

Diplomarbeit

Subzelluläre Mechanismen der zytosolischen Ca^{2+} Entfernung in Herzmuskelzellen

Eingereicht von
Felix Hohendanner

Mat.Nr.: 0534319

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

durchgeführt an der
Klinischen Abteilung für Kardiologie
Medizinische Universitätsklinik

unter der Anleitung von
Ass. Prof. Dr. med. Frank Heinzl, PhD
PD Dr.rer.nat. Simon Sedej

GRAZ, 30. JUNI 2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

ICH ERKLÄRE EHRENWÖRTLICH, DASS ICH DIE VORLIEGENDE ARBEIT SELBSTSTÄNDIG UND OHNE FREMDE HILFE VERFASST HABE, ANDERE ALS DIE ANGEgebenEN QUELLEN NICHT VERWENDE HABE UND DIE DEN BENUTZTEN QUELLEN WÖRTLICH ODER INHALTLICH ENTNOMMENEN STELLEN ALS SOLCHE KENNTLICH GEMACHT HABE.

GRAZ, AM

UNTERSCHRIFT

INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abstract	6
Zusammenfassung.....	7
Einleitung.....	8
Die Physiologie des Herzens.....	8
Elektromechanische Koppelung.....	8
Ca ²⁺ -Induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung	9
Mechanismen der Ca ²⁺ -Entfernung aus dem Zytosol	10
Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase	11
Natrium-Kalzium-Austauscher	12
Plasma-Membran-Kalzium-ATPase	13
Mitochondrien.....	13
Subzelluläre Ca ²⁺ -Mikrodomänen	16
T-Tubuli, Couplons und PMCA.....	16
Sarkoplasmatisches Retikulum und SERCA	17
Mitochondrien und Nuklei	18
Physiologische Modulation der intrazellulären Ca ²⁺ -Homöostase	18
Veränderungen der intrazellulären Ca ²⁺ -Freisetzung bei Herzinsuffizienz	19
Dyssynchrone Ca ²⁺ -Freisetzung als Mechanismus der kontraktile Dysfunktion.....	20
Ziele der Studie.....	20
Hypothesen	20
Material und Methoden.....	21
Tiermodell	21
Wildtyp-Maus.....	21
Heterozygote NCX Knock-out Maus.....	21
Chronische regionale myokardiale Ischämie im Schwein	21
Zellisolation	23
Dissektion und Präparation des Herzgewebes.....	23
Kanülierung des Herzens und Perfusion am Langendorff-System.....	24
Messung von zytosolischem [Ca ²⁺].....	25
Darstellung der t-tubulären Strukturen	25
Simultane Darstellung t-tubulärer Strukturen und des subzellulären [Ca ²⁺]	26

Darstellung der Mitochondrien.....	26
Lösungen	27
konfokale Mikroskopie und Messplatz	28
Messung der Ca ²⁺ -Transienten.....	28
Versuchsprotokolle	29
Wirkung von Formamid.....	29
Wirkung von SEA0400	30
Wirkung von CPA.....	30
Wirkung von Forskolin	31
Wirkung von Ru360.....	31
Ru360-/SEA-/CPA-/Forskolin-Protokoll.....	32
Doppelfärbung (Mitotracker Red FM und Fluo4-AM).....	33
Detubulierung	34
Wildtyp-/NCX-Knockout-Maus und Wildtyp-/Infarkt-Schwein: Subzelluläre Ca ²⁺ -Messung...	35
Analyse der Ca ²⁺ -Transienten.....	35
Prinzip.....	35
Parameter der Analyse: Tau, CV _{TAU} , TF50, F _{peak} , TR50, TR90.....	35
Definition von „slow sites“ und „fast sites“	37
Statistische Auswertung und Software	37
Ergebnisse	38
Örtliche Inhomogenitäten der subzellulären Ca ²⁺ -Entfernung während „Steady-State“-Stimulation.....	38
Charakterisierung der Inhomogenitäten in der zytosolischen Ca ²⁺ -Entfernung.....	38
Zusammenhang zwischen Ca ²⁺ -Freisetzung und Ca ²⁺ -Entfernung.....	39
Unterschiede in den Inhomogenitäten der Ca ²⁺ -Entfernung im Vergleich maus – schwein	41
Die Rolle des NCX	43
SEA-0400	43
Inhomogenitäten in der Ca ²⁺ -Entfernung im NCX-Knockout Mausmodell	44
Die Rolle der SERCA.....	45
Forskolin	45
CPA	47
Die Rolle der Mitochondrien	49
Mitotracker	49
Ru360	50

