perfusionsapparats konnten die Lösungen erwärmt und in variierbarer Geschwindigkeit dem Herzen zugeführt werden.



Abbildung 3: Bilder zur Durchführung der Präparation des Herzens

A) Die Kanülierung der Aorta erfolgte unter dem Mikroskop, gefolgt von der Fixierung mit Gefäßklemme und Vicryl-Faden. Dann wurden die Koronarien mittels dargestellter Spritze mit eiskalter EGTA-CIB-Lösung perfundiert, um restliches Blut und somit Calcium zu entfernen. Das Herz befindet sich in einer Petrischale mit ebenfalls gekühlter EGTA-CIB-Lösung.

B) Das kanülierte Herz ist am Langendorff-Apparat angeschlossen, wodurch die Lösungen auf 37 °C erwärmt und über die Koronarien dem Herzen zugeführt werden.

C) Wasserbad, Pumpe, Langendorff-Apparat, Zeitmesser und Druckmessgerät (von links nach rechts).

Die Perfusionsrate wurde immer dem Druck angepasst. Dieser sollte bei erfolgreicher Kanülierung zwischen 50-60 mmHg betragen. Ein zu hoher Druck bedeutete eine zu tiefe Kanülierung mit Verlegung der Koronarostien, somit keine Perfusion und Versorgung mit Glukose. Ein zu niedriger Druck würde für eine Verletzung oder ein Herausrutschen der Spitze Szenarien führten Minderperfusion, sprechen. Beide zur sowie zu erheblicher Qualitätsminderung der Zellen und bedeuteten in der Regel, dass die Isolation abgebrochen wurde und neu begonnen werden musste. Nach 3 Minuten wurde zu Enzym-A-Lösung gewechselt, welche aus CIB-Lösung mit 0,3 mM CaCl₂, 1,2 mg/ml Collagenase B (Katalognummer: 11088823103, Roche), Collagenase D (Katalognummer: 11088874103, Roche), 0,08 mg/ml Protease (Typ XIV, CAS-Nummer: 9036-06-0, Sigma-Aldrich) und 0,08 mg/ml Trypsin (CAS-Nummer: 9002-07-7, Sigma-Aldrich) bestand. Nach circa 7 Minuten begann der Druck zu fallen, was als Beginn der Digestion gewertet werden konnte. Durch Erhöhung der Flussrate wurde dann versucht so lange wie möglich einen Druck über 50 mmHg und damit eine gute Perfusion zu erhalten. War das nicht mehr möglich, so wurde das nun von der Konsistenz schwamm-ähnliche Herz von der Kanüle genommen und in einer Petrischale 2-3mal zerschnitten. Es wurde circa 37 °C warme Enzym-B-Lösung dazugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Diese Enzym-Lösung entsprach mit dem Unterschied von auf 0,7 mM erhöhtem CaCl₂ und 2 mg/ml BSA der Enzym-A-Lösung.



Abbildung 4: Zeitstrahl zur Isolation von adulten Kardiomyozyten

Ablauf der Isolation mit Angabe der Zeit in Minuten. Jeder Schritt variiert jedoch von Isolation zu Isolation. Besonders die Zeit der Exposition mit Enzymlösung muss dem Grad der fortgeschrittenen Verdauung des Gewebes angepasst werden, um Über- oder Unterdigestion des Gewebes zu vermeiden.

Nach dieser Zeit wurde das bereits aufgelockerte und gelöste Gewebe etwas bewegt und mit einer Plastikpipette mit abgeschnittener Spitze etwa 10-mal langsam auf- und abpipettiert bis es total dissoziiert war. Die Zellsuspension wurde dann durch ein 300 μ m Netz (Spectra Nylon Mesh Filters 300 μ m, Lot.-Nummer: 3247105, Spectrum Laboratories) gefiltert und für 3 Minuten bei Raumtemperatur bei 300 rpm zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde dann nach der Zentrifugierung mit einer Plastikpipette aufgenommen und in der BSA-Lösung für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Digestion zu stoppen. Die Lösung enthielt 2 mg/ml BSA und auf 1,2 mM erhöhtes CaCl₂. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit einer Plastikpipette aufgenommen und in circa 10 ml Tyrode-Lösung transferiert, die eine Calciumkonzentration von 1,8 mM hatte. In dieser Form wurden die Zellen bei Raumtemperatur für bis zu 8 Stunden gelagert und für Experimente genutzt.

3.3 Eine neue Methode zur Darstellung von Calcium

3.3.1 Anwendung

In Zusammenarbeit mit der Firma IonOptix, Milton, USA und Prof. Armoundas wurde eine neue Methode zur Calciummessung mittels Fluoreszenz entwickelt, die als erstes von der Autorin dieser Arbeit benutzt wurde. Das Besondere daran ist, dass in einer isolierten Kardiomyozyte, die zuvor mit zwei verschiedenen Calciumindikatoren markiert wurde, Calciumintensitäten in zwei verschiedenen Kompartimenten der Zelle bei einem Kontraktionszyklus gleichzeitig gemessen werden können. Dazu ist es möglich, Messungen der Sarkomerlänge und Zelllänge während einer Reihe von Kontraktionen zu beliebig einstellbaren Frequenzen durchzuführen. Die Firma IonOptix bietet serienmäßig Versuchsaufbauten an, die lediglich einen Farbstoff detektieren können. Dafür bedient es sich der Fluoreszenzeigenschaften von verschiedenen Stoffen, die bei Anregung durch eine stoffspezifische Wellenlänge Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Elektronen des fluoreszierenden Stoffes absorbieren hierbei Photonen. Um zwei Farbstoffe zeitgleich zu erregen und ihre Emission aufzufangen, bedarf es speziellen Vorrichtungen, die unter 3.3.3 vorgestellt werden.

3.3.2 Calciumindikatoren

Calciumindikatoren sind Fluoreszenzmoleküle, die ihre Fluoreszenzeigenschaft ändern, sobald sie Calcium binden. Sie fungieren als Calciumchelatoren und sind strukturell verwandt mit einem Derivat des EGTA. Die hier zur Verwendung kommenden Indikatoren sind Acetoxymethylester (AM-Ester). Sie sind deshalb sehr praktisch, weil sie lipophil sind und in

Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst in eine Lösung mit Zellen gegeben werden können. Sie überwinden die Zellmembran und die AM-Ester-Gruppe wird durch zelleigene unspezifische Esterasen abgebaut. In weiterer Folge entsteht eine Carboxylgruppe, die Indikatoren sind in der Zelle "gefangen" und können dort Calcium binden. Die Wahl der Indikatoren richtete sich zum einen nach den zu detektierenden Zellkompartimenten. Zum anderen mussten die Farbstoffe, sollten sie gleichzeitig verwendet werden, unterschiedliche Emissionsspektren haben, sodass sie einander nicht überlagern. Das hatte zur Folge, dass die Auswahl der Farbstoffe auch den technischen Aufbau bestimmte, da speziell für diese Farbstoffe entsprechende Filter eingebaut werden mussten. Mit dem verwendeten Mikroskopaufbau ist das Messen von 2 Varianten mit jeweils 2 Farbstoffen möglich. Folgende Kombinationen von Calciumindikatoren wurden für die Experimente verwendet:

Variante 1: Calciumindikatoren Fluo und Rhod

Variante 2: Calciumindikatoren Indo und Rhod

Im Folgenden werden die einzelnen Calciumindikatoren beschrieben. Dabei ist es auch möglich, dass unterschiedlichen Derivate der Farbstoffe genutzt werden können (Fluo-4, AM und Fluo-5N, AM bzw. Rhod-2, AM und x-Rhod-1, AM). Die Derivate von Fluo als auch von Rhod unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Fluoreszenzeigenschaft, allerdings ist deren bevorzugte Akkumulationseigenschaft in einem bestimmten Zellkompartiment unterschiedlich.

Indo-1, AM

Indo-1, AM wird bei einer Wellenlänge von 346 nm erregt. Im Gegensatz zu anderen Calciumindikatoren hat Indo-1, AM einen doppelten Emissions-Gipfel bei 405 und 485 nm. Das heißt, die Emission ist eine Ratio aus zwei Wellenlängen. Aus diesem Grund sind auch zwei Photomultiplier (Verstärker) für die Detektion der Emission von Indo notwendig. Indo-1, AM lagert sich bevorzugt im Zytosol an.

Fluo-4, AM

Fluo-4, AM hat eine Exzitationswellenlänge bei 484 nm und das Emissionsmaximum bei 517 nm und lagert sich bevorzugt im Zytosol an.

Fluo-5N, AM

Fluo-5N, AM ist ein Derivat von Fluo-4, AM und hat eine niedrigere Affinität zu Calcium. Dadurch kann Calcium in calciumreichen Kompartimenten detektiert werden, in denen die Antwort von Fluo-4, AM gesättigt wäre. Aus diesem Grund kann es zur Darstellung von Calcium im Sarkoplasmatischen Retikulum verwendet werden.

Rhod-2, AM

Rhod-2, AM hat ein Exzitationsmaximum bei 552 nm und ein Emissionsmaximum bei 581 nm. Es lagert sich bevorzugt im Zytosol an.

x-Rhod-1, AM

x-Rhod-1, AM hat ein Exzitationswellenlänge von 580 nm und eine Emission von 602 nm. Diese Form von Rhod ist kationisch und fördert so die spannungsgesteuerte Aufnahme des Indikators in die Mitochondrien.



3.3.3 Aufbau und Funktionsweise

Abbildung 5: Fotoaufnahme des Messsystems

Darstellung des Mikroskops und der angeschlossenen technischen Geräte. PMT = Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier Tubes)

Wie in Abbildung 5 zu sehen, besteht das Messsystem aus einem Mikroskop (Motic, Type 101 M, Canada), dem sogenannten Hyperswitch mit Lichtquelle (dessen Inhalt in Abbildung 6 dargestellt wird), einem Lichtleiter und Elektronenvervielfacher (Photomultiplier Tubes, PMT). Mit Hilfe des Myopacers können die Zellen elektrisch stimuliert werden. Eine Kamera ist mit einem Computer verbunden und liefert in Echtzeit die Bilder zu dem Programm IonWizard 6.0 (IonOptix, Milton, USA), mit dem die Daten generiert und gespeichert werden.

Das Fluorescence System Interface fungiert als Schnittstelle zwischen Messsystem und dem Computerprogramm.

Zusammen mit der Lampe befinden sich im sogenannten Hyperswitch auch ein austauschbares Filterteil sowie ein kleiner Spiegel. Der Strahlengang im Hyperswitch ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Als Lichtquelle dient eine Xenon-Lampe (Xenon Power Short Arc Lamp, 75W, USHIO, USA). Der Galvanische Spiegel bündelt das Licht zum austauschbaren Filterteil, der einem Kubus gleicht. Im austauschbaren Filterteil trifft das Licht zunächst direkt auf den ersten Filter. Gleichzeitig wird ein Teil des Lichtes abgelenkt, um auf den zweiten Filter zu treffen, der im 90 Grad Winkel zum ersten Filter angeordnet ist. So entstehen zwei sich zeitlich überlappende Wellenlängen mit denen es nun möglich ist, zwei Stoffe gleichzeitig mit ihrer spezifischen Wellenlängen und Fluoreszenzfarbstoffe zu nutzen. Am Ende des Hyperswitches befindet sich zudem ein Filterrad, mit dem die Menge des Lichtes reguliert werden kann. Das Exzitationslicht wird dann mit Hilfe eines Lichtleiters zum Mikroskop geleitet.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Hyperswitch

Die Aluminiumspiegel bündeln das Licht der Xenon-Lampe (rot) auf einen Galvanischen Spiegel. Durch zwei Linsen und einen weiteren Aluminiumspiegels trifft das Licht im Filterkubus auf zwei verschiedene Filter. So entstehen zwei verschiedene Wellenlängen (grün und dunkelblau), die nun überlappen (hellblau) und gebündelt zum Mikroskop geleitet werden (Abbildung nach Ionoptix Anleitung [86]).

Um das einfallende anregende Licht zum Objektiv zu leiten, ist ein dichroitischer Spiegel im Mikroskop zwischengeschaltet. Dichroitische Spiegel reflektieren Licht, dass kleiner ist als

ihre Grenzwellenlänge. Das Anregungslicht, das eine kleinere Wellenlänge als das Emissionslicht hat, wird so reflektiert und auf das Objektiv geleitet. Auch der dichroitische Spiegel kann je nach gewünschter Wellenlänge mit einem Hebel an der Seite am Mikroskop verändert und ausgetauscht werden. Das Absorptionslicht fällt nun auf das Präparat und erregt die darin befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe, die in einen energetisch höheren Zustand übergehen. Durch das ankommende anregende Photon wird ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da energetisch niedrigere Zustände bevorzugt werden, fällt es wieder zurück und emittiert dabei ein energieärmeres, langwelligeres Photon. Es findet somit eine Wellenlängenverschiebung von Absorptions- und Emissionslicht statt, der sogenannte Stokes-Shift.

Als nächsten Schritt im Strahlengang trifft dieses Licht auf eine Reihe von dichroitischen Spiegeln, die das Licht zuerst zur Kamera und nun zu den in einer Reihe geschalteten dazugehörigen Photomultiplier Tubes (PMT) "sortieren". Da PMT nicht wellenlängenselektiv sind, müssen vorher die gewünschten Wellenlängen gefiltert und auf verschiedene PMT aufgeteilt werden. Die Spiegel wurden so gewählt, dass die Wellenlänge des Emissionslichtes über der kritischen Wellenlänge des dichroitischen Spiegels liegt. So wird das gewünschte Licht jeweils in die PMT reflektiert. Licht höherer Wellenlänge wird durchgelassen. Es trifft erneut auf einen dichroitischen Spiegel, der wiederum so gewählt wurde, dass er nur bestimmtes Emissionslicht in einen weiteren PMT reflektiert. Auch hier ist es möglich die Spiegel auszuwechseln und bei Bedarf andere Fluoreszenzfarbstoffe und Wellenlängen zu nutzen.

PMT auch Photoelektronenvervielfacher genannt, können schwache Lichtsignale, wie die einzelner Photonen, registrieren und verstärken. Die Photonen treffen in einer Vakuumröhre auf eine Photokathode. Aus dieser werden Elektronen herausgelöst und treffen auf Dynoden, aus denen sie weitere Elektronen herauslösen. So nehmen die Elektronen von Dynode zu Dynode zu. Am Ende des Kolbens treffen sie auf eine Anode, wo die Ladung zu einem Strompuls führt.

Durch die Auswechselbarkeit der Filter im Hyperswitch, im Mikroskop und vor dem PMT ergeben sich 2 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Calciumindikatoren, die in Abbildung 7 dargestellt sind. In Variante 1 sind aufgrund der Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe nur ein dichroitischer Spiegel und zwei PMT notwendig. In Variante 2 sind zwei dichroitische Spiegel hintereinander geschaltet und "sortieren" das gewünschte Licht in die dazugehörigen drei PMT.

Das Mikroskop beinhaltet einen tiefer gelegten Objektträger, auf dem einige Tropfen mit Zellen in Tyrode-Lösung pipettiert werden können. Nach wenigen Sekunden siedeln sich die Kardiomyozyten am Boden ab. Während der Dauer eines Experiments werden die Zellen

kontinuierlich mit Tyrode-Lösung superfundiert, einerseits, um nichtgebundenen Farbstoff auszuwaschen und anderseits, um die Haltbarkeit der Zellen zu verlängern. An beiden Seiten der Kammer befindet sich jeweils eine Elektrode. Diese Elektroden sind mit dem sogenannten Myopacer verbunden und erzeugen ein elektrisches Feld in der Kammer. Mit Hilfe des Myopacers können die Zellen mit einer bestimmten Frequenz stimuliert und zum Kontrahieren gebracht werden. Damit ist es auch möglich, verschiedene Zyklen und Frequenzabfolgen zu programmieren, wie beispielsweise in dem in 3.4.5 beschriebenen S1-S2-Protokoll.

A

B



Abbildung 7: Schematische Darstellung der zwei möglichen Indikator-Varianten

Links im Bild befindet sich jeweils der Hyperswitch, rechts im Bild das Mikroskop mit Vorrichtung für die PMT. Durch die Möglichkeit des Wechselns der Filter (dargestellt als Kubus mit dunkelgrauem Kreis) im Hyperswitch, im Mikroskop und vor den PMT ergeben sich zwei verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von Calciumindikatoren. Die Position der Filterkuben ist jeweils mit Hilfe eines hellgrauen Pfeils dargestellt.

A) Variante 1: Calciumindikatoren Fluo und Rhod.

B) Variante 2: Calciumindikatoren Indo und Rhod.

PMT = Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier Tubes)

3.3.4 Inkubation von Calciumindikatoren

Für die folgenden Experimente wurden die Kardiomyozyten mit den Calciumindikatoren x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM hintereinander beladen. Die Inkubationskonditionen wurden so gewählt, dass x-Rhod-1, AM in den Mitochondrien und Fluo-4, AM im Zytosol akkumuliert. Die Zellen in Tyrode-Lösung wurden zunächst mit x-Rhod-1, AM (1,4 μM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit farbstofffreier Tyrode-Lösung gewaschen. Dieselbe Zelllösung wurde dann mit dem Indikator Fluo-4, AM (10 μM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) für weitere 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde der Überstand abpipettiert und mit farbstofffreier Tyrode-Lösung gewaschen. Nach der Beladung wurde eine Zeit von 45 Minuten für die Deesterifikation abgewartet.

Beim Experiment Erholungskurve (3.4.5) wurde auch mit Fluo-5N, AM beladen. Dann wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben mit x-Rhod-1, AM oder Fluo-4, AM inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit indikatorfreier Tyrode-Lösung gewaschen. Dieselbe Zelllösung wurde dann mit dem Calciumindikator Fluo-5N, AM (5 μM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Waschung und eine Deesterifikationszeit von 1,5 Stunden bei 37 °C. X-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM wurden von einer Stammlösung (Stock Solution) aus Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) und 5 % Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) verwendet. Fluo-5N, AM wurde aus einer Stock Solution von DMSO und 0,25 % Pluronic F-127 benutzt. Einmal geladen, wurde mit den Zellen für bis zu 8 Stunden experimentiert.