Konsequenzen inhomogener Ca ²⁺ -Entfernung	51
Subzelluläre Ca ²⁺ -Belastung	51
Das Auftreten von Inhomogenitäten in der Ca ²⁺ -Entfernung im Modell kardialen „Remodelings“ beim Post-Infarkt Schwein	51
Diskussion.....	53
Inhomogenitäten in der zytosolischen Ca ²⁺ -Entfernung.....	53
Ursachen größerer Inhomogenitäten in Schwein und Maus	53
T-Tubuli.....	54
NCX	55
SERCA	55
Mitochondrien.....	56
Lokale Pufferung	57
Andere Erklärungsansätze.....	57
Implikationen im Bereich chronischer kardialer Ischämie	58
Limitationen	59
Zusammenfassung.....	60
Literaturverzeichnis.....	61
Abkürzungsverzeichnis.....	61
Abbildungsverzeichnis.....	66
Danksagung	68
Lebenslauf	71

ABSTRACT

In cardiomyocytes, cytosolic Ca^{2+} removal is mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX), plasmalemmal Ca^{2+} ATPase and mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU). We report, for the first time, spatiotemporal inhomogeneities in cytosolic Ca^{2+} removal in normal and diseased heart and explore underlying mechanisms.

Spatially resolved Ca^{2+} transients (1 Hz, Fluo-4 AM) were recorded at steady state using confocal microscopy in ventricular cardiomyocytes. The time constant of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ decay (τ_{loc}) of local Ca^{2+} transients was quantified at 1 μm intervals across the cell. In murine cardiomyocytes τ_{loc} distribution was inhomogeneous, with a maximal difference between cell regions of 237 ± 9 ms and a variation coefficient (CV $_{\tau}$) of $14 \pm 2\%$ (mean \pm S.E.M., $n=10$ cells). τ_{loc} was not related to the local amplitude or release kinetics of Ca^{2+} . Coherent regions of fast (fastCaR, $\tau_{\text{loc}} < \text{mean } \tau$ of whole cell) and slow (slowCaR) Ca^{2+} removal had similar widths (4.6 ± 0.2 vs. 5.1 ± 0.5 μm). Forskolin accelerated, and SERCA inhibitor cyclopiazonic acid (CPA) inhibited Ca^{2+} removal significantly more in slowCaR than in fastCaR. In contrast, NCX-inhibitor SEA0400 slowed cytosolic Ca^{2+} removal similarly in slowCaR and fastCaR. Also, CV $_{\tau}$ was similar in NCX $^{+/-}$ knock-out vs. wild-type mice, suggesting no contribution of NCX to the dyssynchrony of cytosolic Ca^{2+} removal. τ_{loc} distribution was also inhomogeneous in pig ventricular myocytes. Ca^{2+} removal from the cytosol was more dyssynchronous in cardiomyocytes from chronic (4 weeks) ischemic pig myocardium (peri-infarct zone) vs. sham-operated pigs (CV $_{\tau}$ $24 \pm 1\%$ vs. $20 \pm 1\%$, $n=57$ cells/group, $p < 0.05$).

Simultaneous recording of Ca^{2+} transients and mitochondrial signal (mitotracker) unveiled a significant correlation between fastCaR regions and mitochondria ($n=9$ cells, $p < 0.05$). Ru360 (MCU-inhibitor) slowed τ_{loc} more in fastCaR (to $126 \pm 12\%$ vs. $112 \pm 10\%$ of baseline in slowCaR; $p < 0.05$, $n=5$).

Conclusion: Cytosolic Ca^{2+} removal is dyssynchronous in mouse and pig cardiomyocytes. Ca^{2+} removal in chronically ischemic cardiomyocytes is more dyssynchronous, suggesting a potential new mechanism of cardiomyocyte dysfunction. Mitochondria influence the differences in local Ca^{2+} removal.