3.4 Experimente

3.4.1 Versuch A: Nachweis von Calciumindikatoren in zwei verschiedenen zellulären Kompartimenten

Folgendes Experiment sollte durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass Fluo-4, AM zumeist im Zytosol und x-Rhod-1, AM in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die Zellen wurden simultan wie in 3.3.4 erwähnt mit den Farbstoffen x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM beladen. Eine kleine Menge (in etwa 2 Tropfen aus einer 1 ml Plastikpipette) der Zellflüssigkeit wurde in die Kammer des Mikroskops pipettiert. Die weiteren Schritte dieses Experiments sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Nachdem sich die Zellen innerhalb einer Minute am Boden der Kammer angesiedelt hatten, wurden sie für 5 Minuten kontinuierlich mit Tyrode-Lösung mit einer niedrigen Calciumkonzentration von 0,2 mM perfundiert, um nicht gebundenen Indikator auszuwaschen und eine Fluoreszenz-Grundline aufzunehmen. Danach wurde die Calciumkonzentration der Tyrode-Lösung auf 1,5 mM angehoben. Um sicher zu gehen, dass Signaländerungen nur aus den Mitochondrien und dem Zytosol kommen, wurde dann die Aufnahme und Abgabe von Calcium ins Sarkoplasmatische Retikulum geblockt, indem der gleichen superfundierenden Lösung der Serca-Inhibitor Thapsigargin (2 μ M, Invitrogen, Carlsbad, USA) und der Ryanodinrezeptorblocker Ruthenium Red (20 μ M, Sigma-Aldrich) beigefügt wurde.



Superfundieren mit 1,5 mM Ca²⁺ Ruthenium Red + Thapsigargin

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Zunächst wurde eine Grundline mit niedrigkonzentrierter Calciumlösung aufgenommen und nichtgebundener Fluoreszenzmarker ausgewaschen. Dann wurde Calcium auf 1,5 mM erhöht. In einem weiteren Schritt wurde Ruthenium Red und Thapsigargin zu der Lösung dazugeben, damit sollte der Calciumein- und -ausstrom des SR geblockt werden. Dann wurden FCCP und Oligomycin hinzugefügt, um den elektrochemischen Gradienten für die Aufnahme von Calcium ins Mitochondrium zu zerstören. FCCP = Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

Die Intensitäten von Calcium wurden gemessen bis sich ein Gleichgewicht einstellte. Dann wurde der superfundierenden Lösung der Entkoppler FCCP ($20 \mu g/ml$, Carbonyl-cyanidep-trifluoromethoxyphenylhydrazone, Sigma-Aldrich) und Oligomycin A ($20 \mu g/ml$, Sigma-Aldrich) zugegeben, um den elektrischen Gradienten für die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien zu zerstören. Falls Fluo-4, AM zumeist im Zytosol gespeichert wurde, so sollte es bei einer Erhöhung der Calciumkonzentration zu einem Anstieg des Signals kommen. Außerdem wurde erwartet, dass es nach der Zugabe der Entkoppler zu einem weiteren Intensitätsanstieg kommt, wohingegen das Signal von x-Rhod-1, AM, das in den Mitochondrien lokalisiert sein sollte, abnimmt.

Thapsigargin wurde zuvor in DMSO gelöst. Ruthenium Red wurde aus einer Stammlösung in Wasser (bei 4 °C, lichtgeschützt gelagert) zugegeben. FCCP und Oligomycin A wurden in DMSO gelöst und die für ein Experiment benötigte Menge in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gefüllt. FCCP Proben wurden bei 4 °C und Oligomycin A Proben wurden bei -8 °C laut Empfehlung der Hersteller gelagert.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde jeweils vom Datensatz abgezogen. Nach der Zugabe von FCCP und Oligomycin wurde ein Abfall der Calciumintensität erwartet. Der Abfall wurde durch die Änderung vom höchsten Messwert, hervorgerufen durch das Superfundieren der

Zellen mit 1,5 mM Ca²⁺, bis zum niedrigsten Messwert nach Oligomycin- und FCCP-Gabe ermittelt. Der höchste Messwert war somit 100 %. Als niedrigster zu erreichender Messwert wurde der totale Verlust des Protonen- und Calciumgradienten mit alleinigem Vorhandensein der Hintergrundfluoreszenz angenommen.

3.4.2 Versuch B: Calciuminhalt des SR in Kardiomyozyten von Serca2aüberexprimierenden Mäusen und Kontroll-Mäusen

Es sollte untersucht werden, inwiefern sich der Calciuminhalt im SR von Kontroll-Mäusen und von Serca2a-Mäusen unterscheidet. Serca2a-Mäuse wurden verwendet, nachdem sie 7 Tage lang Doxycyclin erhalten hatten. Es wurde also derselbe Versuch an Kontroll-Mäusen als auch an Serca2a-Mäusen nach siebentägiger Doxycyclingabe durchgeführt. Koffein öffnet reversibel die Ryanodinrezeptoren am SR, sorgt für eine große Kontraktion und lässt so Calcium frei [87]. Zunächst musste eine zweite Perfusionslinie in die Kammer eingebracht werden. Es wurde so programmiert, dass sich auf einen Trigger des Myopacer hin die Klappe einer Tyrode-Lösung mit Koffein (10 mM, Sigma-Aldrich) kurzzeitig öffnet und wieder schließt (500 ms).

Die Zellen wurden hintereinander wie in 3.3.4 beschrieben mit den Farbstoffen x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM beladen. Eine kleine Menge der Zellflüssigkeit wurde in die Kammer des Mikroskops pipettiert. Nachdem sich die Zellen innerhalb einer Minute am Boden der Kammer angesiedelt hatten, wurden sie kontinuierlich mit Tyrode-Lösung (1,8 mM Calcium) superfundiert. Es wurde jeweils eine Zelle herausgesucht. Die Zellen wurden für 30 Schläge mit 2 Hz, 12 Volt durch den Myopacer stimuliert. Anstelle des zu erwartenden 31. Schlages, öffnete stattdessen die Klappe und ließ Koffein in die Kammer strömen. Es wurde erwartet, dass sich mit einer Überexpression der Serca2a auch mehr Calcium im SR befindet.

Die Hintergrundfluoreszenz wurde von den gewonnenen Daten subtrahiert. Jedes Experiment wurde am Koffein-vorausgehenden Calciumtransienten normalisiert, d.h. der letzte normale Transient der Applikation von Calcium war jeweils 1. Nach der Applikation wurde ein vergrößerter Calciumtransient erwartet und dessen Ausdehnung abgelesen.

3.4.3 Versuch C: Änderung der Calcium-Homöostase durch verschiedene Chemikalien, die Mitochondrien beeinflussen

Der Versuch wurde an Kontroll-Mäusen und Serca2a-Mäusen nach siebentägiger Doxycyclingabe durchgeführt. Zunächst sollte ein Protokoll zur Etablierung von stabilen Alternans entworfen werden. Die Zellen wurden bei der Perfusion mit Tyrode-Lösung bei Raumtemperatur schrittweise stimuliert. Es wurde bei 1 Hz begonnen und dann in 1 Hz Schritten

die Frequenz erhöht bis die Zelle stabile Alternans zeigte. Dann wurde der superfundierenden Tyrode-Lösung jeweils eine der in Tabelle 4 aufgelisteten Chemikalien, die Einfluss auf die Calciumhomöostase und die ATP-Herstellung haben, beigefügt und das Verhalten der Alternansratio beobachtet.

| Name | Wirkmechanismus | Konzentration |
|---|--|---------------|
| Natriumcyanid | Blockiert Komplex IV (Cytochrom-c- Oxidase) der Atmungskette | 1 mM |
| Carbonyl-cyanid-p- trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) | Zerstört den Protonengradienten, erniedrigt ATP-Produktion | 0,1 μΜ |
| Oligomycin A | Blockiert F ₀ F ₁ - Synthase | 1 µg/ml |
| Antimycin | Blockiert Komplex III der Atmungskette | 5 µg/ml |
| Rotenone | Blockiert Komplex I der Atmungskette | 5 μΜ |
| Ruthenium Red | Verhindert Calciumaufnahme in die Mitochondrien durch Blockade des MCU | 10 µM |
| 2-Keto-3-methylvaleric-acid (KMVA) | Blockiert α -Ketoglutarat-Dehydrogenase | 5 mM |
| CGP 37157 (CGP) | Verhindert die Calciumabgabe der Mitochondrien durch Blockade des Na ⁺ - Ca ²⁺ - Austauscher | 5 μΜ |
| H_2O_2 | Oxidierend, reaktive Sauerstoffspezies | 0,1 mM |

Alle Chemikalien bis auf CGP wurden von Sigma-Aldrich bezogen. CGP wurde von Tocris (Ellisville, USA) bestellt. FCCP, Antimycin, Oligomycin, Rotenone und CGP wurden aus einer Stammlösung mit DMSO hergestellt. Ruthenium Red wurde aus einer Stammlösung mit Wasser (bei 4 °C, lichtgeschützt gelagert) zugegeben. Natriumcyanid, KMVA und H₂O₂ Lösung wurden direkt zur Tyrode-Lösung gegeben.

3.4.4 Versuch D: Reversibilität der Alternansänderung in Kardiomyozyten durch Beeinflussung von Mitochondrien

Die nächste Reihe an Versuchen diente zur Klärung, ob die beobachteten Veränderungen durch die Zugabe von Antagonisten, also Substanzen, die in ihrer Wirkung der in Tabelle 4 genannten Chemikalien entgegengesetzt sind, reversibel sind. Dazu wurden die Experimente mit

CGP und H_2O_2 , wie in 3.4.3 beschrieben, wiederholt. Nach der Zugabe von CGP oder H_2O_2 wurde zunächst abgewartet, bis die Veränderungen ein Gleichgewicht erreicht hatten. Dann wurde zu dieser Lösung jeweils der passende Antagonist hinzugegeben. CGP verhindert die Calciumabgabe der Mitochondrien durch Blockade des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers. Hohe Calciumkonzentrationen im Mitochondrium führen zu einer Öffnung der mPTP. Die Zugabe von Cyclosporin A sollte die Öffnung der mPTP verhindern. Beim zweiten Experiment dieser Art wurde untersucht, ob die Zugabe einer reduzierenden Chemikalie wie N-Acetyl-L-Cystein (NAC) nach der Etablierung von Alternans und der Beeinflussung durch H_2O_2 eine Auswirkung auf die Alternansratio hat.

Cyclosporin A (10μ M, Sigma-Aldrich) wurde aus einer Stammlösung mit DMSO hergestellt. NAC (2 mM, Sigma-Aldrich) wurde direkt zur Tyrode-Lösung gegeben.

Zuerst wurde wieder die Hintergrundfluoreszenz wie oben beschrieben vom aufgenommenen Datensatz jeder Zelle subtrahiert. Alternansratio wurden von 5 repräsentativen AB-Mustern vor und nach Gabe der zu untersuchenden Substanz bestimmt und der Mittelwert für jedes Experiment errechnet und verglichen.

3.4.5 Versuch E: Unterschiede zwischen den Erholungskurven nach Stimulation von Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäusen

Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäuse nach siebentägiger Doxycyclingabe wurden mit Fluo-5N, AM, x-Rhod-1, AM und Rhod-2, AM wie in 3.3.4 beschrieben, beladen. Die Zellen wurden gemäß eines eigens entworfenen S1-S2-Protokolls stimuliert. Es wurde mit 30 Schlägen (S1) bei 2 Hz stimuliert. Dann folgte ein einziger Schlag (S2). Bei jedem nun folgenden Zyklus wurde die Frequenz von S2 erhöht, angefangen von 2 bis 8,5 Hz im letzten Zyklus (Abbildung 9). Aus den gesammelten Daten wurde eine Erholungskurve für jeden Calciumindikator und für jede Gruppe (Kontroll-Maus versus Serca2a-Maus nach Doxycyclin) entworfen. Die Zeitkonstante tau (τ) wurde daraus errechnet.

Wieder wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz von den gewonnenen Daten abgezogen. Es wurde jeweils die Änderung der Calciumintensität von S1 zu S2 gemessen. Damit wurde eine Erholungskurve erstellt. Jede bei S2 gemessene Calciumintensität war ein Punkt auf der Kurve. Für die Erholungskurve wurden die bei S2 verwendeten Herzfrequenzen in Millisekunden umgewandelt und auf der y-Achse aufgetragen. Um eine "Erholung" darzustellen, wurden die Daten andersherum aufgetragen. So befindet sich der Messpunkt S2 mit 2 Hz mit der gemessenen Intensität ganz rechts auf der y-Achse und 8,5 Hz links. Dann wurde mit Hilfe des
Methoden

Programms Origin eine Exponentialkurve an jede Erholungskurve angepasst und die Geradengleichung dazu errechnet. Daraus ließ sich dann das τ ablesen.





Die Kardiomyozyten wurden gemäß des dargestellten S1-S2-Protokoll elektrisch stimuliert. Es erfolgten pro Zyklus jeweils 30 Schläge (S1) bei 2 Hz, darauf wurde dann ein einziger Schlag (S2) appliziert. Bei jedem folgenden Zyklus wurde die Frequenz von S2 erhöht, während S1 gleich blieb.

3.5 Datenanalyse und Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe der Software IonWizard 6.0 (IonOptix, Milton, USA) generiert und mit Origin (OriginLab, Wellesley Hills, USA) analysiert. Da jede einzelne Zelle eine experimentelle Einheit darstellt, wurde die Statistik auf der Basis von Zellen berechnet. Somit entspricht die Angabe von N der Anzahl der untersuchten Zellen. Die Calciumfluoreszenzwerte sind als au-Werte (arbitrary units), also willkürliche Einheiten, generiert worden. Die Daten jedes Experimentes, also jeder Zelle, wurden dann als ASCII-Werte (American Standard Code for Information Interchange) aus IonWizard exportiert und in Origin importiert. Graphiken wurden ebenfalls mit Origin erstellt. Ein p-Wert < 0,05 begründete eine Statistische Vergleiche statistische Signifikanz. zwischen Ergebnisse mit einem Calciumindikator wurden mit dem gepaarten zweiseitigen t-Test ermittelt. Für statistische Vergleiche zwischen Kontroll- und Serca2a-Mäusen wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet. Die Hintergrundfluoreszenz wurde für jede untersuchte Zelle von den gewonnenen Daten subtrahiert. Sie war ein Mittelwert aus drei verschiedenen Aufnahmen. Dafür wurde jeweils für 10 Sekunden der zellfreie Hintergrund so nah wie möglich an der ursprünglichen Zelle, mit der experimentiert wurde, aufgenommen. Die Alternansratio wurden errechnet mit: 1-S/L. S (small) steht für den kleinen Calciumtransienten, wohingegen L (large) für den größeren der beiden Calciumtransienten in einem ABAB-Muster steht. Eine Ratio von 1 heißt somit ein

größtmöglicher Grad an Alternans. 0 bedeutet, es sind keine Alternans vorhanden. Die Werte beziehen sich auf Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils 5 aufeinanderfolgenden Alternans.

4.1 Isolation von Kardiomyozyten und Nachweis der Calciumindikatoren in unterschiedlichen Kompartimenten

Aufgrund der teilweise recht langen Inkubationszeiten und der Verwendung von bis zu zwei Calciumindikatoren gleichzeitig war es nötig, für jedes Experiment frisch extrahierte und qualitativ hochwertige Kardiomyozyten zu haben. Je besser die Qualität, desto höher war in der Regel auch die Quantität.

Abbildung 10 A-C gibt einen Eindruck von der Morphologie der isolierten Zellen. Eine qualitativ gut-isolierte Kardiomyozyte hatte die Form einer Stange (rhod-shaped), die Querstreifung sollte genau erkennbar sein, mit deutlich begrenzten Ecken und eher dreidimensional als flach erscheinen (Abbildung 10 A). Bei der Auswahl einer Zelle für jedes Experiment wurde auf diese Kriterien geachtet. Im Gegensatz dazu zeigten weniger gute Zellen unscharfe Querstreifung, runde Enden, Bläschen (sogenannte blebs), gekräuselte Membranen bis hin zum sogenannten Meatball (Fleischbällchen) (Abbildung 10 B, C). Allerdings war nicht nur die Morphologie bei der Auswahl einer Zelle bedeutsam, sondern besonders deren Funktionalität. Deswegen wurden die Zellen während der Auswahl einer geeigneten Kardiomyozyte bei einer niedrigen Frequenz (2 Hz) vor jedem Experiment stimuliert und auf deren Kontraktion und Kinetik hin evaluiert. Eine geeignete Zelle kontrahierte regelhaft bei jeder Stimulation und zu beiden Seiten gleichmäßig. Die Änderung der Sarkomerlänge zur Ausgangslänge bei jeder Kontraktion musste mindestens 10 % betragen.





A-C) Dargestellt sind Beispiele isolierter Kardiomyozyten. (A) Besonders gut isolierte Zellen haben die Form einer Stange, die Querstreifung ist erkennbar und sie erscheinen dreidimensional. (B, C) Qualitativ schlechte Kardiomyozyten sind an sogenannten Meatballs erkennbar (siehe Pfeile) und weisen eine unscharfe Querzeichnung sowie gekräuselte Membranen auf. Diese Zellen wurden nicht für die durchzuführenden Experimente verwendet.

Als Basis für die weiteren Experimente diente der Nachweis, dass Calcium in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen detektierbar ist, und sich der Calciumindikator Fluo-4, AM vor allem im Zytosol und x-Rhod-1, AM in den Mitochondrien von Kardiomyozyten einlagert. Abbildung 11 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Zellen wurden nacheinander, wie in 3.3.4 beschrieben, mit den beiden Farbstoffen beladen. Es wurde etwa eine Minute gewartet, so dass sich die Zellen am Boden der Kammer ansiedeln konnten. Dann wurde für 5 Minuten kontinuierlich mit Tyrode-Lösung mit einer niedrigen Calciumkonzentration von 0,2 mM perfundiert, um nicht gebundenen Indikator auszuwaschen.



Abbildung 11: Messung von Calciumindikatoren in Zytosol und Mitochondrien

Die Zellen wurden hintereinander mit x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM geladen. Es sollte die Lokalisation der Calciumindikatoren überprüft werden. Die Calciumkonzentration wurde von 0,2 mM auf 1,5 mM angehoben. Es kam zu einem Anstieg der Calciumintensitäten. Bei der Zugabe des Entkopplers FCCP (Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) und Oligomycin kam es zu einem Abfall der Calciumintensität von x-Rhod-1, AM und zu einem Anstieg bei Fluo-4, AM. au = arbitrary units, sek = Sekunden

Zunächst wurde eine Grundline der beiden Indikatoren x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM Superfusion mit dieser während der niedrig-konzentrierten Calcium-Tyrode-Lösung (0,2 mM Ca²⁺) aufgenommen. Die Messung der Calciumintensität wurde begonnen, als die Calciumkonzentration in dieser Lösung auf 1,5 mM angehoben wurde (Abbildung 11). Beide Calciumintensitäten, gemessen mit den Indikatoren x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM, stiegen erwartungsgemäß daraufhin an. Als sie nicht mehr weiter anstiegen, wurden zu dieser superfundieren Lösung der Serca-Inhibitor Thapsigargin und der Ryanodinrezeptorblocker Ruthenium Red hinzugegeben, um die Calciumaufnahme sowie Calciumabgabe in das SR und somit eine Beeinflussung des Calciumsignals zu vermeiden. Die Calciumkonzentration blieb in dieser Lösung gleich. Daraufhin kam es zu keiner signifikanten Änderung der Calciumintensität gemessen mit den zwei Calciumindikatoren. Als dieser Lösung der Entkoppler FCCP und Oligomycin hinzufügt wurde, kam es zu einem starken Abfall vom Fluoreszenzsignal von x-Rhod-1, AM um 72,67 % \pm 1,19 (n = 12 aus 9 Mäusen). Im Gegensatz dazu wurde gleichzeitig eine Erhöhung der Calciumintensität von Fluo-4, AM registriert (Abbildung 11). Die unterschiedliche Kinetik der beiden Calciumindikatoren zeigten, dass es gelang, die Calciumkonzentration gleichzeitig in den Mitochondrien und dem Zytosol getrennt voneinander zu untersuchen.