ZUSAMMENFASSUNG

Das zytosolische Ca^{2+} wird in Kardiomyozyten vor allem durch die Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} ATPase (SERCA) und dem sarkolemmlen Na/Ca^{2+} Austauscher (NCX), in geringerem Maße auch durch die plasmalemmale Ca^{2+} ATPase und Mitochondrien erniedrigt. Wir beschreiben erstmals räumliche und zeitliche Inhomogenitäten in der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung in normalen und erkrankten Herzen und erforschen zu Grunde liegende Mechanismen.

Räumlich aufgelöste Ca^{2+} -Transienten (1 Hz, Fluo-4 AM) wurden unter „Steady-State“ Bedingungen in ventrikulären Kardiomyozyten mittels konfokaler Mikroskopie aufgezeichnet. Wir quantifizierten die Zeitkonstante des zytosolischen Ca^{2+} -Abfalls (τ_{loc}) des lokalen Ca^{2+} -Transients in Intervallen von 1 μm über die Zelle. Die Verteilung von τ_{loc} war in murinen Kardiomyozyten inhomogen, mit einer maximalen Differenz zwischen den Zellregionen von 237 ± 9 ms und einem Variationskoeffizienten (CV_{τ}) von $14 \pm 2\%$ ($\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$, $n=10$ cells). Es fand sich keine Abhängigkeit von τ_{loc} und der lokalen Amplitude oder Ca^{2+} -Freisetzungskinetik. Kohärente Regionen schneller (FastCaR, $\tau_{\text{loc}} < \text{mittleres Tau der Gesamtzelle}$) und langsamer (SlowCaR) Ca^{2+} -Entfernung hatten dieselbe Breite (4.6 ± 0.2 vs. 5.1 ± 0.5 μm). Forskolin beschleunigte, und der SERCA-Inhibitor Cyclopiazonsäure (CPA) hemmte die Ca^{2+} -Entfernung signifikant stärker in SlowCaR als in FastCaR. Im Gegensatz dazu verlangsamte der NCX-Inhibitor SEA0400 die zytosolische Ca^{2+} -Entfernung in gleichem Maße in SlowCaR und FastCaR. Zudem war CV_{τ} in $\text{NCX}^{+/-}$ knock-out vs. wild-typ Mäusen gleich, eine Tatsache, die auf einen geringeren Beitrag des NCX zur Inhomogenität der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung hinweist. Die Verteilung von τ_{loc} war auch in ventrikulären Kardiomyozyten des Schweines inhomogen. Die Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol war stärker inhomogen in Kardiomyozyten eines chronisch (4 Wochen) ischämischen Schweineherzes (Peri-Infarkt Zone) im Vergleich mit sham-operierten Tieren (CV_{τ} $24 \pm 1\%$ vs. $20 \pm 1\%$, $n=57$ cells/group, $p < 0,05$).

Simultane Aufnahmen von Ca^{2+} -Transienten und mitochondrialen Signalen (Mitotracker) brachten eine signifikante Korrelation zwischen FastCaR und Mitochondrien zum Vorschein ($n=9$ cells, $p < 0,05$). Ru360 (MCU-Inhibitor) verlangsamte τ_{loc} in FastCaR stärker (auf $126 \pm 12\%$ vs. $112 \pm 10\%$ der Basiswerte in SlowCaR; $p < 0,05$, $n=5$).

Konklusion: Die zytosolische Ca^{2+} -Entfernung ist sowohl in Maus als auch in Schweinekardiomyozyten inhomogen. Da die Ca^{2+} -Entfernung in chronisch ischämischen Kardiomyozyten stärker inhomogen ist, ist ein potentiell neuer Mechanismus der Herzmuskelzell-Dysfunktion zu vermuten. Mitochondrien haben einen Einfluss auf die Unterschiede in der lokalen Ca^{2+} -Entfernung.

EINLEITUNG

DIE PHYSIOLOGIE DES HERZENS

Das gesunde Herz schlägt rhythmisch und in einem Zyklus aus Muskelkontraktion und darauf folgender Relaxation. Es stellt durch seine Kontraktion den regelrechten Auswurf von Blut in den Kreislauf sicher, während die Relaxation der darauf folgenden Füllung des Organs dient. Diese beiden Phasen erlauben eine Unterteilung des Herzzyklus in Systole und Diastole.

Definitionsgemäß versteht man unter der Systole eine zunächst isovolumetrische Anspannungsphase, beginnend mit dem Schluss der Atrioventrikularklappen bis zur Öffnung der Semilunarklappen. Sowie eine zweite sog. Austreibungsphase, während der es zum Auswurf des Blutvolumens und schließlich zum Schluss der Semilunarklappen kommt^[1].

Während der Diastole kommt es zur Erschlaffung des Muskels. Auch hier können zwei Phasen unterschieden werden: 1. Die isovolumetrische Relaxation im Anschluss an den Schluss der Semilunarklappen. Sowie 2. die Füllungsphase, während der es zu einem Bluteinstrom in das Hohlorgan kommt. Dazu öffnen sich die Segelklappen und es kommt zur unterstützenden Kontraktion des Vorhofmyokards^[1].

Ausschlaggebend für das Zustandekommen einer regelrechten systolischen Kontraktion der Herzkammer ist die synchrone elektrische Aktivierung der Kardiomyozyten. Ursprung dieser elektrischen Erregung ist der Sinusknoten. Er initiiert die elektrische Aktivierung des Herzens und ist aufgrund seiner schnellen Depolarisationsrate Taktgeber für das sich ausbreitende elektrische Signal. Dieses auch als Aktionspotential bezeichnete Signal wird in den Herzmuskelzellen schließlich in mechanische Aktivität im Sinne einer Kontraktion umgewandelt.

ELEKTROMECHANISCHE KOPPELUNG

Bei Kardiomyozyten handelt es sich um elektrisch erregbare Zellen, die in der Lage sind, sich bei elektrischer Aktivierung zu kontrahieren. Kardiomyozyten verfügen über spannungsabhängige sarkolemmale Kanäle, deren Aktivierung bzw. Inaktivierung zu einer Änderung des Membranpotentials über die Zeit führt (Aktionspotential).

“Das zelluläre Aktionspotential entsteht aus einem transienten, lokalen, transsarkolemalem depolarisierenden Strom, der das transmembranöse Potential von seinem Ruhewert von -80 bis -90 mV auf gering positive Werte bringt; gefolgt von einem (repolarisierenden, transsarkolemalem) Strom der das Potential zu seinem Ruhewert zurückführt.”^[2]

Dabei führt die initiale Öffnung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (ab -60 mV) zu einem schnellen Natriumeinstrom, der schließlich für die Erhöhung des Membranpotentials auf bis zu +30 mV verantwortlich ist^[3]. Bei ca. -30 mV kommt es bereits zur Öffnung der L-Typ-Kalzium-Kanäle (DHPR), die einen lang andauernden Kalzium(Ca^{2+})-Einstrom in das Zytosol der Zelle induzieren. Dieser Mechanismus dauert auch nach Beendigung des Natriumstroms ca. 200 ms an und trägt wesentlich zur Plateauphase des Aktionspotentials im Herzen bei. Der langsame Ca^{2+} -Einstrom ist wichtig, um eine simultane Kontraktion der ventrikulären Kardiomyozyten zu ermöglichen.

Bei der Elektromechanischen Koppelung (engl. Excitation-contraction-coupling, ECC) handelt es sich um einen Prozess, der zur Umwandlung des elektrischen Aktionspotentials in ein chemisches Signal führt. Dieses chemische Signal entspricht einer zunächst minimalen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Öffnung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle^[4].

In einer darauf folgenden Ca^{2+} -abhängigen Kaskade kommt es zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und somit zur Zellkontraktion. Anschließend und zur Initiierung der Relaxation wird das Ca^{2+} durch die Sarkoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), den Natrium(Na^+)- Ca^{2+} -Austauscher (NCX) sowie Mitochondrien (MCU) und die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) wieder aus dem Zytosol entfernt.

Ca^{2+} -INDUZIERTES Ca^{2+} -FREISETZUNG

Die mechanische Kontraktion des Herzens ist vom zunächst geringen Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran im Rahmen der DHPR-Öffnung und einer darauf folgenden maximalen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) abhängig. Doch wie erreicht das Aktionspotential das Innere der Zelle und wie genau kommt es zum, für die Kontraktion suffizienten, maximalen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} ?