4.2 Erhöhter Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums in Serca2a-Zellen

Bei der transgenen Serca2a-Maus kommt es, wie in 3.1.2 beschrieben, nach siebentägiger Doxycyclingabe zur Hochregulation der Serca2a. Mit Hilfe des folgenden Experimentes sollte untersucht werden, ob es im Calciumgehalt des SR zwischen Serca2a- und Kontroll-Mäusen einen Unterschied gibt. Serca2a-Mäuse erhielten 7 Tage lang Doxycyclin über das Trinkwasser, bevor Kardiomyozyten isoliert wurden. Kardiomyozyten von Kontroll-Mäusen sowie jene von Serca2a-Mäusen wurden den gleichen Konditionen zugeführt.

Koffein öffnet reversibel die Ryanodinrezeptoren am SR und lässt Calcium aus dem SR frei. Der daraufhin folgende Anstieg des Calciumlevels im Zytosol ermöglicht es, den SR-Calciuminhalt indirekt zu bestimmen. Abbildung 12 B zeigt einen Vergleich der Calciumfreisetzung zwischen einer Kontroll- und Serca2a-Maus nach einer schnellen Zufuhr von Koffein. Die Zellen wurden mit dem zytosolischen Calciumindikator Fluo-4, AM beladen. Jedes durchgeführte Experiment wurde am letzten Calciumtransienten vor Koffeingabe normalisiert, d.h. der letzte normale Transient vor der Applikation von Koffein war jeweils 1, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit garantiert war. Nach dem Koffeineinstrom, der 500 ms betrug, wurde

ein vergrößerter Calciumtransient registriert, dessen Änderung im Vergleich zum letzten regulären Calciumtransienten vor Koffeingabe abgelesen werden konnte. Zellen von Mäusen, bei denen Serca2a hochreguliert wurde, haben im zweiseitigen ungepaarten t-Test eine signifikant erhöhten Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums nach Öffnung der Ryanodinrezeptoren des SR im Vergleich zu Zellen von Kontroll-Mäusen (n_{Kontroll-Maus} = 17 aus 5 Mäusen, n_{SERC2a-Maus} = 20 aus 7 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 12 A).



Abbildung 12: SR-Calciumgehalt nach der Applikation von Koffein in Kontroll- und Serca2a-Mäusen

A) Koffein führt zu einer Calciumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und erlaubt daher die Messung der Calciumkonzentration im SR. Jedes einzelne Experiment wurde zur besseren Vergleichbarkeit am letzten Calciumtransienten vor der Gabe von Koffein normalisiert; daher war der letzte normale Calciumtransient vor der Applikation von Koffein jeweils 1. Die Daten sind dargestellt als normalisierte Mittelwerte \pm Standardfehler des SR-Calciumgehalts nach Applikation von Koffein in Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäusen. * p < 0,0001.

B) Zwei repräsentative Experimente zeigen den Verlauf des SR-Calciumgehalts einer Serca2a- und Kontroll-Kardiomyozyte. In Sekunde 2 erfolgte die Applikation von Koffein (500 ms), was zur Calciumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum führte. Grau = Kontroll-Maus, schwarz = Serca2a-Maus. sek = Sekunden

Abbildung 12 B zeigt einen Ausschnitt von zwei repräsentativen Experimenten mit einer Kontroll-Zelle (grau) und einer Serca2a-Zelle (schwarz). Die Kardiomyozyten wurden für eine gewisse Zeit stimuliert, um die Kontraktion zu beurteilen und ein Gleichgewicht herzustellen. Die Zellen wurden dann mit 2 Hz für mindestens 30 Sekunden stimuliert. Bei Sekunde 2 erfolgte der Einstrom von Koffein, woraus eine verlängerte starke Kontraktion bei beiden Zellen resultierte. Kardiomyozyten, in denen Serca2a hochreguliert war, zeigten ein erhöhten Calciumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums, d. h. eine kräftigere Kontraktion bei der Applikation von Koffein, im Vergleich zu Kontroll-Zellen (Abbildung 12 A).

4.3 Beeinflussbarkeit der Calcium-Homöostase durch verschiedene Chemikalien

Nachdem gezeigt wurde, dass mit der verwendeten Technik Calcium gleichzeitig in zwei zellulären Kompartimenten gemessen werden kann und Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen eine erhöhte Calciumkonzentration im SR haben, wurde in einem nächsten Schritt geprüft, ob Herzalternans als Veränderung des Calciumtransienten und der Kontraktionskraft auch in den Mitochondrien nachweisbar ist. Außerdem sollte herausgefunden werden, wie sich zuvor etablierte Alternans im Zytosol und gegebenenfalls im Mitochondrium durch Beeinflussung der mitochondrialen Integrität und Funktion ändert. Um diese Frage zu beantworten, wurden durch die Exposition von unterschiedlichen Chemikalien (siehe Tabelle 4 im Methodenteil) wichtige Funktionen der Mitochondrien beeinträchtigt und so deren Einfluss auf Alternans in Kardiomyozyten untersucht.

In den folgenden Experimenten wurden die Zellen nacheinander mit den Calciumindikatoren x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM beladen. Wie im Methodenteil beschrieben wurden die Beladungskonditionen so gewählt, dass sich x-Rhod-1, AM bevorzugt in den Mitochondrien und Fluo-4, AM im Zytosol einlagern (analog zu Abbildung 11). Dann wurden zunächst Alternans durch schnelle elektrische Stimulation etabliert und die Zellen mit der jeweiligen Chemikalie superfundiert.

Es zeigte sich, dass es bei allen getesteten Antagonisten der mitochondrialen Funktion zu einer signifikanten Vergrößerung der Alternansratio kam. Die Alternansratio gibt die Schwankungsbreite der Herzalternans wider (siehe Abbildung 1 im Einleitungsteil). Eine Ratio von 1 bedeutet der größtmögliche Schweregrad an Alternans. 0 bedeutet hingegen, dass keine Alternans vorhanden sind.

Rotenone, ein Inhibitor von Komplex I der Atmungskette der Mitochondrien, hatte einen im Vergleich zu den anderen getesteten Chemikalien geringen Einfluss auf zytosolische

Alternans, welche im Mittel von $0,24 \pm 0,02$ auf $0,34 \pm 0,02$ anstiegen (n = 16 aus 6 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 13 A). Ebenfalls zeigte sich ein geringer Effekt auf Alternans im Mitochondrium mit einer Veränderung der Alternansratio von $0,29 \pm 0,02$ auf $0,42 \pm 0,03$ (n = 16 aus 6 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 13 A).



Abbildung 13: Änderung der Alternansratio bei der Exposition der Kontroll-Zellen und Serca2a-Zellen mit Rotenone und Antimycin

A+B) Delta beschreibt die Änderung der Alternansratio während der Exposition mit der Chemikalie und errechnet sich aus der Differenz von Alternans nach und vor der Exposition mit der Chemikalie. Links von der roten vertikalen Line sind die Werte für Zellen von Kontroll-Mäusen und rechts davon Werte von Zellen der Serca2a-Mäuse aufgetragen. Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung vor und während Superfusion mit A) Rotenone und B) Antimycin. Fluo-4 = Fluo-4, AM, x-Rhod = x-Rhod-1, AM, *p < 0,05.

Danach wurde mittels Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen getestet, ob die Überexpression der Calciumpumpe Serca2a einen Einfluss auf diese Ergebnisse hat; dies war bei allen getesteten Chemikalien der Fall. Die Supplementation der superfundierenden Lösung mit Rotenone bei Serca2a-Zellen führte zu einem Anstieg von Alternans im Zytosol von $0,29 \pm 0,03$ auf $0,32 \pm 0,03$ (n = 19 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) und in den Mitochondrien von $0,34 \pm 0,03$ auf $0,4 \pm 0,03$ (n = 19 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 13 A). In den folgenden Abbildungen (13, 14, 16, 17) ist jeweils auch das Delta dargestellt. Es beschreibt die Änderung der

Alternansratio während der Exposition mit der angeführten Chemikalie und errechnet sich aus der Differenz von Alternans nach und vor der Exposition dieser.

Antimycin, als Blocker des Komplexes III der Atmungskette der Mitochondrien, hatte einen mittleren Effekt in Bezug auf die Beeinträchtigung von Alternans in beiden Kompartimenten (Abbildung 13 B). So kam es zu einem Anstieg der zytosolischen Alternans von $0,17 \pm 0,01$ auf $0,37 \pm 0,03$ (n = 14 aus 7 Mäusen, p < 0,0001) und der mitochondrialen Alternans von $0,23 \pm 0,03$ auf $0,43 \pm 0,03$ (n = 14 aus 7 Mäusen, p < 0,0001). Wenn Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen mit Antimycin behandelt wurden, kam es nach der Etablierung der Alternans zu einem Anstieg der Ratio im Zytosol von $0,21 \pm 0,03$ auf $0,25 \pm 0,03$ (n = 13 aus 8 Mäusen, p < 0,0001) und in den Mitochondrien von $0,25 \pm 0,03$ auf $0,3 \pm 0,03$ (n = 13 aus 8 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 13 B).





A, B) Links von der roten vertikalen Line sind die Werte für Zellen von Kontroll-Mäusen und rechts davon Werte von Zellen der Serca2a-Mäuse aufgetragen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung vor und während Superfusion mit A) Oligomycin und B) Natriumcyanid.

Fluo-4 = Fluo-4, AM, x-Rhod = x-Rhod-1, AM, *p < 0,05.

Um den Einfluss der F_0F_1 -Synthase auf die Calciumhomöostase und damit auf Alternans zu untersuchen, wurde mit Oligomycin ein Blocker der F_0F_1 -Synthase zu den Zellen hinzugefügt (Abbildung 14 A). Wiederum kam es zu einem Anstieg der zytosolischen (von 0,17 ± 0,01 auf 0,39 ± 0,03, n = 13 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) als auch der mitochondrialen Alternansratio (von 0,26 ± 0,02 auf 0,48 ± 0,03, n = 13 aus 5 Mäusen, p < 0.0001) (Abbildung 14 A).

Der Inhibitor Oligomycin hatte ebenfalls einen Effekt auf zuvor etablierte Alternans in Zellen von Serca2a-Mäusen: die zytosolische Alternansratio stieg von $0,23 \pm 0,03$ auf $0,32 \pm 0,04$ (n = 10 aus 4 Mäusen, p = 0,0017) und die mitochondriale Alternansratio von $0,29 \pm 0,03$ auf $0,39 \pm 0,04$ (n = 10 aus 4 Mäusen, p = 0,0019) (Abbildung 14 A).

Außerdem wurde mit Hilfe von Natriumcyanid die Funktion der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) inhibiert. Daraufhin kam es wiederum zu einer signifikanten Vergrößerung der Alternans im Zytosol (von $0,15 \pm 0,01$ auf $0,39 \pm 0,04$; n = 13 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) und in den Mitochondrien (von $0,19 \pm 0,01$ auf $0,44 \pm 0,04$; n = 13 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) in den



Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel von Alternans vor und nach FCCP-Gabe

Alternans wurde durch schnelle elektrische Stimulation erzeugt. Nach der Etablierung der Alternans wurde der Entkoppler FCCP zur superfundieren Tyrode-Lösung hinzugegeben. Die Abbildungen zeigen eine einzige Kardiomyozyte einer Kontroll-Maus, welche nacheinander mit x-Rhod-1, AM (Ca2+Mitochondrien) und Fluo-4, AM (Ca2+Zytosol) geladen wurde, um die Schwankungen der Calciumintensität und damit Alternans im Zytosol sowie in den Mitochondrien zu bestimmen. A) schwarz: Alternans im Zytosol erzeugt durch elektrische Stimulation und aufgenommen mit Hilfe des Calciumindikators Fluo-4, AM, rot: Alternans in derselben Zelle gemessen in Folge der Superfusion mit dem Entkoppler FCCP. B) schwarz: Alternans in Mitochondrien erzeugt durch elektrische Stimulation und aufgenommen mit Hilfe des Calciumindikators x-Rhod-1, AM, rot: Alternans in derselben Zelle gemessen nach Superfusion mit dem Entkoppler FCCP zur selben Zeit wie 15 A rot.

Zellen von Kontroll-Mäusen (Abbildung 14 B). Diese Veränderung der Alternansratio war auch in Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen nach Hinzugabe von Natriumcyanid zu beobachten (Zytosol: von $0,22 \pm 0,02$ auf $0,35 \pm 0,03$; n = 10 aus 3 Mäusen, p = 0,0002, Mitochondrien: von $0,26 \pm 0,02$ auf $0,41 \pm 0,03$; n = 10 aus 3 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 14 B).

In weiterer Folge wurde der Entkoppler FCCP zu den Kardiomyozyten hinzugegeben. Abbildung 15 A und 15 B zeigen ein repräsentatives Beispiel einer Zelle einer Kontroll-Maus vor (schwarz) und nach (rot) der Superfusion mit FCCP-haltiger Tyrode-Lösung. Es kam zu einer deutlichen Verstärkung von Alternans in beiden Kompartimenten.

Diese Erhöhung der Alternansratio in beiden Kompartimenten ist auch in Abbildung 16 A dargestellt (Zytosol: von $0,15 \pm 0,01$ auf $0,48 \pm 0,04$; n = 12 aus 4 Mäusen, p < 0,0001, Mitochondrien: von $0,22 \pm 0,01$ auf $0,57 \pm 0,03$; n = 12 aus 4 Mäusen, p < 0,0001). Das gleiche Experiment wurde auch mit Zellen von Serca2a-Mäusen durchgeführt. Auch hier führte die Beimischung von FCCP zur superfundieren Tyrode-Lösung zu einem Anheben der



Abbildung 16: Änderung der Alternansratio bei der Exposition der Kontroll-Zellen und Serca2a-Zellen mit FCCP und KMVA

A,B) Delta beschreibt die Änderung der Alternansratio während der Exposition mit der Chemikalie. Links von der roten vertikalen Line sind die Werte für Zellen von Kontroll-Mäusen und rechts davon Werte von Zellen der Serca2a-Mäuse aufgetragen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung vor und während Superfusion mit A) FCCP und B) KMVA.

Fluo-4 = Fluo-4, AM, x-Rhod = x-Rhod-1, AM, *p < 0.05.

Alternansratio (Zytosol: von $0,19 \pm 0,01$ auf $0,42 \pm 0,03$; n = 12 aus 5 Mäusen, p < 0,0001, Mitochondrien: von $0,27 \pm 0,01$ auf $0,52 \pm 0,03$; n = 12 aus 5 Mäusen, p < 0,0001, Abbildung 16 A).

KMVA inhibiert die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase, ein weiterer wichtiger Bestandteil in Mitochondrien, dessen Mangel klinisch als Oxoglutarazidurie unter anderem mit Kardiomyopathie einhergeht [88]. Durch die Anwendung von KMVA kam es zu einer erheblichen Veränderung der mitochondrialen Alternansratio von $0,23 \pm 0,02$ auf $0,61 \pm 0,03$ (n = 16 aus 5 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 16 B). Auch die im Zytosol beobachteten Alternans wurden noch schwerwiegender und stiegen an von $0,19 \pm 0,02$ auf $0,52 \pm 0,03$ (n = 16 aus 5 Mäusen, p < 0,0001). Einen großen Effekt auf Alternans hatte KMVA auch in Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen. Wie in Abbildung 16 B dargestellt, kam es zu einem Anstieg der Ratio im Zytosol von $0,29 \pm 0,03$ auf $0,43 \pm 0,04$ (n = 11 aus 4 Mäusen, p < 0,0001) als auch in den Mitochondrien von $0,34 \pm 0,03$ auf $0,54 \pm 0,03$ (n = 11 aus 4 Mäusen, p < 0,0001).

Es sollte weiterführend untersucht werden, ob die gestörte Aufnahme oder Abgabe von Calcium zur Genese von Herzalternans beitragen kann. Mitochondrien nehmen Calcium über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) auf. Wenn Calcium einmal in der Zelle ist, wird es über den mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauscher und womöglich über die mitochondriale Transitionspore abgegeben. Es wurde daher vermutet, dass es bei einer Inhibierung dieser Wege zur Vergrößerung der Alternansratio kommt. Wie in Abbildung 17 A, C, E dargestellt, führte das Blocken der Calciumaufnahme über MCU durch das Superfundieren der Zellen mit Ruthenium Red zu einer geringen Vergrößerung der Alternans im Zytosol von 0.20 ± 0.02 auf 0.33 ± 0.03 (n = 20 aus 7 Mäusen, p = 0.0001) und ebenfalls zu einer geringen Veränderung der mitochondrialen Alternans von 0.25 ± 0.02 auf 0.43 ± 0.03 (n = 20 aus 7 Mäusen, p < 0,0001). Dann wurde getestet, inwiefern die Beeinflussung des mitochondrialen Calciumhaushaltes in den Serca2a-Zellen einen Einfluss auf den Schweregrad von Alternans hat. Die Blockade der Calciumaufnahme in die Mitochondrien durch Ruthenium Red führte zu einem Anstieg der zytosolischen Alternans von 0.29 ± 0.06 auf 0.41 ± 0.07 (n = 7 aus 3 Mäusen, p = 0,0086) als auch der mitochondrialen Alternans von $0,33 \pm 0,06$ auf $0,46 \pm 0,06$ (n = 7 aus 3 Mäusen, p = 0,0093) (Abbildung 17 B, D, E).



Abbildung 17: Alternans vor und nach Gabe von Ruthenium Red in Kontroll- und Serca2a-Maus

Die Alternans wurden durch schnelle elektrische Stimulation erzeugt. Nach der Etablierung der

Ruthenium Red (RR) zur superfundierenden Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden hintereinander mit x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM $(Ca^{2+}_{Zytosol})$ geladen. (A-D) Alternans aufgenommen mit Hilfe Calciumindikators Fluo-4, AM $(Ca^{2+}_{Zytosol})$ und des C,D) Calciumindikators x- $(Ca^{2+}_{Mitochondrien})$ in einer Kardiomyozyte einer A,C) Kontroll- und einer B,D) Serca2a-Maus. schwarz: Alternans erzeugt durch elektrische Stimulation, rot: Alternans in Superfusion mit Ruthenium Red. (E) Veränderung der Alternansratio von Kardiomyozyten von Kontrollund Serca2a-Mäusen vor und nach Gabe von Ruthenium Red. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler. $n_{\text{Kontroll-Maus}} = 20,$ n_{Serca2a-Maus} = 7. * p < 0,05. Fluo-4 = Fluo-4, AM, x-Rhod = x-Rhod-1, AM

Auch die Beeinträchtigung der Calciumabgabe aus den Mitochondrien mittels CGP hatte einen Effekt: Ist die Calciumabgabe geblockt, kommt es zur Akkumulation von Calcium, was zu einem Öffnen der mitochondrialen Transitionspore und zum kompletten Verlust der Funktionen des Mitochondriums führt. CGP hatte einen starken Effekt auf die Alternansratio im Zytosol (Abbildung 18). Sie änderte sich von $0,14 \pm 0,02$ auf $0,55 \pm 0,02$ (n = 16 aus 5 Mäusen, p < 0,0001). Zudem hatte es ebenfalls einen großen Einfluss auf die Änderung der mitochondrialen Alternansratio von $0,19 \pm 0,02$ auf $0,61 \pm 0,02$ (n = 20 aus 5 Mäusen, p < 0,0001). Die Inhibition der Calciumabgabe der Mitochondrien durch CGP führte ebenfalls zu Erhöhung der zuvor etablierten Alternans im Zytosol von $0,31 \pm 0,04$ auf $0,42 \pm 0,02$ (n = 12 aus 4 Mäusen, p = 0,0001) (Abbildung 18).

Schließlich wurde untersucht, ob Stress durch freie Radikale eine direkte Auswirkung auf die zuvor etablierten Alternans hat. Dazu wurde die oxidierende Chemikalie H₂O₂ verwendet. Es wurden wieder zuvor Alternans durch schnelles Stimulieren (Rapid Pacing) erzeugt. Zeigten sich stabile ABAB-Muster, so wurde die superfundierende Tyrode-Lösung mit H₂O₂ supplementiert und der Einfluss auf die Alternans beobachtet. Es kam wiederum zu einer Verstärkung der zytosolischen von $0,23 \pm 0,02$ auf $0,40 \pm 0,02$ (n = 14 aus 6 Mäusen, p = 0,0003) als auch der mitochondrialen Alternans von $0,28 \pm 0,02$ auf $0,49 \pm 0,03$ (n = 14 aus 6 Mäusen, p < 0.0001) (Abbildung 19). Die vermehrte Exposition der Zellen gegenüber freien Radikalen mittels H₂O₂ führte zu einer Erhöhung der Alternans von $0,27 \pm 0,04$ auf $0,38 \pm 0,03$ (n = 9 aus 2 Mäusen, p = 0,0004) in den Mitochondrien in den Serca2a-Zellen (Abbildung 19, unter 4.4.1 Verbesserung der Alternansratio nach Gabe eines Antagonisten in Kontroll- und Serca2a-Zellen).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass diese Experimente eine wichtige Rolle von Mitochondrien in der Entstehung von Alternans beweisen konnten. Sämtliche spezifischen Änderungen in der Funktionalität von Mitochondrien hatten eine Verstärkung der Alternans zur Folge.

Auffallend ist, dass die Veränderungen in den Mitochondrien größer sind als im Zytosol. Durchgeführte unabhängige, zweiseitige t-Tests zwischen den Variablen Delta Fluo-4, AM und Delta x-Rhod-1, AM, also der Veränderung der Ratio im Zytosol und Mitochondrium, bestätigen diesen Eindruck zum Teil. Sie zeigen, dass dieser Unterschied in den Kontroll-Zellen bei KMVA (p = 0,0307) sowie bei Serca2a-Zellen bei Antimycin (p = 0,0108) und Rotenone (p = 0,0362) signifikant ist.

Zudem wird ersichtlich, dass einige Chemikalien einen größeren Einfluss auf Alternans haben als andere. Vergleicht man die errechneten Delta-Werte zwischen den beiden Typen so ergibt sich eine Reihenfolge, die relativ homogen ist. So hat zum Beispiel Rotenone einen jeweils geringeren Effekt auf Alternans bei Kardiomyozyten in Kontroll- als auch Serca2a-Mäusen. CGP und KMVA dagegen scheinen potenter bei der Induktion von Veränderungen in Bezug auf Alternans zu sein.



Abbildung 18: Vergleich der Alternansratio mit CGP und Cyclosporin A bei Kontroll- und Serca2a-Mäusen

Die Zellen wurden nacheinander mit dem zytosolischen Calciumindikator Fluo-4, AM und dem mitochondrialen Calciumindikator x-Rhod-1, AM beladen. Die Grafik zeigt die Veränderung der Alternansratio bei Zellen von Kontroll- und Serca2a-Mäusen durch CGP sowie während der Gabe von CGP und Cyclosporin A. Eine Zugabe von Cyclosporin A führte zur Abnahme der Alternansratio in beiden Kompartimenten.

Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler, * p < 0,05.

Fluo-4 = Fluo-4, AM, CsA = Cycosporin A, x-Rhod = x-Rhod-1, AM

Beim Vergleich der Veränderungen der Alternansratio durch die Chemikalien zwischen Kontroll- und Serca2a-Zellen ist zu sehen, dass die Veränderungen im Allgemeinen bei Kardiomyozyten vom Serca2a-Typ geringer ausfallen. Ungepaarte zweiseitige t-Tests zwischen den zytosolischen Variablen Delta Fluo-4, AM bei Kontroll-Zellen und Delta Fluo-4, AM bei Serca2a-Zellen zeigen Signifikanzen bei Antimycin (p < 0,0001), Natriumcyanid (p = 0,043), KMVA (p < 0,0001), Oligomycin (p = 0,002), Rotenone (p = 0,0006) und CGP (p < 0,0001). Beim Vergleich der Werte von Delta x-Rhod-1, AM in den Mitochondrien von Kontroll-Zellen mit Delta x-Rhod-1, AM von Serca2a-Zellen durch einen ungepaarten zweiseitigen t-Test ergeben sich signifikante p-Werte für KMVA (p < 0,0001), Oligomycin (p = 0,003) und CGP (p < 0,0001).

4.4 Reversibilität der durch Beeinflussung von Mitochondrien hervorgerufenen Änderung der Alternans

4.4.1 Verbesserung der Alternansratio nach Gabe eines Antagonisten in Kontrollund Serca2a-Zellen

Um zu untersuchen, ob es möglich ist, Alternans rückgängig zu machen und ob die beobachteten Veränderungen der Alternansratio reversibel sind, wurden die Experimente mit CGP und H_2O_2 , wie in 3.4.3 beschrieben, wiederholt. Nach der Zugabe von CGP oder H_2O_2 wurde zunächst abgewartet bis die Veränderungen ein Gleichgewicht erreicht hatten. Dann wurde zu dieser Lösung jeweils der passende Antagonist, also eine Substanz mit gegensätzlicher Wirkung von CGP beziehungsweise H_2O_2 , hinzugegeben. CGP wurde aufgrund dessen unter 4.3 gezeigten potenten Wirkung auf die Alternansratio ausgewählt. Mit der Überprüfung der Reversibilität des durch H_2O_2 -ausgelösten Effekts auf die Alternansratio sollte ein möglicher therapeutischer Ansatz auf Stress-induzierte Schäden von Kardiomyozyten untersucht werden.

Nach der Etablierung von Alternans und der Zugabe von CGP kam es zu der in 4.3 beschriebenen Vergrößerung der Alternansratio. Dann wurde der Lösung Cyclosporin A hinzugegeben. CGP verhindert die Calciumabgabe der Mitochondrien. Als Folge dessen kommt es zur Akkumulation von Calcium im Mitochondrium. Hohe Calciumkonzentrationen führen zur Öffnung der mitochondrialen Transitionspore und somit zum Verlust des Membranpotentials. Cyclosporin A verhindert das Öffnen der Transitionspore. Durch das Hinzugeben von Cyclosporin A kam es zu einer Verringerung der zuvor beobachteten Alternansratio bei CGP im Zytosol von $0,55 \pm 0,03$ auf $0,24 \pm 0,02$ (n = 10 aus 3 Mäusen, p < 0,0001) und in den Mitochondrien von $0,61 \pm 0,03$ auf $0,19 \pm 0,02$ (n = 10 aus 3 Mäusen, p < 0,0001) bei Zellen von Kontroll-Mäusen (Abbildung 18).

Auch bei Kardiomyozyten aus Serca2a-Mäusen wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen der Alternansratio bei Zugabe von CGP oder H_2O_2 reversibel sind. Dazu wurden wieder zunächst Alternans etabliert und dann CGP zur superfundieren Lösung gegeben. Die beobachteten Resultate sind in 4.3 beschrieben. Durch Zugabe von Cyclosporin A zu dieser



Abbildung 19: Vergleich der Alternansratio vor H₂O₂, während H₂O₂ und während der Gabe von N-Acethylcystein bei Kontroll- und Serca2a-Mäusen

Die Grafik zeigt die Mittelwerte der Alternansratio gemessen mit Fluo-4, AM ($Ca^{2+}_{Zytosol}$) und x-Rhod-1, AM ($Ca^{2+}_{Mitochondrien}$) in Zellen von Kontroll- und Serca2a-Maus vor Gabe von H₂O₂, nach Gabe von H₂O₂ und nach Supplementation von NAC. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler, * = p < 0, 05. Fluo-4 = Fluo-4, AM, NAC = N-Acethylcystein, x-Rhod = x-Rhod-1, AM

Lösung, kam es hier zu einem Abfall der Alternansratio im Zytosol von $0,37 \pm 0,03$ auf $0,18 \pm 0,01$ (n = 12 aus 4 Mäusen, p = 0,0028) sowie in den Mitochondrien von $0,42 \pm 0,02$ auf $0,16 \pm 0,02$ (n =12 aus 4 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 18).

Weiterführend wurde untersucht, ob die Zugabe eines Antioxidans einer Verstärkung der Alternans, hervorgerufen durch H₂O₂, entgegenwirkt und diese wieder zu normalen

Calciumtransienten zurückführt. Dazu wurde N-Acethylcystein (NAC) genutzt. NAC reduziert freie Radikale und sollte H_2O_2 entgegenwirken. Die Zellen wurden mit NAC und H_2O_2 , nach der alleinigen Gabe von H_2O_2 , exponiert. Es kam wiederum zu einem Abfall der Alternansratio in beiden Kompartimenten, im Zytosol von $0,14 \pm 0,04$ (n = 14 aus 6 Mäusen, p < 0,0001) und in den Mitochondrien von $0,22 \pm 0,04$ (n = 14 aus 6 Mäusen, p < 0,0001) (Abbildung 20).

Dieser Versuch wurde gleichfalls mit Zellen der Serca2a-Maus durchgeführt. Bei der Supplementation der Tyrode-H₂O₂-Lösung mit NAC kam es zum Abfall der zytosolischen Alternansratio von $0,38 \pm 0,03$ auf $0,24 \pm 0,04$ (n = 9 aus 2 Mäusen, p = 0,0041) als auch der mitochondrialen Alternansratio von $0,43 \pm 0,03$ auf $0,21 \pm 0,04$ (n = 9 aus 2 Mäusen, p = 0,0011). Mit diesen Versuchen konnte dargestellt werden, dass die spezifische Wirkung von Chemikalien reversibel ist und Mitochondrien funktionell beeinflussbar sind.





Die Zellen wurden nacheinander mit x-Rhod-1, AM ($Ca^{2+}_{Mitochondrien}$) und Fluo-4, AM ($Ca^{2+}_{Zytosol}$) beladen. Dargestellt ist die Calciumintensität derselben Zelle von einer Kontroll-Maus während der Superfusion mit H₂O₂ und während der Superfusion mit H₂O₂ und N-Acethylcystein (NAC).

A) Darstellung der Calciumintensität im Zytosol mit Hilfe des Calciumindikators Fluo-4, AM.

B) Darstellung der Calciumintensität in Mitochondrien mit Hilfe des Calciumindikators x-Rhod-1, AM.

NAC = N-Acethylcystein, au = arbitrary units, sek = Sekunden

4.4.2 Verbesserungen der Alternans sind in den Mitochondrien am Größten

Die Zugabe der Antagonisten führte in beiden Fällen (Cyclosporin A und N-Acethylcystein) zu einem signifikanten Abfall und einer Verbesserung der Alternansratio in beiden untersuchten Kompartimenten (Zytosol und Mitochondrien), was für eine Verringerung der Herzalternans spricht. Dabei sind die beobachteten Reduktionen der Alternansratio jeweils größer in den Mitochondrien als im Zytosol. Durchgeführte unabhängige zweiseitige t-Tests zwischen den Variablen Delta Fluo-4, AM und Delta x-Rhod-1, AM zeigen Signifikanzen in Kontroll-Mäusen nach Zugabe der Antagonisten bei H₂O₂ (p = 0,0001) und CGP (p = 0,0195). Bei den Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen kommt es ebenfalls zu einer größeren Beeinflussung der Alternans in den Mitochondrien als im Zytosol durch Zugabe von Cyclosporin A bei zuvor etablierten Alternans nach CGP-Gabe (p = 0,0131).

Darüber hinaus ist der Effekt der Antagonisten jeweils größer bei den Alternans in Kontroll-Mäusen. Ungepaarte zweiseitige t-Tests zwischen den Variablen Delta Fluo-4, AM bei Zellen von Kontroll- und Delta Fluo-4, AM bei Serca2a-Mäusen zeigen Signifikanzen bei CGP nach Cyclosporin A-Gabe (p = 0,0109). Ungepaarte zweiseitige Tests wurden auch zwischen den Variablen Delta x-Rhod-1, AM vom Kontroll-Typ und Delta x-Rhod-1, AM von Zellen von Serca2a-Mäusen durchgeführt und sind ebenfalls für CGP nach Cyclosporin-Gabe (p = 0,0245) und für H₂O₂ nach NAC-Gabe (p = 0,0071) signifikant.

4.5 Steilere Erholungskurve in Serca2a-Zellen

Bei höheren Herzfrequenzen kann die nicht schnell genug erfolgende elektrische Erholung ein Grund für die Entstehung von Alternans sein. Der Calciumfluss im SR könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen. Um weiterführend zu ergründen, ob dies der Fall ist und Serca2a-Mäuse im Gegensatz zu Kontroll-Mäuse eine erhöhte Fähigkeit besitzen, einen normalen Rhythmus auch bei Stress zu erhalten, wurden die Zellen, wie in 3.4.5 dargestellt, gemäß eines S1-S2-Protokolls stimuliert, eine Erholungskurve zu jedem Experiment entworfen und die Zeitkonstante tau (τ) anhand einer angepassten Exponentialkurve errechnet. Kardiomyozyten von Kontroll- und Serca2a-Mäuse wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Fluo-5N, AM, x-Rhod-1, AM und Rhod-2, AM beladen. Zunächst wurden die Zellen bei 2 Hz für 30 Schläge (S1) stimuliert, dann erfolgte ein einzelner Schlag (S2). Nur S2 wurde in den darauffolgenden Zyklen, die bei 2 Hz begannen und bis auf 8,5 Hz im letzten Zyklus gesteigert wurden, verändert.

In Abbildung 21 sind zwei Experimente, links mit einer Kontroll- und rechts mit einer Serca2a-Zelle, exemplarisch gegenübergestellt. Beide wurden zur selben Zeit im S1-S2-Protokoll aufgenommen. Es ist ersichtlich, dass bei der Kontroll-Zelle der Unterschied der elektrischen Stimulationen S1 zur schneller erfolgenden Stimulation S2 deutlich größer ist, als bei der Serca2a-Zelle. Dieser Unterschied ist sowohl im Zytosol (Rhod-2, AM) als auch im SR (Fluo-5N, AM) zu erkennen.



Abbildung 21: Repräsentativer Ausschnitt aus einem S1-S2-Protokoll bei einer Kontroll-Maus und einer Serca2a-Maus

Die Zellen von einer Kontroll-Maus und Serca2a-Maus wurden nacheinander mit Rhod-2, AM $(Ca^{2+}_{Zytosol})$ und Fluo-5N (Ca^{2+}_{SR}) geladen.

A) S1-S2 Protokoll einer Kontroll-Zelle. Zur besseren Darstellung sind S1 und S2 in rot markiert.B) Gleicher Zeitpunkt im S1-S2-Protokoll bei einer Serca2a-Zelle.

Für die Darstellung in einer Erholungskurve wurden jeweils die Änderungen der Calciumintensitäten von S1 zu S2 errechnet. Jede Calciumintensitätsänderung von S1 zu S2 war ein Punkt auf der Erholungskurve. Für diese Kurve wurden die bei S2 verwendeten Herzfrequenzen in Millisekunden umgewandelt und auf der x-Achse aufgetragen. Um eine "Erholung" darzustellen, wurden die Daten also andersherum aufgetragen. So befindet sich der Messpunkt 2 Hz mit der gemessenen Intensitätsänderung und die dazugehörige Umrechnung in Millisekunden ganz rechts auf der x-Achse und die Calciumintensitätsänderung bei 8,5 Hz links.

Die Ergebnisse der Zeitkonstanten τ , die aus den Erholungskurven errechnet wurden, sind in Tabelle 5 dargestellt. Bei zwei von drei Calciumindikatoren war τ bei den Serca2a-Zellen signifikant niedriger als bei den Zellen der Kontroll-Maus ($p_{Rhod-2, AM} = 0,0488$, $p_{Fluo-5N, AM} = 0,0105$, $p_{x-Rhod-1, AM} = 0,2778$). Abbildung 22 zeigt eine Zusammenfassung der Erholungskurven im Vergleich zwischen Zellen von Kontroll- und Serca2a-Mäusen sowie den verschiedenen Calciumindikatoren. Die dargestellten Erholungskurven verdeutlichen, dass der Anstieg der Kurve steiler und schneller bei den Zellen von Serca2a- als bei den Kontroll-Mäusen ist. Das Plateau wird demnach schneller erreicht. Diese Ergebnisse sprechen für eine raschere Erholung nach einer Kontraktion in Serca2a-Mäusen.