Eine ausschlaggebende Rolle spielt die Verbindung zwischen Einstülpungen in der Zellmembran, sog. T-Tubuli und dem SR. Dieses Faktum ergab sich erstmals aus den Beobachtungen von Huxley und Taylor an Muskelzellen: Hierbei wurde eine Mikroelektrode in der Nähe so genannter „sensitiver Punkte“^[5], von denen sich später herausstellte dass es sich hierbei um T-Tubuli handelt, platziert. Eine elektrische Stimulation dieser Elektrode führte dann zu einer Kontraktion von naheliegenden Sarkomer-Strukturen^[5].

In gesunden Zellen strömt während des Aktionspotentials Ca^{2+} durch DHPR und zu einem kleinen Teil NCX-vermittelt in das Innere der Zelle. Das Vorhandensein der T-Tubuli garantiert dabei das schnelle Weiterleiten des Aktionspotentials in zentrale Bereiche der Zelle. Der Einfluss dieses ersten Ioneneinstroms auf Ca^{2+} -Bindestellen am sog. Ryanodinrezeptor (RyR) ist von größter Wichtigkeit bezogen auf die Gesamt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung und damit die Troponin medierte Aktivierung der Myofilamente^[6]: Fabiato et al schlugen ein Model vor, bei dem Ca^{2+} die Aktivierungsstellen von SR-RyR besetzt und dadurch zu einer Öffnung dieser Ca^{2+} -Kanäle und somit einem weiteren, maximalen Ca^{2+} -Influx in das Zytosol führt. Dieser Prozess wird als Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bezeichnet^[7].

Die CICR ist auf lokaler, subzellulärer Ebene stark reguliert und beruht auf einer von Stern et al. vorgeschlagenen funktionellen Einheit, dem „Couplon“^[8]. Hierbei befindet sich gemäß der sog. „Local Control Theory“ zwischen 3 und 25 t-tubuläre L-Typ- Ca^{2+} -kanäle in nächster Nähe (~12 nm) zu zwischen 21 und 250 SR-RyR^[9, 10]. In diesem Zusammenhang sind zwei Entitäten von Bedeutung: 1. Die räumliche Nähe von T-Tubulus und SR (Diade) und damit auch die räumliche Nähe einer definierten Menge von DHPR und RyR (Couplon). Erst diese räumliche Nähe ermöglicht, ausgelöst durch minimalen Ca^{2+} -Einstrom via sarkolemmaler/T-Tubulärer DHPR, die maximale Ca^{2+} -freisetzung via RyR aus dem SR.

Couplons stellen nach heutigem Verständnis die fundamentale Einheit der Ca^{2+} -Freisetzung dar, die in Form von lokalen Ereignissen, den Ca^{2+} -„Sparks“, im Rahmen der konfokalen Mikroskopie visualisierbar ist. Die Kontraktion der Gesamtzelle während einer elektrischen Erregung wird

durch die Summation vieler Einzelsparks determiniert: Die Kombination der Einzelsparks führt zur ausreichenden Erhöhung des intrazellulären zytosolischen Gesamt- Ca^{2+} und bildet sog. Ca^{2+} -Transienten. Diese Ca^{2+} -Transienten gehen mit der Kontraktion des Kardiomyozyten einher.

MECHANISMEN DER Ca^{2+} -ENTFERNUNG AUS DEM ZYTOSOL

Die Zelle verfügt zur Initiierung der diastolischen Relaxation über eine Vielzahl von Möglichkeiten, das zytosolische Ca^{2+} zu vermindern. Hierbei sind vier Mechanismen relevant: PMCA, MCU, NCX und SERCA (Abbildung 1).