Abbildung 22: Darstellung der Erholungskurven für jeden Calciumindikator bei Kontroll- und Serca2a-Mäusen

Die Zeitkonstante τ wurde in ms aus Erholungskurven errechnet, welche mit Hilfe eines S1-S2-Protokolls generiert wurden. Zellen von Kontroll- und Serca2a-Mäusen wurden mit Rhod-2, AM, x-Rhod-1, AM und Fluo-5N, AM beladen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler der Erholungskurven dargestellt.

| Tabelle 5: Zeitkonstante | τ in | Millisekunden |
|--------------------------|------|---------------|
|--------------------------|------|---------------|

| Calciumindikator | Kontroll-Maus | Serca2a-Maus |
|------------------|----------------|-----------------|
| Fluo-5N, AM | 178 ± 22.3 | 71 ± 14.4 |
| x-Rhod-1, AM | 152 ± 26.8 | 70.4 ± 22.4 |
| Rhod-2, AM | 202 ± 87.2 | 45.7 ± 6.8 |

Die Zeitkonstanten wurden aus den Erholungskurven errechnet. Daten wurden durch ein S1-S2-Protokoll in Zellen von Kontrollmäusen ($n_{Rhod-2, AM} = 12$ aus aus 2 Mäusen, $n_{x-Rhod-1, AM} = 6$ aus 5 Mäusen, $n_{Fluo-5N, AM} = 8$ aus 7 Mäusen) und Serca2a-Mäusen ($n_{Rhod-2, AM} = 14$ aus 3 Mäusen, $n_{x-Rhod-1, AM} = 6$ aus 3 Mäusen, $n_{Fluo-5N, AM} = 7$ aus 6 Mäusen) gewonnen. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einem neuen Messverfahren gezeigt werden, dass 1) Mitochondrien eine bedeutende Rolle in der Calciumhomöostase von Kardiomyozyten haben und daher zur Erstehung von Herzalternans beitragen und 2) die Überexpression der Serca2a zu einer geringeren Anfälligkeit für elektrische Instabilität bei metabolisch gestressten Kardiomyozyten führt.

5.1 Lokalisation der Calciumindikatoren

Mit Hilfe des Teilexperiments A (siehe 3.4.1 und 4.2) sollte geklärt werden, ob sich die Calciumindikatoren Fluo-4, AM und x-Rhod-1, AM bevorzugt im Zytosol beziehungsweise in den Mitochondrien einlagern. Dieses Experiment diente als Basis für die folgenden Untersuchungen mit diesen Calciumindikatoren. Die Kardiomyozyten wurden hintereinander wie in 3.3.4 beschrieben mit x-Rhod-1, AM und Fluo-4, AM inkubiert. Die Zellen wurden dann in die Kammer des Mikroskops pipettiert und mit Tyrode-Lösung (0,2 mM Calcium) superfundiert. Die Calciumkonzentration der superfundieren Lösungen wurde dann von 0,2 mM auf 1,5 mM angehoben, woraufhin es zu einem Anstieg der Calciumintensitäten bei beiden gemessenen Calciumindikatoren kam. Bei der darauffolgenden Hemmung der Calciumaufnahme beziehungsweise Calciumabgabe im Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) durch die Zugabe von Thapsigargin und Ruthenium Red zeigte sich kein sichtbarer Effekt auf die Calciumintensitäten gemessen mit Fluo-4, AM und x-Rhod-1, AM. Bei der anschließenden Supplementation der Entkoppler (FCCP und Oligomycin) kam es zu einem Abfall von x-Rhod-1, AM bei gleichzeitigem Anstieg von Fluo-4, AM.

Der Anstieg der Intensität der beiden Calciumindikatoren in Folge einer Erhöhung der Calciumkonzentration auf 1,5 mM kann als erhöhte Calciumaufnahme in das Zytosol und in Mitochondrien gewertet werden. Die im nächsten Schritt erfolgte Hemmung der Calciumaufnahme und -abgabe im SR durch Thapsigargin und Ruthenium Red führte zu annähernd unveränderten Intensitäten der beiden Calciumindikatoren, was bei der Annahme der selektiven Lokalisation der Calciumindikatoren in den Mitochondrien (x-Rhod-1, AM) und im Zytosol (Fluo-4, AM) erwartet wurde. Es konnte in weiterer Folge gezeigt werden, dass es im Zuge der Vernichtung des Elektronengradienten der Mitochondrien mittels der als Protonophore wirkenden Entkopplers FCCP und Oligomycin zu einem plötzlichen Absinken der Calciumintensität in Mitochondrien gemessen mit x-Rhod-1, AM kommt. In Gegensatz dazu

kam es bei der Applikation der Entkoppler zu einem Anstieg der Calciumintensität im Zytosol gemessen mit Fluo-4, AM. Diese Erhöhung der Fluoreszenz kann ebenfalls als Ausdruck der Zerstörung des elektrochemischen Gradienten für Calcium verstanden werden. Das führt zur Calciumanreicherung im Zytosol und zu einem Anstieg der Fluoreszenz in diesem Kompartiment.

Es ist bekannt, dass Thapsigargin die Aufnahme von Calcium in das SR durch Inhibition der Serca hemmt [89]. Ruthenium Red ist ein potenter Blocker der Ryanodinrezeptoren [90]. Die Zellen wurden einer der Literatur entsprechenden suffizienten Konzentration von Thapsigargin und Ruthenium Red ausgesetzt, um eine Anreicherung der Indikatoren im SR auszuschließen und um eine eventuelle Fluoreszenz von Calcium im SR konstant zu halten.

Die dargestellten Ergebnisse sind gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten vereinbar. Hajnóczky et al. führten ein ähnliches Experiment zum Nachweis der mitochondrialen und zytosolischen Lokalisation eines Calciumindikators in Hepatozyten durch [91]. Beide Indikatoren wurden, anders als in dieser Studie, einzeln gemessen. Auch in der Forschungsarbeit von Hajnóczky et al. kam es bei Applikation der Entkoppler zum schnellen Abfall der Fluoreszenz des mitochondrialen Indikators und zu einem transienten Anstieg des zytosolischen Indikators. Genauere Daten zum Ausmaß des Abfalls des mitochondrialen Indikators wurden nicht gemacht. In der hier vorliegenden Arbeit kam es nach Applikation der Entkoppler im Mittel zu einem Abfall von 72,67 % gemessen zum Grundwert (Abbildung 11). Der Grundwert wurde als die höchste gemessene Calciumintensität vor Applikation von Oligomycin und FCCP angenommen. 0 % dagegen stellt die Grundlinie da, also lediglich die Hintergrundfluoreszenz ohne Zelle. Die Akkumulation von x-Rhod-1, AM in den Mitochondrien könnte somit höher als 72,67 % liegen, weil die Annahme von 0 % Calcium im Mitochondrium nach Entkopplergabe lediglich theoretisch ist. Vorausgegangene Studien beschreiben die mitochondriale Akkumulation von x-Rhod-1, AM bei ähnlichen gewählten Beladungskonditionen von Zeit, Pluronic- und Indikatorkonzentration in adulten Kardiomyozyten und mesenchymalen Stammzellen [92] sowie bei neonatalen Kardiomyozyten von Ratten [93, 94]. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Studien wurden verschiedene Beladungskonditionen getestet. Mit dem in der Methodensektion beschriebenen Protokoll wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Ähnlich verhielt es sich mit dem zytosolischen Calciumindikator Fluo-4, AM. Die Akkumulation dieses Indikators im Zytosol ist sehr gut beschrieben [34] und dessen Inkubation weit etabliert bei Kardiomyozyten von Mäusen [95], Hasen [96] und Ratten [97]. Die Ergebnisse des Teilexperimentes A (vergleiche Methoden 3.4.1) bestätigen die Annahme der Lokalisation

von x-Rhod-1, AM überwiegend in den Mitochondrien und Fluo-4, AM im Zytosol. Somit ist die Basis für weitere Experimente gegeben.

5.2 Calciuminhalt des Sarkoplasmatischen Retikulums in Kontroll- und Serca2a-Zellen

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß sich der Calciuminhalt im SR in Zellen von Kontroll-Mäusen und von Serca2a-Mäusen unterscheidet, wurden die Zellen einem kurzen Koffeineinstrom, welcher die Ryanodinrezeptoren am SR öffnet, ausgesetzt (siehe 3.4.2 und 4.2). Es wurde also derselbe Versuch an Zellen von Kontroll-Mäusen als auch an Serca2a-Mäusen nach siebentägiger Doxycyclingabe durchgeführt und dann das Ausmaß der erzeugten Calciumtransienten verglichen. Die Zellen wurden wie in 3.3.4 beschrieben mit dem Farbstoff Fluo-4, AM beladen und in die Kammer des Mikroskops pipettiert. Die Kardiomyozyten wurden während der Dauer des Experiments kontinuierlich mit Tyrode-Lösung (1,8 mM Calcium) superfundiert und für eine definierte Zeit elektrisch stimuliert. Dann öffnete die Klappe des Koffeinperfusors und ließ Koffein in die Kammer strömen. Es wurde erwartet, dass sich mit einer Überexpression der Serca2a auch mehr Calcium im SR befindet, also bei Serca2a-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen bei Koffeinexposition ein höherer Calciumtransient resultiert.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach einem vollständigen Öffnen der Ryanodinrezeptoren mittels kurzen Koffeineinstroms in das superfundierende Zellbad im Allgemeinen zu einem plötzlichen Anstieg des zytosolischen Calciumtransienten kommt. Gleichzeitig wurde im Mikroskop eine verstärkte und verlängerte Kontraktion der Zelle in beiden Zelltypen beobachtet, die relativ synchron mit dem Calciumtransienten nach Applikation von Koffein stattfand. Kurz nach dem durch Koffein hervorgerufenen Anstieg von Calcium kam es auch wieder zur Abnahme des Calciumtransienten. Danach wurde die elektrische Stimulation der Zellen, wie zuvor, wieder fortgeführt und die Calciumtransienten stiegen erneut auf Werte wie vor der Applikation von Koffein. Das reguläre Superfundieren mit Tyrode-Lösung wurde nicht unterbrochen, sodass es zu einer raschen Elimination von Koffein aus dem Zellbad kam. Die ersten Calciumtransienten nach Applikation waren zunächst etwas kleiner, stiegen aber dann schnell auf den Ausgangswert. Dieser Mechanismus ist das Korrelat für zunächst wenig vorhandenes Calcium nach Leerung des SR, das für die Kontraktion zur Verfügung steht. Schlag um Schlag kann das SR wieder vermehrt mit Calcium gefüllt werden. Auch andere Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung der Ryanodinrezeptoren durch Koffein vollständig reversibel ist [98], was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Weitere Studien haben gezeigt, dass die Menge von 10 mM Koffein bereits zu einer Öffnung aller Ryanodinrezeptoren und zur

synchronen Freisetzung des Calciums im SR führt [87, 99]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit diese Konzentration von Koffein genutzt. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit auch, dass das Platzieren der Spitze der Koffeinlösung im Wasserbad ebenfalls einen Einfluss auf den Calciumtransienten nach Applikation hat. Nach bestmöglichem Einstellen nah an den Zellen, um eine so schnell wie möglich erfolgende Applikation zu erreichen, wurde der Platzierungsort der Spitze für die Dauer der Experimente nicht mehr verändert. So konnte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Bei der Analyse wurde angenommen, dass der höchste Punkt des Calciumtransienten nach Koffein-Applikation dem tatsächlichen Ergebnis entspricht. Das mag eine Vereinfachung sein, die zutrifft, wenn Koffein sehr schnell appliziert wird und der höchste Punkt des Calciumtransienten nicht durch den Natrium-Calcium-Austauscher gedrosselt wird.

Tatsächlich berichteten Suarez et al., die die Serca2a-Maus erstmals beschrieben, von einer Erhöhung des SR-Calciuminhaltes von 45 % [77]. In der vorliegenden Arbeit hatten Serca2a-Zellen einen um 35,7 % erhöhten Calciuminhalt des SR im Vergleich zu Kontroll-Zellen (Abbildung 12). Das mag an den unterschiedlichen Analyseverfahren liegen. Die Gruppe um Suarez prüfte den Erfolg der Induktion der Überexpression der Serca2a ebenfalls durch die Applikation von 10 mM Koffein bei Serca2a-Zellen und Kontroll-Zellen, allerdings mit einer superfundieren Lösung ohne Natrium und ohne Calcium. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse aus beiden Studien nicht direkt vergleichbar. Eine Studie bewertet die Unterschätzung des Calciuminhalts des SR durch diese Analysemethode um 20 % [100]. Wenn diese Berechnungen auf die hier vorliegenden Ergebnisse korrigiert werden, so kann man in dieser Arbeit von einer durch die Induktion der Serca2a ausgelösten Erhöhung von Calcium im SR in Serca2a-Zellen um 42,7 % im Vergleich zu Kontroll-Zellen ausgehen. Dieses Ergebnis kommt der durch Suarez et al. beschriebenen Erhöhung des SR-Calciuminhaltes von 45 % sehr nahe.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass es bei der Serca2a-Maus nach siebentägiger Gabe von 200 mg/l Doxycyclin zu einer Überexpression der Serca2a kommt und beweisen, dass das Calcium im SR von Serca2a-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten signifikant erhöht ist. Damit ist die Voraussetzung für weitere vergleichende Experimente zwischen Kontroll- und Serca2a-Zellen gegeben.

5.3 Wirkungen der Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien auf Alternans

Durch die Exposition von unterschiedlichen Chemikalien, die die mitochondriale Integrität und Funktion beeinträchtigen, sollte im Folgenden der Einfluss von Mitochondrien auf

Herzalternans untersucht werden (siehe 3.4.3 sowie 4.3). Zunächst sollte geprüft werden, ob Herzalternans auch in den Mitochondrien nachweisbar sind und wie sich zuvor etablierte Alternans im Zytosol und gegebenenfalls im Mitochondrium bei Exposition mit den Chemikalien verändern. Es wurden dieselben Versuche jeweils an Kontroll- und Serca2a-Zellen durchgeführt, um mögliche Mitochondrien-SR-Interaktionen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Calcium-Regulation oder der ATP-Produktion Herzalternans verstärkt (Abbildung 13 – 20). Die getesteten Chemikalien, die auf die Inhibition der Calcium-abhängigen Dehydrogenasen und Komplexe der Atmungskette, Calciumaufnahme- und -abgabe abzielen, führten allesamt zur Erhöhung des Schweregrades von Alternans, welche in vielen Fällen signifikant war. Zudem konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Alternans im Zytosol nebeneinander mit Alternans in den Mitochondrien existieren und diese sich unterscheiden (siehe Abbildung 15). Darüber hinaus konnte auch der Einfluss der getesteten Chemikalien auf mitochondriale Alternans erforscht werden. Dabei war auffallend, dass Alternans in den Mitochondrien eine größere Ratio vor und nach Gabe der Antagonisten aufwiesen als die jeweils zeitlich korrespondierenden Alternans im Zytosol.

Die Blockierung der Funktion von Mitochondrien durch Chemikalien in Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen führte ebenfalls zur Verstärkung von Alternans. Allerdings zeigten die durchgeführten Experimente mit Kardiomyozyten vom Serca2a-Typ einen deutlich geringeren Einfluss der getesteten Mechanismen auf Alternans in beiden Kompartimenten, da es in Kardiomyozyten vom Serca2a-Typ im Vergleich zu den Kontroll-Zellen zu einer geringeren Änderung der Alternansratio nach Exposition der Chemikalien kam. Diese Beobachtung entspricht einer reduzierten Anfälligkeit für Störungen der Repolarisation, wenn vermehrt Calcium-ATPasen vom Serca2a-Typ vorhanden sind. Auch bei den Serca2a-Zellen war die Alternansratio im Mitochondrium niedriger als die zytosolische Alternansratio. Allerdings waren die Einflüsse der Inhibition der Calciumaufnahme und -abgabe geringer bei den Zellen der Mäuse mit Serca2a-Überexpression im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Das führt zur Annahme, dass die vermehrte Expression der Serca2a mitochondriale metabolische Störungen teilweise kompensieren kann und bestärkt die Überlegung, dass Faktoren, die die Entfernung von Calcium in der Diastole fördern, protektiv gegenüber Alternans sind [101].

Diese Studie bestätigt andere Studien in der Annahme, dass die Inhibition der Glykolyse dazu führt, dass das Auftreten von Alternans begünstigt wird [23, 102, 103]. Weiterführend ist gut untersucht, dass metabolische Veränderungen mit geringeren Konzentrationen von ATP, wie sie während Ischämie auftreten, Konditionen schaffen, die zu Alternans führen [104, 105]. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten. Eine andere Studie zeigte die

Induktion von Alternans durch die Beeinflussung der Glykolyse mittels Inhibition der Phosphofruktokinase-Reaktion durch Pyruvat oder β -Hydroxybutyrat [106]. Der Effekt war reversibel, wenn die Lösung wieder zu normaler Tyrode-Lösung gewechselt wurde. Die genannten Studien konzentrierten sich aber allein auf die Auswirkungen auf Alternans im Zytosol. Wenig Beachtung fanden dagegen die Veränderungen in den Mitochondrien.

Es gibt große Uneinigkeit darüber, ob Mitochondrien in der Lage sind, Calcium pro Schlag aufzunehmen oder ob es eher zu einer langsamen Integration des Ions kommt, die ihren wissenschaftlichen Auseinandersetzung Höhepunkt in einer von zwei führenden Forschungsgruppen fand [63]. Basierend auf früheren Studien gibt es Evidenz, dass Calciumtransienten ähnlich wie im Zytosol auch in den Mitochondrien möglich sind. Diese Theorie wird auch von den gewonnenen Ergebnissen dieser Arbeit gestützt. Studien wiesen schnelle Calciumtransienten sowohl in isolierten Mitochondrien [107-109] als auch in intakten Kardiomyozyten [60, 110] nach. Einige Forschungsgruppen konnten zeigen, dass schnelle mitochondriale Calciumtransienten bei erhöhter adrenerger Stimulation oder bei hohen Frequenzen auftreten [111, 112]. Es gibt also viele Veröffentlichungen, die entweder eine schnelle Aufnahme von Calcium oder eine langsame Integration postulieren, jedoch gab es bis dato keinen Beweis für die Existenz von Alternans in den Mitochondrien. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit kann erste Evidenz geliefert werden, dass Alternans im Zytosol nebeneinander mit Alternans in den Mitochondrien existieren. Damit kann die in der vorliegenden Arbeit initial gestellte Frage, ob Alternans auch in den Mitochondrien nachweisbar sind, positiv beantwortet werden.

Faktoren, die zu einer verminderten Calciumabnahme im Zytosol führen, fördern das Auftreten von Alternans. Die Aufnahme von Calcium in das Mitochondrium ist an die Verfügbarkeit von ATP und den elektrochemischen Gradienten gebunden. Das führt zur Annahme, dass reduzierte ATP-Produktion zu einer gestörten Calciumabnahme des Zytosols führt. Florea et al. [66] äußerten die Frage, ob entweder eine reduzierte Aufnahme von Calcium in das SR, eine niedrigere Calciumabgabe über die Plasmamembran oder eine verringerte Calciumaufnahme durch Mitochondrien dafür verantwortlich gemacht werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass hauptsächlich die reduzierte Aufnahme von Calcium in das SR zur verminderten Calciumabnahme im Zytosol beiträgt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wird deutlich, dass experimentelle Interventionen, die die mitochondriale Calciumaufnahme beziehungsweise -abgabe behindern und deswegen die Funktion der Mitochondrien als Calciumpuffer empfindlich stören, die Genese von Alternans begünstigen. Die Arbeit unterstützt die Idee, dass eine enge Beziehung zwischen

der Calciumregulation im Zytosol und Mitochondrium existiert. Bis dato gab es keinen Beweis, ob der Einfluss auf Alternans über die Beeinflussung der zytosolischen Calciumtransienten oder die Beeinflussung Calcium-abhängigen über von Schritten der mitochondrialen Energiemetabolismen erfolgt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass es zunächst zu einem Entstehen von Alternans in den Mitochondrien kommt, da die in den Mitochondrien gemessene Alternansratio jeweils höher als die im Zytosol gemessene Alternansratio war. Desweiteren legen die generierten Daten ein Umdenken der Rolle der Mitochondrien nahe hin zu komplexen Organellen, welche intrazelluläres Calcium kontrollieren und sich somit als Ziel für therapeutische Interventionen eignen. Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass eine ausreichende Versorgung durch die Mitochondrien mit ATP und eine ungestörte mitochondriale Funktion als Calciumpuffer wichtig für die regelrechte Repolarisation der Herzzellen sind. Darüber hinaus geben die Experimente einen Hinweis darauf, dass die Überexpression der Serca2a dem Ausfall der Mitochondrienfunktion teilweise entgegenwirken kann.

5.4 Möglichkeiten der Reversibilität von Alternans

Um einen prinzipiellen therapeutischen Ansatz zu untersuchen, wurde in weiterer Folge untersucht, ob die ausgelösten Alternans wieder reversibel sind. In 4.3 konnte gezeigt werden, dass Alternans durch die Zugabe von Chemikalien, die den Energie- und Calciummetabolismus beeinflussen, moduliert werden können. In den folgenden Experimenten (siehe 4.4) sollte dann untersucht werden, ob es gelingt, Alternans durch die Zugabe von Substanzen, die einen gegenteiligen Effekt haben, wieder in einen normalen Calciumtransienten zu überführen. Dazu wurden zunächst Alternans etabliert und dann die Kardiomyozyten, wie in 3.4.4 beschrieben CGP oder H₂O₂ ausgesetzt. Darauf folgte die Exposition mit einem Antagonisten von CGP oder H₂O₂. Es wurde erwartet, dass die erzeugten Veränderungen in der Alternansratio durch die Antagonisten rückgängig gemacht werden können.

Es konnte dann gezeigt werden, dass zuvor etablierte Alternans durch die Zugabe eines Antagonisten teilweise in Alternans kleinerer Ratio überführt werden können. Kleinere Alternansratio ist ein Korrelat für einen geringeren Schweregrad von Alternans und bedeutet, dass es somit zu einer geringfügigeren Störung der Repolarisation kam und die Kontraktion der Kardiomyozyten positiv beeinflusst werden konnte.

Während der Blockade des mitochondrialen Natrium-Calcium-Austauschers mit CGP wird weniger Calcium wieder zurück in das Zytosol gepumpt. Somit kommt es zur

Akkumulation von Calcium in den Mitochondrien. Es ist sehr gut erforscht, dass es bei erhöhtem Calciuminhalt des Mitochondriums zum Öffnen der Transitionspore kommt [112], in weiterer Konsequenz zum Verlust des Elektronengradienten [113] und zum Zelltod [114]. Aus diesen Gründen wurde geprüft, ob die Verhinderung der Öffnung der mitochondrialen Transitionspore durch die Zugabe des Inhibitors dieser Pore dieser Entwicklung entgegenwirken kann. Cyclosporin A gilt als potenter Inhibitor der mitochondrialen Transitionspore (mPTP) [115]. Die Ergebnisse einer Studie deuten daraufhin, dass Cyclosporin A das Membranpotential in isolierten Herzmitochondrien, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, stabilisieren kann [113]. Passend zu dieser Erkenntnis zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass die Zugabe von Cyclosporin A zu einer teilweisen Reversibilität von Herzalternans in isolierten Kardiomyozyten führt. Der Mechanismus dieser Beobachtung mag ebenfalls in der membranstabilisierenden Wirkung des Cyclosporins A durch die Öffnung der mPTP liegen. Dies ist in Übereinstimmungen mit Ergebnissen aus einer Studie, die den Einfluss von N-Acethylcystein (NAC) und Cyclosporin A auf zytosolische Alternans untersuchte [66]. Auffallend war, dass der Effekt von Cyclosporin A auf Alternans bei Zellen von Kontroll-Mäusen jeweils größer war, als bei den Serca2a-Mäusen. Das mag daran liegen, dass die vorangehende Applikation des Antagonisten CGP bereits größere Auswirkungen auf Alternans der Maus vom Kontroll-Typ hatte als auf Serca2a-Zellen. Mit Blick auf die Alternansratio nach Applikation von Cyclosporin A wird deutlich, dass die Zellen der Serca2a-Maus eine kleinere Alternansratio aufweisen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Überexpression der Serca2a stabilisierend auf die Repolarisation und protektiv gegenüber alternansauslösenden Faktoren wirkt.

Bei der Reoxygenierung von ischämischem Herzgewebe entstehen Metabolite, die zu erhöhten Freisetzung von Sauerstoffradikalen führen. einer Diese Stoffe, sowie Superoxidanionen, Hydroxylanionen und H₂O₂ gelten als toxisch, da sie durch Lipidperoxidation Membran- und folglich auch Gewebsschäden induzieren [116]. Um diesbezüglich einen therapeutischen Ansatz auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde getestet, ob Alternans durch die Applikation eines reduzierenden Mittels wie N-Acethylcystein positiv beeinflusst werden können (siehe auch 3.4.4). Es ist bekannt, dass die Redox-Modifikation von calciumregulierenden Proteinen, wie beispielsweise der Ryanodinrezeptoren, ein Faktor bei der Entstehung von Arrhythmien ist [117, 118]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei der Applikation von NAC nach Schaden durch reaktive Sauerstoffspezies nach vorheriger Applikation von H₂O₂ zu einer signifikanten Reduktion der Alternans im Zytosol und in Mitochondrien kommt. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus einer Studie, die gezeigt hat, dass die Inkubation von Kardiomyozyten von Hunden nach Myokardinfarkt mit dem

Antioxidans Mercaptopropionylglycin zu einem verringerten Auftreten von zytosolischen Calciumalternans führte [119]. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es bei der Serca2a-Maus ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Alternansratio kam. Im Vergleich zu Kardiomyozyten der Kontroll-Maus wiesen die Zellen vom Serca2a-Typ, ähnlich wie beim Versuch mit Cyclosporin A, nach Exposition von NAC eine kleinere Alternansratio auf. Allerdings war auch hier die Veränderung der Alternans von H_2O_2 zu H_2O_2 mit NAC bei Kontroll-Zellen deutlich größer, was wiederum auf die größere Veränderung bei alleiniger Exposition von H_2O_2 zurückzuführen ist.

Die Experimente dieser Studie haben gezeigt, dass die Verschlechterung von Alternans durch mitochondriale Antagonisten in Mäusen mit überexprimierter Serca2a kleiner ausfallen als bei Zellen von Kontroll-Mäusen. Dennoch gelang nicht die vollständige Reversibilität der Alternans, was darauf hinweist, dass noch andere Faktoren an der Genese von Alternans beteiligt sind. Vorherige Studien suggerieren, dass auch die Refraktivität und Erholungskinetik der Serca2a eine Rolle spielen könnte [120]. Die Autoren untersuchten das Phänomen mit Hilfe eines Computermodells, indem sie die Basiseigenschaften zur Erzeugung von Calciumalternans nachbildeten. Eine Kardiomyozyte ist allerdings ein dreidimensionales Netzwerk mit einem komplexen Tubulussystem, auf dessen Darstellung die Autoren in ihrem Modell verzichtet hatten. Viele molekulare Signalwege der Serca, Ryanodinrezeptoren oder L-Typ-Calciumkanäle wurden bei dieser Methode nicht berücksichtigt. Ein anderes Forschungsprojekt von Armoundas et al. sieht einen möglichen Mechanismus bei der Entstehung von Alternans im anormalen spontanen Öffnen der Ryanodinrezeptoren [121]. Die Daten wurden mittels Patch-Clamp-Technik bei isolierten Kardiomyozyten vom Hund gewonnen. Es ist bekannt, dass die Funktion der Kanäle und Pumpen von Spezies zu Spezies etwas unterschiedlich ist [122]. Studien mit unterschiedlichen Spezies sind aus diesem Grund nicht völlig miteinander vergleichbar.

Zusammenfassend wurde die Hypothese der in 4.4 dargestellten Versuche, dass durch die Zugabe eines Antagonisten die Normalisierung und Stabilisierung von Herzalternans möglich ist, teilweise verifiziert.

5.5 Wirkungen der Überexpression der Serca2a auf die Erholung

Um zu ergründen, ob die in 4.3 und 4.4 gesehenen Unterschiede zwischen Kontroll- und Serca2a-Zellen in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Serca2a-Zellen gegenüber metabolischen Stress begründet sind, wurden Kontroll- und Serca2a-Zellen gemäß eines S1-S2-Protokolls (siehe Abbildung 9) stimuliert. Zu jedem durchgeführten Experiment wurde eine

Erholungskurve angefertigt, die Zeitkonstante tau (τ) errechnet, sowie die Werte von Kontrollund Serca2a-Zellen verglichen. In den Experimenten (siehe 4.5) konnte gezeigt werden, dass es in Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen zu einer schnelleren Erholung nach Stimulation der Zellen gemäß eines S1-S2-Protokolls in allen drei beobachteten Kompartimenten (Mitochondrien, SR und Zytosol) verglichen mit Zellen von Kontroll-Mäusen kommt.

Es sind einige Einflüsse auf Herzzellen bekannt, die das Auftreten von Alternans begünstigen. Die Veränderungen der Serca scheinen dabei oftmals als gemeinsamer Wirkungsweg dieser Zustände zu fungieren. Vor über 20 Jahren haben Gwathmey et al. zum ersten Mal die Hypothese aufgestellt, dass die Calciumhomöostase bei Herzversagen gestört ist [123]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Expression der Serca bei Herzinsuffizienz, gleich welcher Ätiologie, verringert und die Calciumfreilassung wegen der erhöhten Durchlässigkeit des SRs erhöht ist [124, 125]. Bei akuter Ischämie dagegen kommt es zum reduzierten ATP-Angebot. In Folge dessen ist die Aktivität der Serca erniedrigt und das SR kann nicht mehr adäquat mit Calcium gefüllt werden. Als Konsequenz kommt es in den Herzzellen zur Instabilität und Herzalternans [126]. Eine Erhöhung der Aktivität der Serca erhöht die Effektivität der Calciumaufnahme des SRs. Auf Grund dieser Überlegungen liegt es nahe, dass versucht wird, durch therapeutische Interventionen die Aktivität der Serca zu erhöhen und das Problem auf zellulärer Ebene direkt zu beheben. Nach Serca-Genetransfer konnte eine Verbesserung der diastolischen und systolischen Herzfunktion erzielt werden [127, 128]. Auch Langzeitergebnisse der Überexpression von Serca2a bei Schweinen im Herzinsuffizienzmodell zeigten dies und die Resultate deuteten darüber hinaus auf ein stattgefundenes Remodeling des linken Ventrikels hin [129]. Weiterführend zeigten Studien, dass vermehrte Serca2a-Expression zu einer Normalisierung der Zellgröße führt und der vermehrte Sauerstoffverbrauch der elektromechanischen Kopplung bei Herzinsuffizienz nach Serca2a-Expression verringert wird [130]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien sinkt [74, 131, 132]. Serca2a-Expression verbessert zusätzlich den Blutfluss durch die Koronararterien durch die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die die Vasodilatation fördert [133].

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Überexpression der Serca2a auch zur verringerten Alternansratio bei metabolisch gestressten Kardiomyozyten führt und, dass diese Veränderungen durch die Manipulation mitochondrialer Signalwege teilweise reversibel sind. Das kann als Verifizierung des zellulären Mechanismus für eine Abnahme von Arrhythmien bei Serca2a-Überexpression in den genannten Studien gesehen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen darin zu bestärken, dass ein therapeutischer

Ansatz der Überregulation von Serca2a sinnvoll ist. Weiterführend stellt diese Studie eine neue Methode vor, die in Kombination mit der transgenen Serca2a-Maus eine Möglichkeit bietet, Veränderungen der Calciumhomöostase darzustellen und weitere Einflüsse der Überexpression von Serca2a zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass hohe Stimulationsfrequenzen das Auftreten von Alternans begünstigen [134], es besteht jedoch Uneinigkeit über den Grund für dieses Phänomen. Im Folgenden werden die beiden Haupthypothesen dafür beschrieben. Eine frühere Studie konnte einen Zusammenhang zeigen zwischen einer verminderten Calciumaufnahme sowie einer Instabilität des Feedbackmechanismus zur Kontrolle des Calciuminhalts im SR und dem erhöhten Auftreten von Alternans [126]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Abbildung 21 und 22 bestätigen diese Annahme teilweise. Wenn Alternans durch die Verzögerung des Calciumrücktransports in das SR oder durch verlangsamte Erholung hervorgerufen werden, müsste der Calciuminhalt vor einem kleinen und vor einem großen Transienten jeweils gleich sein. Im Gegensatz dazu beschreibt die zweite Hypothese das Phänomen des "Feedback Gains". Diese besagt, dass Instabilität entsteht, wenn der "Feedback Gain" zu hoch ist. Ein erhöhter Calciuminhalt des SR führt zu einem vermehrten Calcium im Zytosol. Das führt zu einem größeren Austritt von Calcium aus der Zelle durch den Natrium-Calcium-Austauscher, zu einem erhöhten "Feedback Gain" an die L-Typ-Calciumkanäle und so zu einem erniedrigten SR-Calciuminhalt. Beim nächsten Schlag wird weniger Calcium in das Zytosol abgegeben. In diesem Fall müssten zytosolische Calciumalternans auch durch Alternans im SR begleitet sein, was in unseren Experimenten gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 21). Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Studie, die zeigt, dass zytosolische Calciumtransienten ohne gleichzeitige Änderungen im Calciuminhalt des SR auftraten [23]. Allerdings wurden diese Beobachtungen bei atrialen Kardiomyozyten bei Katzen gemacht. Picht et al. zeigten ebenfalls Calciumalternans im Zytosol und im SR, was die Erkenntnisse dieser Studie unterstützt [135]. Andere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass weitere Mechanismen wie Refraktärzeit [136] und Erholung der Ryanodinrezeptoren [120] ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von frequenz-induzierten Alternans spielen. Eine Studie von Armoundas et al. unterstützt die Idee, dass anormales Öffnen von Ryanodinrezeptoren für Alternans verantwortlich sein könnte [121]. Es scheint erstaunlich, dass es im Zytosol, in den Mitochondrien und im SR zur verbesserten Erholung in Serca2a-Mäusen kommt, obwohl lediglich Serca2a überexprimiert ist. Das legt die Vermutung nahe, dass ein komplexes Netzwerk ähnlich wie in der Hypothese über das "Feedback Gain" dahinter steht. Es sind weitere Studien notwendig, um diese Zusammenhänge zu beleuchten.

Zusammenfassend wird eine der Haupthypothesen dieser Arbeit bestätigt, dass die Überexpression der Serca2a teilweise zu einem Schutz gegenüber Alternans führt und dass die hier gesehenen Effekte auf Alternans auf die schnellere Erholung zurück zu führen sind. Dass es nicht zu einer vollständigen Verminderung von Alternans kam, lässt vermuten, dass die oben genannten Mechanismen wie beispielsweise anormales Öffnen von Ryanodinrezeptoren ebenfalls involviert und Teile eines komplexen Netzwerkes sind.

5.6 Potenzielle Limitationen der Studie

Die in dieser Studie getesteten Mechanismen wurden an isolierten Kardiomyozyten von Mäusen durchgeführt und die gewonnenen Erkenntnisse gelten nur für diese Gruppe. Aussagen über die Übertragbarkeit der hier dargestellten Ergebnisse auf ein Mausmodell oder den Menschen können bis dato nicht gemacht werden. Dennoch liefern die Ergebnisse wichtige Hinweise auf bisher unbekannte Signalwege in Kardiomyozyten. Mit der hier erstmals beschriebenen und etablierten Methode könnten rein technisch auch humane Herzmuskelzellen untersucht werden. Da aber insbesondere die Überexpression der Serca2a erforscht und die neue Methode etabliert werden sollte, stellte die Verwendung von Maus-Kardiomyozyten die einzig durchführbare Alternative dar.

Mitochondriale Calcium-Signalwege und ihr Energiemetabolismus sind eng miteinander verknüpft. In dieser Studie wurden die Einflüsse der Beeinträchtigung der Calciumaufnahme, der Calciumabgabe, der Elektronen-Transport-Kette, der ATP-Produktion, der calciumabhängigen Dehydrogenasen und deren Wirkung auf Herzalternans untersucht. Die hier getesteten Chemikalien sind zwar sehr spezifisch, dennoch beeinflussen sich der Energiemetabolismus und die Calciumhomöostase gegenseitig. Eine strikte Trennung des Energiemetabolismus und der Calciumhomöostase erscheint zwar experimentell sinnvoll, muss aber aufgrund der engen Verflechtungen in einem gemeinsamen Zusammenhang gesehen werden.

Serca2a und die Ryanodinrezeptoren werden durch eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen reguliert. Durch diese Alterationen werden nicht nur physiologische, sondern auch pathophysiologische Mechanismen in Gang gesetzt werden [137]. Es ist bekannt, dass eine posttranslationale Modifikation der Ryanodinrezeptoren eine Rolle bei Herzversagen [138], Ischämie-Reperfusionsschaden [139] und Arrythmien [140] spielt. Die Ryanodinrezeptoren werden durch Proteinkinase A (PKA) und Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) phosphoryliert [141]. Über PKA und auch CaMKII kommt es zudem zur Phosphorylierung von Phospholamban zur Regulierung und Aktivierung von Serca. CaMKII nimmt über

Phosphorylierung wiederum Einfluss auf die L-Typ-Calciumkanäle [137]. Studien zeigen, dass eine Überexpression von CaMKII Hypertrophie, Herzversagen und Arrythmien induziert, wohingegen die Inhibition protektiv gegenüber Arrhythmien und Remodeling wirkt [142-146]. Aufgrund dieser Überlegungen wird auch CaMKII als ein weiteres Angriffsziel für die klinische Therapie gesehen [145, 147] und sollte in weiterführenden Studien miteinbezogen werden.