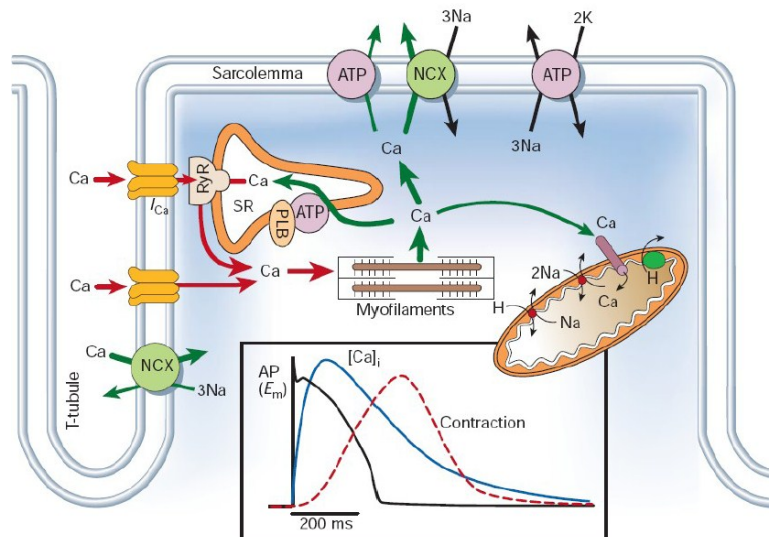


Abbildung 1: Mechanismen der Ca^{2+} -Homöostase: NCX pumpt Ca^{2+} gegen Natrium aus der Zelle. Mitochondriale Ca^{2+} -Pumpen und SR- Ca^{2+} -Pumpen entfernen ebenfalls unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} aus dem Zytosol. Dieser Prozess spielt sich zeitlich in etwa während der mechanischen Zellkontraktion und ab Beginn eines Aktionspotentials ab. Er führt letztlich zur diastolischen Relaxation der Zelle^[6].

Wie Basaini et al 1992 in Kardiomyozyten von Hasen zeigen konnte, sind diese vier Mechanismen in unterschiedlichem Ausmaß an der Ca^{2+} -Entfernung beteiligt^[11]. In der Studie wurden jeweils PMCA, MCU, NCX bzw. SERCA gehemmt.

Abbildung 2 zeigt den Vorgang der Relaxation bei selektiver Inhibierung der Ca^{2+} -Transporter. „Tw“ stellt den Verlauf einer normalen Nachkontraktionsphase dar. Durch das Hinzufügen von Koffein (hält die RYR in geöffnetem Zustand) in die Zelllösung wird die SERCA umgangen, da das Ca^{2+} aus dem SR in diesem Fall ungehindert in das Zytosol zurückfließen kann. Die dann verbleibenden Mechanismen sind NCX und Mitochondrien/PMCA.

Perfundiert man nun zudem mit einer koffeinhaltigen Ca^{2+} und Na^+ freien Lösung ($0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lsg.), so kann auch der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher nicht mehr aktiv werden. Das Hinzufügen von FCCP, einer Substanz die als Protonophore wirksam wird und damit den MCU „hemmt“, wurde zur Quantifizierung der rein PMCA-medierte Ca^{2+} -Entfernung benutzt. PMCA konnte schließlich durch hohe externe Ca^{2+} -Lösungen (10Ca) thermodynamisch inaktiviert werden.

Demnach sind beim Hasen PMCA und MCU zu etwa einem Prozent, NCX zu ca. 30% und SERCA zu 70% (beim Menschen bis zu 90%) für die Ca^{2+} -Entfernung verantwortlich.

Relaxation of Rabbit Ventricular Myocytes

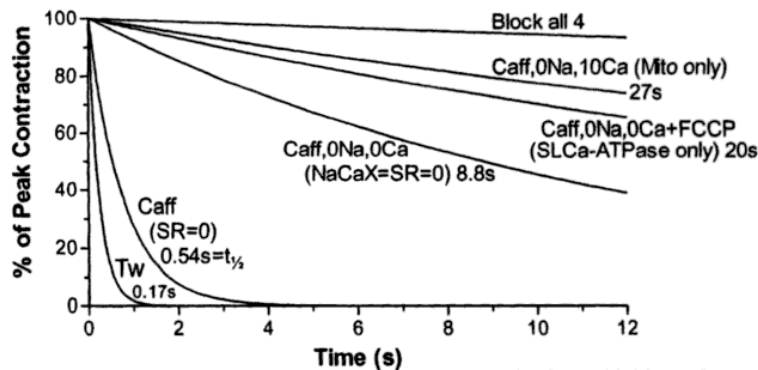


Abbildung 2: Effekt der Blockade einzelner Ca^{2+} -Entfernungsmechanismen auf die Relaxation der Zelle. Bei bloßer Pumpwirkung der SERCA (SLCa-ATPase only) vergehen 20 s bis zur vollständigen Relaxation. Aus diesen Messungen konnte der Anteil der einzelnen Komponenten am Prozess der Ca^{2+} -Entfernung errechnet werden^[12].

Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase

Die sarkoplasmatische Retikulum Ca ATPase (SERCA) stellt unter physiologischen Bedingungen den quantitativ wichtigsten Mechanismus der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung dar^[13]. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, unterscheidet sich der Ca^{2+} -Fluss je nach Spezies unter physiologischen und pathologischen (Herzinsuffizienz) Bedingungen beträchtlich. In Ratten und Mäusen zeigt sich eine relative SR Ca^{2+} -Entfernung (via SERCA) von über 90%, während man beim Menschen einen Anteil von ca. 60% beobachtet hat. NCX trägt zu bis zu 30% zur Ca^{2+} -Entfernung bei, MCU und PMCA je zu ungefähr 1%. Bei kardialer Dysfunktion kommt es zu einer relativen Zunahme des SL Ca^{2+} -Transports.

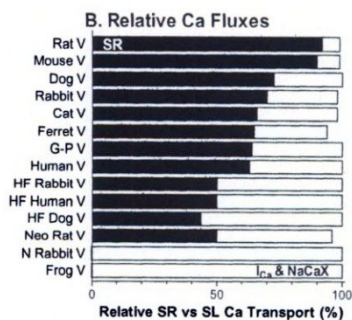


Abbildung 3: Relativer Ca^{2+} -Fluss in das SR bzw. in den extrazellulären Raum. Ratten und Mäuse weisen eine SR-Ca-Entfernung von bis zu 90 % des zytosolischen Gesamt- Ca^{2+} auf. Auffällig ist die relative Zunahme des SL Ca^{2+} -Transports bei kardialer Dysfunktion (HF)^[12].

Schon 1961 identifizierten Hasselbach und Makinose SERCA als „Relaxationsfaktor“ im Muskel, der für die Erniedrigung des zytosolischen Ca^{2+} während der Diastole des Herzzyklus verantwortlich sein sollte^[14]. Aufgebaut wird dieses Molekül aus zehn membranüberspannenden Regionen mit mehreren zytosolischen Ausläufern. Des Weiteren weist SERCA Ca^{2+} -Bindungsdomänen, Phosphorylierungsstellen und andere strangbildende Aminosäureketten auf^[15]. Die bis dato wichtigsten drei beschriebenen Isoformen in Herzmuskelzellen sind SERCA 1, 2 und 3, jeweils mit mehreren Unterformen, unterschiedlicher Distribution und Affinität zu Ca^{2+} .

Die für den Ca^{2+} -Transport im Herzen quantitativ wichtigste Form ist die SERCA 2, welche hauptsächlich in den L-Tubuli des SR zu finden ist. Hier transportiert diese Pumpe unter Verbrauch von ATP zwei Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma in das SR^[16].

Eine Modulation der SERCA-Aktivität ist durch Phospholamban (PLB) vermittelte Inaktivierung möglich. PLB ist ein Regulatorprotein, das selbst durch Ca^{2+} /Calmodulin abhängige oder cAMP abhängige Proteinkinasen (PKA) phosphoryliert und damit inaktiviert werden kann. Eine solche Inaktivierung von PLB, beispielsweise durch adrenerge Stimulation, bewirkt eine Beschleunigung bzw. Steigerung der Ca^{2+} -Entfernung in das SR^[17-19].

Des Weiteren ist diese Ca^{2+} -Pumpe pH sensitiv: Eine Alkalose erhöht und eine Azidose verringert die Affinität zu Ca^{2+} und damit die Pumpleistung^[12].

Es existieren eine Vielzahl pharmakologischer Einflussmöglichkeiten auf die SERCA: Neben einer Hemmung durch Thapsigargin oder Cyclopiazonsäure (CPA) lässt sich ihre Aktivität beispielsweise durch Forskolin steigern^[16].

Natrium-Kalzium-Austauscher

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Ca^{2+} -Entfernung wird durch den NCX repräsentiert. NCX1, die dominante Isoform dieses Proteins im Herzen, wird von zwei Membranportainen mit einigen transmembranösen und einer sehr großen zytoplasmatischen, hydrophilen Domäne aufgebaut^[20]. Die Verteilung entspricht einem weit verstreuten homogenen Muster, bei geringer Ko-Lokalisation mit RYR^[21]. Frank et al. konnten zeigen, dass der NCX vor allem in der Nähe von T-Tubuli zu finden ist^[22].