Die Fluoreszenzwerte wurden normalisiert (genaues Vorgehen Methodenteil auf Seite 37, Zeile), aber nicht als Ratio von F/F0 dargestellt. F steht für die Fluoreszenzintensität, die während des Experiments gemessen wird. F0 ist die Intensität am Anfang des Experiments. Dieses Vorgehen normalisiert Unterschiede in der Indikatorbeladung und erlaubt höhere Vergleichbarkeit der Experimente. In Zukunft sollte dieses Vorgehen gewählt werden.

Wie bereits im Teil "Einleitung" erläutert (1.4 Calciumtransport bei Alternans, Seite 16, Zeile 6-12) ist neben der Calciumaufnahme durch Serca2a aber auch die Calciumrückaufnahme durch die Ryanodinrezeptoren von Bedeutung. Experimente zur Expression und Funktion der Ryanodinrezeptoren wurden nicht durchgeführt, aber sind als Folgeprojekte im Labor in Planung. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Etablierung des Systems, der Darstellung von Calcium in verschiedenen Kompartimenten sowie den Einfluss der Überexpression der Serca2a zu erforschen. Eine experimentelle Trennung und einzelne Betrachtung von Serca2a sollte in Hinblick auf die Zusammenhänge in Zukunft auch eine gemeinsame Betrachtung der Ryanodinrezeptoren miteinschliessen.

Eine interessante Fragestellung wäre außerdem, ob die gefundenen Effekte in Kardiomyozyten von Serca2a-Mäusen durch Inhibition der Serca2a auf Wildtyp-Niveau modulierbar sind. Sollte dies der Fall sein, so spräche das ebenfalls für eine starke Rolle von Serca2a. Dafür bedarf es eines Inhibitors, der nicht alle Serca2a-Pumpen inhibiert und für den spezifische Konzentrationen und deren prozentuale Hemmung bekannt sind. Es gibt eine Reihe von Inhibitoren der Serca [148], jedoch machen Studien lediglich Aussagen ab welcher Konzentration eine komplette Hemmung eintritt. Eine inkomplette Hemmung könnte durch geringere Konzentrationen, als für die Maximalhemmung notwendig, erreicht werden. Diese optimale Konzentration zu ermitteln, wäre aufwendig und würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

Für Teilexperiment B wurden keine Calcium-Abfall-Konstanten des Koffeintransienten, der eine Funktion des Na-Ca-Austauschers beschreibt, errechnet. Wie in der Einleitung ausgeführt (Seite 13, Zeile 30-34) sind vier Mechanismen für die Entfernung von Calcium in der Diastole zuständig: die Serca, der Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellwand, die Calcium-ATPase in der Zellwand und der Calcium-Uniporter in den Mitochondrien. Wobei vor allen

Dingen die ersten beiden Mechanismen den größten Teil dazu beitragen. Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer verminderten Expression oder Funktionsfähigkeit der Serca Expression des NCX was die Entstehung von Alternans fördert. Da Serca2a mit dem Natrium-Calcium-Austauscher, um die Entfernung des Calciums in der Diastole konkurriert [149] erscheint es sinnvoll in weiterführenden Studien die Hochregulierung der Serca2a auch bezüglich der Effekte auf den Natrium-Calcium-Austauscher hin zu evaluieren.

Abschließend wird daraufhin gewiesen, dass die Versuche an gesunden Kardiomyozyten durchgeführt wurden und diese so lange elektrisch stimuliert wurden, bis es zu Alternans kam. Dieser Mechanismus gleicht nicht ganz der Entstehung von Alternans bei Herzkranken. Daher kann die direkte Übertragung auf Pathophysiologien limitiert sein.
6. Literaturverzeichnis

- Fishman, G.I., S.S. Chugh, J.P. Dimarco, C.M. Albert, M.E. Anderson, R.O. Bonow, A.E. Buxton, P.S. Chen, M. Estes, X. Jouven, R. Kwong, D.A. Lathrop, A.M. Mascette, J.M. Nerbonne, B. O'Rourke, R.L. Page, D.M. Roden, D.S. Rosenbaum, N. Sotoodehnia, N.A. Trayanova, and Z.J. Zheng, *Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop.* Circulation, 2010. **122**(22): p. 2335-48.
- 2. Zheng, Z.J., J.B. Croft, W.H. Giles, and G.A. Mensah, *Sudden cardiac death in the United States*, *1989 to 1998*. Circulation, 2001. **104**(18): p. 2158-63.
- 3. Klein, *Prävention des plötzlichen Herztodes*. Internist, 2006. **47**: p. 1040-1050.
- 4. Stevenson, W.G., L.W. Stevenson, H.R. Middlekauff, and L.A. Saxon, *Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction*. Circulation, 1993. **88**(6): p. 2953-61.
- 5. Bigger, J.T., Jr., J.L. Fleiss, R. Kleiger, J.P. Miller, and L.M. Rolnitzky, *The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction.* Circulation, 1984. **69**(2): p. 250-8.
- 6. Ragupathi, L. and B.B. Pavri, *Tools for risk stratification of sudden cardiac death: a review of the literature in different patient populations*. Indian Heart J, 2014. **66 Suppl 1**: p. S71-81.
- Rosenbaum, D.S., L.E. Jackson, J.M. Smith, H. Garan, J.N. Ruskin, and R.J. Cohen, *Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias*. N Engl J Med, 1994. 330(4): p. 235-41.
- 8. Armoundas, A.A., G.F. Tomaselli, and H.D. Esperer, *Pathophysiological basis and clinical application of T-wave alternans.* J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(2): p. 207-17.
- 9. Smith, J.M., E.A. Clancy, C.R. Valeri, J.N. Ruskin, and R.J. Cohen, *Electrical alternans and cardiac electrical instability*. Circulation, 1988. **77**(1): p. 110-21.
- 10. Hering, H., *Das Wesen des Herzalternans*. München. Med. Wchenshr., 1908(4): p. 1417-1421.
- 11. Armoundas, A.A., *Discordant calcium transient and action potential alternans in a canine left-ventricular myocyte.* IEEE Trans Biomed Eng, 2009. **56**(9): p. 2340-4.
- 12. Traube, Ein Fall von Pulsus bigeminus nebst Bemerkungen über die Leberschwellungen bei Klappenfehlern und über akute Leberatrophie. Berliner Klinische Wochenschrift, 1872(9): p. 185-188.

- 13. Lewis, T., Notes upon alternation of the heart. Quart. J. Med., 1910(4): p. 141-144.
- 14. Uno, K., *Mechanisms of pulsus alternans: its relation to alternation of regional contraction and elevated ST segment.* Am Heart J, 1991. **122**(6): p. 1694-700.
- 15. Surawicz, B. and C. Fisch, *Cardiac alternans: diverse mechanisms and clinical manifestations*. J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(2): p. 483-99.
- Konta, T., K. Ikeda, M. Yamaki, K. Nakamura, K. Honma, I. Kubota, and S. Yasui, *Significance of discordant ST alternans in ventricular fibrillation*. Circulation, 1990. 82(6): p. 2185-9.
- 17. Merchant, F.M., O. Sayadi, D. Puppala, K. Moazzami, V. Heller, and A.A. Armoundas, *A translational approach to probe the proarrhythmic potential of cardiac alternans: a reversible overture to arrhythmogenesis?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **306**(4): p. H465-74.
- 18. Sherman, D.G., L. Goldman, R.B. Whiting, K. Jurgensen, M. Kaste, and J.D. Easton, *Thromboembolism in patients with atrial fibrillation*. Arch Neurol, 1984. **41**(7): p. 708-10.
- 19. Verrier, R.L. and B.D. Nearing, *Electrophysiologic basis for T wave alternans as an index of vulnerability to ventricular fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1994. **5**(5): p. 445-61.
- 20. Pastore, J.M., S.D. Girouard, K.R. Laurita, F.G. Akar, and D.S. Rosenbaum, *Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation*. Circulation, 1999. **99**(10): p. 1385-94.
- 21. Shimizu, W. and C. Antzelevitch, *Cellular and ionic basis for T-wave alternans under long-QT conditions*. Circulation, 1999. **99**(11): p. 1499-507.
- 22. Pruvot, E.J., R.P. Katra, D.S. Rosenbaum, and K.R. Laurita, *Role of calcium cycling versus restitution in the mechanism of repolarization alternans*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1083-90.
- 23. Hüser, J., Y.G. Wang, K.A. Sheehan, F. Cifuentes, S.L. Lipsius, and L.A. Blatter, *Functional coupling between glycolysis and excitation-contraction coupling underlies alternans in cat heart cells.* J Physiol, 2000. **524 Pt 3**: p. 795-806.
- 24. Pogwizd, S.M., K. Schlotthauer, L. Li, W. Yuan, and D.M. Bers, Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1159-67.
- 25. Laurita, K.R. and D.S. Rosenbaum, *Cellular mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **97**(2-3): p. 332-47.

- 26. Lesnefsky, E.J., S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure.* J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(6): p. 1065-89.
- 27. Griffiths, E.J., Mitochondria and heart disease. Adv Exp Med Biol, 2012. 942: p. 249-67.
- 28. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
- 29. Brenner, C. and M. Moulin, *Physiological roles of the permeability transition pore*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1237-47.
- 30. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, *Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms*. J Physiol, 1994. **476**(2): p. 279-93.
- 31. Arai, M., H. Matsui, and M. Periasamy, *Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res, 1994. **74**(4): p. 555-64.
- 32. Wu, K.D., W.S. Lee, J. Wey, D. Bungard, and J. Lytton, *Localization and quantification* of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 1): p. C775-84.
- 33. Hasenfuss, G., *Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 279-89.
- 34. Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto, and T. Pozzan, *Looking forward to seeing calcium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 579-86.
- 35. Cavalier-Smith, T., *The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies.* Ann N Y Acad Sci, 1987. **503**: p. 55-71.
- 36. Gray, M.W., *The endosymbiont hypothesis revisited*. Int Rev Cytol, 1992. **141**: p. 233-357.
- 37. Harris, D.A. and A.M. Das, *Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart*. Biochem J, 1991. **280** (**Pt 3**): p. 561-73.
- 38. Neely, J.R., R.M. Denton, P.J. England, and P.J. Randle, *The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart*. Biochem J, 1972. **128**(1): p. 147-59.
- 39. Wollenberger, A., *Relation between work and labile phosphate content in the isolated dog heart.* Circ Res, 1957. **5**(2): p. 175-8.

- 40. Balaban, R.S., H.L. Kantor, L.A. Katz, and R.W. Briggs, *Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart*. Science, 1986. **232**(4754): p. 1121-3.
- 41. Robitaille, P.M., H. Merkle, B. Lew, G. Path, K. Hendrich, P. Lindstrom, A.H. From, M. Garwood, R.J. Bache, and K. Ugurbil, *Transmural high energy phosphate distribution* and response to alterations in workload in the normal canine myocardium as studied with spatially localized 31P NMR spectroscopy. Magn Reson Med, 1990. **16**(1): p. 91-116.
- 42. Weiss, R.G., P.A. Bottomley, C.J. Hardy, and G. Gerstenblith, *Regional myocardial metabolism of high-energy phosphates during isometric exercise in patients with coronary artery disease*. N Engl J Med, 1990. **323**(23): p. 1593-600.
- 43. Schaefer, S., G.G. Schwartz, S.K. Steinman, D.J. Meyerhoff, B.M. Massie, and M.W. Weiner, *Metabolic response of the human heart to inotropic stimulation: in vivo phosphorus-31 studies of normal and cardiomyopathic myocardium.* Magn Reson Med, 1992. **25**(2): p. 260-72.
- 44. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.* Biochem J, 1999. **341** (**Pt 2**): p. 233-49.
- 45. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca2+ trigger site.* Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 460-7.
- 46. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms.* Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.
- 47. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca2+ release.* Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 468-77.
- 48. Honda, H.M. and P. Ping, *Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(6): p. 425-32.
- 49. Hajnoczky, G., G. Csordas, S. Das, C. Garcia-Perez, M. Saotome, S. Sinha Roy, and M. Yi, *Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca2+ uptake in apoptosis.* Cell Calcium, 2006. **40**(5-6): p. 553-60.
- 50. Rasola, A. and P. Bernardi, *The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis.* Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 815-33.
- 51. Stanley, W.C. and C.L. Hoppel, *Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions?* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 805-6.

- 52. Walters, A.M., G.A. Porter, Jr., and P.S. Brookes, *Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1222-36.
- 53. Penna, C., M.G. Perrelli, and P. Pagliaro, *Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications.* Antioxid Redox Signal, 2012. **18**(5): p. 556-99.
- 54. Zhu, J., M.J. Rebecchi, P.S. Glass, P.R. Brink, and L. Liu, *Cardioprotection of the aged rat heart by GSK-3beta inhibitor is attenuated: age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(3): p. H922-30.
- 55. Balaban, R.S., *Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 832-41.
- 56. Denton, R.M., P.J. Randle, and B.R. Martin, *Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase*. Biochem J, 1972. **128**(1): p. 161-3.
- 57. Denton, R.M., D.A. Richards, and J.G. Chin, *Calcium ions and the regulation of NAD*+linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. Biochem J, 1978. **176**(3): p. 899-906.
- 58. McCormack, J.G. and R.M. Denton, *The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex.* Biochem J, 1979. **180**(3): p. 533-44.
- 59. Griffiths, E.J., *Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 789-803.
- 60. Trollinger, D.R., W.E. Cascio, and J.J. Lemasters, *Mitochondrial calcium transients in adult rabbit cardiac myocytes: inhibition by ruthenium red and artifacts caused by lysosomal loading of Ca*(2+)*-indicating fluorophores.* Biophys J, 2000. **79**(1): p. 39-50.
- 61. Isenberg, G., S. Han, A. Schiefer, and M.F. Wendt-Gallitelli, *Changes in mitochondrial calcium concentration during the cardiac contraction cycle*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(10): p. 1800-9.
- 62. Lukacs, G.L. and A. Kapus, *Measurement of the matrix free Ca2+ concentration in heart mitochondria by entrapped fura-2 and quin2*. Biochem J, 1987. **248**(2): p. 609-13.
- 63. O'Rourke, B. and L.A. Blatter, *Mitochondrial Ca2+ uptake: tortoise or hare?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 767-74.
- Leisey, J.R., L.W. Grotyohann, D.A. Scott, and R.C. Scaduto, Jr., *Regulation of cardiac mitochondrial calcium by average extramitochondrial calcium*. Am J Physiol, 1993. 265(4 Pt 2): p. H1203-8.

- 65. Gunter, K.K. and T.E. Gunter, *Transport of calcium by mitochondria*. J Bioenerg Biomembr, 1994. **26**(5): p. 471-85.
- 66. Florea, S.M. and L.A. Blatter, *The role of mitochondria for the regulation of cardiac alternans*. Front Physiol, 2010. **1**: p. 141.
- 67. Hirayama, Y., H. Saitoh, H. Atarashi, and H. Hayakawa, *Electrical and mechanical alternans in canine myocardium in vivo. Dependence on intracellular calcium cycling.* Circulation, 1993. **88**(6): p. 2894-902.
- 68. Lab, M.J. and J.A. Lee, *Changes in intracellular calcium during mechanical alternans in isolated ferret ventricular muscle*. Circ Res, 1990. **66**(3): p. 585-95.
- 69. Tomaselli, G.F. and E. Marban, *Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 270-83.
- 70. Studer, R., H. Reinecke, J. Bilger, T. Eschenhagen, M. Bohm, G. Hasenfuss, H. Just, J. Holtz, and H. Drexler, *Gene expression of the cardiac* Na(+)-Ca2+ exchanger in end-stage human heart failure. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 443-53.
- 71. Iyer, V., V. Heller, and A.A. Armoundas, *Altered spatial calcium regulation enhances electrical heterogeneity in the failing canine left ventricle: implications for electrical instability.* J Appl Physiol, 2012. **112**(6): p. 944-55.
- 72. Schwinger, R.H., M. Bohm, U. Schmidt, P. Karczewski, U. Bavendiek, M. Flesch, E.G. Krause, and E. Erdmann, Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca2+ uptake and Ca(2+)-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. Circulation, 1995. **92**(11): p. 3220-8.
- 73. Wilson, L.D., X. Wan, and D.S. Rosenbaum, *Cellular alternans: a mechanism linking calcium cycling proteins to cardiac arrhythmogenesis.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1080**: p. 216-34.
- 74. Prunier, F., Y. Kawase, D. Gianni, C. Scapin, S.B. Danik, P.T. Ellinor, R.J. Hajjar, and F. Del Monte, *Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion*. Circulation, 2008. **118**(6): p. 614-24.
- 75. Paredes, R.M., J.C. Etzler, L.T. Watts, W. Zheng, and J.D. Lechleiter, *Chemical calcium indicators*. Methods, 2008. **46**(3): p. 143-51.
- 76. Griffiths, E.J., D. Balaska, and W.H. Cheng, *The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 856-64.
- 77. Suarez, J., B. Gloss, D.D. Belke, Y. Hu, B. Scott, T. Dieterle, Y.K. Kim, M.L. Valencik, J.A. McDonald, and W.H. Dillmann, *Doxycycline inducible expression of SERCA2a*

improves calcium handling and reverts cardiac dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(5): p. H2164-72.

- 78. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
- 79. Valencik, M.L. and J.A. McDonald, *Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart.* Transgenic Res, 2001. **10**(3): p. 269-75.
- 80. He, H., F.J. Giordano, R. Hilal-Dandan, D.J. Choi, H.A. Rockman, P.M. McDonough, W.F. Bluhm, M. Meyer, M.R. Sayen, E. Swanson, and W.H. Dillmann, *Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation.* J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 380-9.
- 81. Shioya, T., A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. J Physiol Sci, 2007. **57**(6): p. 327-35.
- 82. Liao, R. and M. Jain, *Isolation, culture, and functional analysis of adult mouse cardiomyocytes.* Methods Mol Med, 2007. **139**: p. 251-62.
- 83. Sellin, L.C. and J.J. McArdle, *Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime*. Pharmacol Toxicol, 1994. **74**(6): p. 305-13.
- 84. Artigas, P., S.J. Al'aref, E.A. Hobart, L.F. Diaz, M. Sakaguchi, S. Straw, and O.S. Andersen, 2,3-butanedione monoxime affects cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel function through phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent mechanisms: the role of bilayer material properties. Mol Pharmacol, 2006. **70**(6): p. 2015-26.
- 85. Watanabe, Y., T. Iwamoto, I. Matsuoka, S. Ohkubo, T. Ono, T. Watano, M. Shigekawa, and J. Kimura, *Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on Na(+)/Ca(2+) exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes.* Br J Pharmacol, 2001. **132**(6): p. 1317-25.
- 86. Ionoptix, *HyperSwitch Hardware Manual*, 2008. (Accessed April 12, 2012, at http://www.ionoptix.com)
- 87. Rousseau, E. and G. Meissner, *Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+-release channel: activation by caffeine.* Am J Physiol, 1989. **256**(2 Pt 2): p. H328-33.
- 88. Rustin, P., T. Bourgeron, B. Parfait, D. Chretien, A. Munnich, and A. Rotig, *Inborn* errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. Biochim Biophys Acta, 1997. **1361**(2): p. 185-97.

- 89. Kirby, M.S., Y. Sagara, S. Gaa, G. Inesi, W.J. Lederer, and T.B. Rogers, *Thapsigargin inhibits contraction and Ca2+ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump.* J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12545-51.
- 90. Xu, L., A. Tripathy, D.A. Pasek, and G. Meissner, *Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **853**: p. 130-48.
- 91. Hajnoczky, G., L.D. Robb-Gaspers, M.B. Seitz, and A.P. Thomas, *Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria*. Cell, 1995. **82**(3): p. 415-24.
- 92. Gallo, M.P., R. Ramella, G. Alloatti, C. Penna, P. Pagliaro, A. Marcantoni, F. Bonafe, G. Losano, and R. Levi, *Limited plasticity of mesenchymal stem cells cocultured with adult cardiomyocytes.* J Cell Biochem, 2007. **100**(1): p. 86-99.
- 93. Lu, F.H., Z. Tian, W.H. Zhang, Y.J. Zhao, H.L. Li, H. Ren, H.S. Zheng, C. Liu, G.X. Hu, Y. Tian, B.F. Yang, R. Wang, and C.Q. Xu, *Calcium-sensing receptors regulate cardiomyocyte Ca2+ signaling via the sarcoplasmic reticulum-mitochondrion interface during hypoxia/reoxygenation.* J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 50.
- 94. Sun, H.Y., N.P. Wang, M.E. Halkos, F. Kerendi, H. Kin, R.X. Wang, R.A. Guyton, and Z.Q. Zhao, *Involvement of Na+/H+ exchanger in hypoxia/re-oxygenation-induced neonatal rat cardiomyocyte apoptosis*. Eur J Pharmacol, 2004. **486**(2): p. 121-31.
- 95. Wang, H., M.J. Kohr, C.J. Traynham, and M.T. Ziolo, *Phosphodiesterase 5 restricts NOS3/Soluble guanylate cyclase signaling to L-type Ca2+ current in cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(2): p. 304-14.
- 96. Xie, L.H., F. Chen, H.S. Karagueuzian, and J.N. Weiss, *Oxidative-stress-induced* afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. Circ Res, 2009. **104**(1): p. 79-86.
- 97. Kapur, S., J.A. Wasserstrom, J.E. Kelly, A.H. Kadish, and G.L. Aistrup, Acidosis and ischemia increase cellular Ca2+ transient alternans and repolarization alternans susceptibility in the intact rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(5): p. H1491-512.
- 98. Shkryl, V.M., J.T. Maxwell, T.L. Domeier, and L.A. Blatter, *Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release determines Ca2+ alternans in atrial myocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(11): p. H2310-20.
- 99. O'Neill, S.C., P. Donoso, and D.A. Eisner, *The role of [Ca2+]i and [Ca2+] sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of [Ca2+]i and [caffeine]i.* J Physiol, 1990. **425**: p. 55-70.
- 100. Bassani, R.A., J.W. Bassani, and D.M. Bers, *Relaxation in ferret ventricular myocytes:* unusual interplay among calcium transport systems. J Physiol, 1994. **476**(2): p. 295-308.

- 101. Weiss, J.N., A. Karma, Y. Shiferaw, P.S. Chen, A. Garfinkel, and Z. Qu, *From pulsus to pulseless: the saga of cardiac alternans.* Circ Res, 2006. **98**(10): p. 1244-53.
- 102. Kockskamper, J. and L.A. Blatter, Subcellular Ca2+ alternans represents a novel mechanism for the generation of arrhythmogenic Ca2+ waves in cat atrial myocytes. J Physiol, 2002. 545(Pt 1): p. 65-79.
- 103. Kockskamper, J., A.V. Zima, and L.A. Blatter, *Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release by glycolysis in cat atrial myocytes.* J Physiol, 2005. **564**(Pt 3): p. 697-714.
- Lee, H.C., R. Mohabir, N. Smith, M.R. Franz, and W.T. Clusin, *Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing indo 1. Correlation with monophasic action potentials and contraction.* Circulation, 1988. **78**(4): p. 1047-59.
- 105. Wu, Y. and W.T. Clusin, *Calcium transient alternans in blood-perfused ischemic hearts: observations with fluorescent indicator fura red.* Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2161-9.
- 106. Newsholme, E.A., P.J. Randle, and K.L. Manchester, *Inhibition of the phosphofructokinase reaction in perfused rat heart by respiration of ketone bodies, fatty acids and pyruvate.* Nature, 1962. **193**: p. 270-1.
- 107. Buntinas, L., K.K. Gunter, G.C. Sparagna, and T.E. Gunter, *The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 248-61.
- 108. Sparagna, G.C., K.K. Gunter, S.S. Sheu, and T.E. Gunter, *Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27510-5.
- 109. Territo, P.R., S.A. French, M.C. Dunleavy, F.J. Evans, and R.S. Balaban, *Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO2, NADH, AND light scattering.* J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2586-99.
- 110. Ohata, H., E. Chacon, S.A. Tesfai, I.S. Harper, B. Herman, and J.J. Lemasters, Mitochondrial Ca2+ transients in cardiac myocytes during the excitation-contraction cycle: effects of pacing and hormonal stimulation. J Bioenerg Biomembr, 1998. 30(3): p. 207-22.
- Huser, J., L.A. Blatter, and S.S. Sheu, *Mitochondrial calcium in heart cells: beat-to-beat oscillations or slow integration of cytosolic transients?* J Bioenerg Biomembr, 2000. 32(1): p. 27-33.
- 112. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Mitochondrial Ca2+ and the heart*. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 77-91.

- 113. Huser, J., C.E. Rechenmacher, and L.A. Blatter, *Imaging the permeability pore transition in single mitochondria*. Biophys J, 1998. **74**(4): p. 2129-37.
- Zamzami, N., S.A. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gomez-Monterrey, M. Castedo, and G. Kroemer, *Mitochondrial control of nuclear apoptosis*. J Exp Med, 1996. 183(4): p. 1533-44.
- 115. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca2+dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress.* Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
- 116. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 159-63.
- 117. Zima, A.V. and L.A. Blatter, *Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 310-21.
- 118. Hidalgo, C. and P. Donoso, *Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(7): p. 1275-312.
- 119. Belevych, A.E., D. Terentyev, S. Viatchenko-Karpinski, R. Terentyeva, A. Sridhar, Y. Nishijima, L.D. Wilson, A.J. Cardounel, K.R. Laurita, C.A. Carnes, G.E. Billman, and S. Gyorke, *Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(3): p. 387-95.
- Rovetti, R., X. Cui, A. Garfinkel, J.N. Weiss, and Z. Qu, Spark-induced sparks as a mechanism of intracellular calcium alternans in cardiac myocytes. Circ Res, 2010. 106(10): p. 1582-91.
- 121. Armoundas, A.A., *Mechanism of abnormal sarcoplasmic reticulum calcium release in canine left-ventricular myocytes results in cellular alternans.* IEEE Trans Biomed Eng, 2009. **56**(2): p. 220-8.
- 122. Jayasinghe, I., D. Crossman, C. Soeller, and M. Cannell, *Comparison of the organization* of *T-tubules, sarcoplasmic reticulum and ryanodine receptors in rat and human* ventricular myocardium. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(5): p. 469-76.
- 123. Gwathmey, J.K., L. Copelas, R. MacKinnon, F.J. Schoen, M.D. Feldman, W. Grossman, and J.P. Morgan, *Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure*. Circ Res, 1987. **61**(1): p. 70-6.
- 124. Hasenfuss, G., H. Reinecke, R. Studer, M. Meyer, B. Pieske, J. Holtz, C. Holubarsch, H. Posival, H. Just, and H. Drexler, *Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca*(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 434-42.

- 125. Lompre, A.M., F. Lambert, E.G. Lakatta, and K. Schwartz, *Expression of sarcoplasmic reticulum Ca*(2+)-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. Circ Res, 1991. **69**(5): p. 1380-8.
- 126. Eisner, D.A., M.E. Diaz, Y. Li, S.C. O'Neill, and A.W. Trafford, *Stability and instability of regulation of intracellular calcium*. Exp Physiol, 2005. **90**(1): p. 3-12.
- 127. del Monte, F., S.E. Harding, U. Schmidt, T. Matsui, Z.B. Kang, G.W. Dec, J.K. Gwathmey, A. Rosenzweig, and R.J. Hajjar, *Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a*. Circulation, 1999. **100**(23): p. 2308-11.
- 128. Sakata, S., D. Lebeche, N. Sakata, Y. Sakata, E.R. Chemaly, L.F. Liang, T. Tsuji, Y. Takewa, F. del Monte, R. Peluso, K. Zsebo, D. Jeong, W.J. Park, Y. Kawase, and R.J. Hajjar, *Restoration of mechanical and energetic function in failing aortic-banded rat hearts by gene transfer of calcium cycling proteins*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(4): p. 852-61.
- 129. Kawase, Y., H.Q. Ly, F. Prunier, D. Lebeche, Y. Shi, H. Jin, L. Hadri, R. Yoneyama, K. Hoshino, Y. Takewa, S. Sakata, R. Peluso, K. Zsebo, J.K. Gwathmey, J.C. Tardif, J.F. Tanguay, and R.J. Hajjar, *Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(11): p. 1112-9.
- 130. Sakata, S., D. Lebeche, Y. Sakata, N. Sakata, E.R. Chemaly, L. Liang, C. Nakajima-Takenaka, T. Tsuji, N. Konishi, F. del Monte, R.J. Hajjar, and M. Takaki, *Transcoronary* gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H1204-7.
- 131. Cutler, M.J., X. Wan, B.N. Plummer, H. Liu, I. Deschenes, K.R. Laurita, R.J. Hajjar, and D.S. Rosenbaum, *Targeted sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart*. Circulation, 2012. **126**(17): p. 2095-104.
- 132. Cutler, M.J., X. Wan, K.R. Laurita, R.J. Hajjar, and D.S. Rosenbaum, *Targeted* SERCA2a gene expression identifies molecular mechanism and therapeutic target for arrhythmogenic cardiac alternans. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. **2**(6): p. 686-94.
- 133. Hadri, L., R. Bobe, Y. Kawase, D. Ladage, K. Ishikawa, F. Atassi, D. Lebeche, E.G. Kranias, J.A. Leopold, A.M. Lompre, L. Lipskaia, and R.J. Hajjar, SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells. Mol Ther, 2010. 18(7): p. 1284-92.
- 134. Turitto, G., E.B. Caref, G. El-Attar, M. Helal, A. Mohamed, R.P. Pedalino, and N. El-Sherif, *Optimal target heart rate for exercise-induced T-wave alternans*. Ann Noninvasive Electrocardiol, 2001. **6**(2): p. 123-8.

- 135. Picht, E., J. DeSantiago, L.A. Blatter, and D.M. Bers, *Cardiac alternans do not rely on diastolic sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuations*. Circ Res, 2006. **99**(7): p. 740-8.
- 136. Kornyeyev, D., M. Reyes, and A.L. Escobar, *Luminal Ca*(2+) content regulates intracellular Ca(2+) release in subepicardial myocytes of intact beating mouse hearts: effect of exogenous buffers. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(6): p. H2138-53.
- 137. Niggli, E., N.D. Ullrich, D. Gutierrez, S. Kyrychenko, E. Polakova, and N. Shirokova, *Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca*(2+) *signaling and EC-coupling.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1833**(4): p. 866-75.
- 138. Terentyev, D., I. Gyorke, A.E. Belevych, R. Terentyeva, A. Sridhar, Y. Nishijima, E.C. de Blanco, S. Khanna, C.K. Sen, A.J. Cardounel, C.A. Carnes, and S. Gyorke, *Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in chronic heart failure*. Circ Res, 2008. **103**(12): p. 1466-72.
- 139. Lefer, D.J. and D.N. Granger, *Oxidative stress and cardiac disease*. Am J Med, 2000. **109**(4): p. 315-23.
- 140. Li, J., J. Solus, Q. Chen, Y.H. Rho, G. Milne, C.M. Stein, and D. Darbar, *Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation*. Heart Rhythm, 2010. **7**(4): p. 438-44.
- 141. Takasago, T., T. Imagawa, K. Furukawa, T. Ogurusu, and M. Shigekawa, *Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation*. J Biochem, 1991. **109**(1): p. 163-70.
- 142. Backs, J., T. Backs, S. Neef, M.M. Kreusser, L.H. Lehmann, D.M. Patrick, C.E. Grueter, X. Qi, J.A. Richardson, J.A. Hill, H.A. Katus, R. Bassel-Duby, L.S. Maier, and E.N. Olson, *The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(7): p. 2342-7.
- 143. Maier, L.S., *CaMKIIdelta overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling.* Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(9): p. 1293-302.
- 144. Zhang, T., L.S. Maier, N.D. Dalton, S. Miyamoto, J. Ross, Jr., D.M. Bers, and J.H. Brown, *The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 912-9.
- 145. Cheng, J., L. Xu, D. Lai, A. Guilbert, H.J. Lim, T. Keskanokwong, and Y. Wang, *CaMKII inhibition in heart failure, beneficial, harmful, or both.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(7): p. H1454-65.

- 146. Fischer, T.H., J. Eiringhaus, N. Dybkova, A. Forster, J. Herting, A. Kleinwachter, S. Ljubojevic, J.D. Schmitto, K. Streckfuss-Bomeke, A. Renner, J. Gummert, G. Hasenfuss, L.S. Maier, and S. Sossalla, *Ca /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy.* Eur J Heart Fail, 2014.
- 147. Anderson, M.E., *Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias.* Pharmacol Ther, 2005. **106**(1): p. 39-55.
- 148. Michelangeli, F. and J.M. East, *A diversity of SERCA Ca2+ pump inhibitors*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(3): p. 789-97.
- 149. Eisner, D.A., H.S. Choi, M.E. Diaz, S.C. O'Neill, and A.W. Trafford, *Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1087-94.

Lebenslauf

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

Lebenslauf

Lebenslauf

Publikationsliste

Originalarbeiten in Zeitschriften mit Peer-Review-Verfahren

Stary V, Malinowski M, Lock JF, Schulz A, Jara M, Demirel L, Seehofer D, Puhl G, Gebauer B, Denecke T, Neuhaus P, Stockmann M: Factors influencing hypertrophy of the left liver lobe after portal vein embolization, a clinical study. Langenbecks Arch Surg, 2014 December. (als Veröffentlichung akzeptiert)

Malinowski M, Geisel D, **Stary V**, Denecke T, Seehofer D, Jara M, Baron A, Pratschke J, Gebauer B, Stockmann M: Portal vein embolization with plug/coils improves hepatectomy outcome. J Surg Res, 2014 October. (E-Publikation vor Print)

Geisel D, Malinowski M, Powerski MJ, Wustefeld J, **Heller V**, Denecke T, Stockmann M, Gebauer B. Improved hypertrophy of future remnant liver after portal vein embolization with plugs, coils and particles. Cardiovasc Intervent Radiol, 2013. 37(5): p. 1251-8.

Iyer V, **Heller V**, Armoundas AA. Altered spatial calcium regulation enhances electrical heterogeneity in the failing canine left ventricle: implications for electrical instability. J Appl Physiol, 2012. 112(6): p. 944-55.

Merchant FM, Sayadi O, Puppala D, Moazzami K, **Heller V**, Armoundas AA. A translational approach to probe the proarrhythmic potential of cardiac alternans: a reversible overture to arrhythmogenesis? Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. 306(4): p. H465-74.

Stary V, Armoundas AA: SERCA2a Upregulation Ameliorates Cellular Alternans Induced by Metabolic Inhibitions. (in Arbeit)

weitere Veröffentlichungen

Heller V, Erne F, van der Linde J: 2. Summer-School der Theodor-Billroth-Akademie: Erfahrungsbericht aus Sicht der Teilnehmer. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie – Mitteilungen 04/09: 375-377.

Abstracts

Heller V, Malinowski M, Lehmann S, Demirel L, Gebauer B, Puhl G, Seehofer D, Neuhaus P, Stockmann M: Factors influencing hypertrophy of the left liver lobe after portal vein embolization, a clinical study. E-AHPBA 2013, Belgrad, 29.-31. Mai 2013. (als Vortrag angenommen)

Heller V, Malinowski M, Gebauer B, Wagner C, Seehofer D, Neuhaus P, Stockmann M: Hypertrophie des linken Leberlappens nach selektiver Pfortaderembolisation: die Wilsede. Workshop Einflussfaktoren. Biotest für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie, 20.-22. Juni 2013. (als Vortrag angenommen)

Malinowski M, **Heller V**, Gebauer B, Wagner C, Seehofer D, Neuhaus P, Stockmann M: Signifikante Verbesserung der Proliferation vom linken Leberlappen nach Pfortader Embolisation mit vaskulärem Plug. **Biotest Wilsede**. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie, 20.-22. Juni 2013. (als Vortrag angenommen)

Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Victoria Stary, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Die Rolle der Mitochondrien in der Genese von Herzalternans und der Einfluss der Überexpression von Serca2a in Mauskardiomyozyten" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Wien, den 18.12.2014

Victoria Stary

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe für seine sehr gute Betreuung sowie die hilfreichen Ratschläge. Besonders erwähnenswert ist außerdem seine stets schnelle Hilfe und volle Unterstützung in allen Belangen. Zudem bin ich dankbar dafür, dass Prof. Dr. med. Dr. phil. Beier den Kontakt zu Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe herstellte.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Antonis A. Armoundas aus Boston und seiner gesamten Forschungsgruppe bedanken, die meine Forschungsaufenthalte mit fortwährend konstruktiven Kommentaren unterstützten und mir auch außerhalb des Labors freundschaftlich zur Seite standen.

Ausdrücklich möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bei der Stiftung Charité, dem DAAD und dem Berliner Ärztefinanzzentrums bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch meiner Familie und meinen Eltern für die stets liebevolle Unterstützung. Ganz besonders danken möchte ich meinem Ehemann Georg Stary sowie Simon, David und Anna.