Während der Ionenfluss in etwa 1000 mal langsamer als in DHPR ist, beträgt die Dichte dieses Proteins 200-400/ μm^2 , entsprechend dem 10-20 fachen der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Dies unterstreicht die Bedeutung des NCX. Da bei jedem Herzschlag eine gewisse Menge des Ions durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle gelangt, ist der NCX der Balance des Einstroms von außerhalb zugeordnet. Die SERCA pumpt hingegen die Menge des durch CICR über RYR freigelassenen Ca^{2+} zurück in das SR.

Während eines normalen mechanischen Zellzyklus werden so 8-30% des absoluten aktivierenden Ca^{2+} durch den NCX entfernt. Um die Zelle in einem Fließgleichgewicht zu halten, muss diese Menge genau mit der Anzahl der durch DHPR einströmenden Ca^{2+} -Ionen übereinstimmen. Die exakte Menge des Ca^{2+} ist dabei je nach Spezies unterschiedlich groß^[12].

Der NCX arbeitet mit einer Stöchiometrie von $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ ^[23] in einem als „Ping-Pong“ bezeichneten Reaktionsmechanismus. Drei Na^+ -Ionen binden an den NCX und bewirken eine Konformationsänderung, wodurch diese nach intrazellulär dissoziieren. Damit einhergehend bindet ein intrazelluläres Ca^{2+} -Ion an den NCX. Eine weitere Änderung der Konformation führt zur Umschaltung des NCX nach außen und gleichzeitig Freisetzung des gebundenen Ca^{2+} in den extrazellulären Raum^[12].

Der „Ping-Pong“-Reaktionsmechanismus findet sich vor allem im Rahmen der Ca^{2+} -Entfernung. Er funktioniert allerdings auch in die andere Richtung, abhängig davon ob $[\text{Ca}^{2+}]_i$ höher oder niedriger als $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ist. Allerdings findet sich unter Normalbedingungen eher der „inward“ oder

„reverse“-Modus, dh. im Regelfall werden Natriumionen in die Zelle und im Austausch dafür Ca^{2+} aus der Zelle gepumpt.^[12]

Eine spezifische Hemmung des Natrium Ca^{2+} -Austauschers ist beispielweise durch die Verwendung $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ -Lsg. oder von SEA-0400 möglich.

Plasma-Membran-Kalzium-ATPase

Derzeit sind vier PMCA-Isoformen sowie eine große Zahl von Splicevarianten bekannt^[24]. Nur PMCA1 und 4 finden sich in praktisch allen Zellen und scheinen neben ihrer Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase eine Vielzahl weiterer Funktionen im Rahmen der Muskelproliferation, aber auch der Signaltransduktion zu übernehmen^[25,26].

Dabei stellt diese Ca^{2+} -Pumpe in nicht erregbaren Zellen den Hauptmechanismus der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung dar. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich und einleitend bereits näher ausgeführt, trägt sie in ventrikulären Herzmuskelzellen allerdings lediglich zu ca. 1% des zytosolischen Ca^{2+} -Abfalls bei. Hier dürfte die Funktion also weniger in der quantitativen Ca^{2+} -Entfernung als in der Vermittlung Ca^{2+} induzierter intrazellulärer Signale zu sehen sein. Ihre Beteiligung an der Modulation bestimmter kardialer Enzyme des Nitrogenmonoxid-Stoffwechsels und damit unter anderem der Angiogenese und dem Gefäßtonus ist nach wie vor Gegenstand der Forschung^[27].

Mitochondrien

Mitochondrien sind in der Lage unter in vivo Bedingungen bis zu $100 \mu\text{mol Ca}^{2+}$ pro Liter Zytosol zu akkumulieren. Im Vergleich mit $20\text{-}250 \mu\text{mol Ca}^{2+}$ pro Liter Zytosol im SR ist das tatsächlich eine beträchtliche Menge^[28]. Dabei verfügen diese Organellen über folgende Strukturen für die Ca^{2+} -Homöostase (Abbildung 4): Ca^{2+} gelangt über mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (mCU) in das Mitochondrium und nimmt dort Aufgaben im Rahmen des Zitratzyklus (citric acid cycle) und der Atmungskette wahr. Außerdem spielen mitochondriale Natrium-Protonen-Austauscher und mitochondriale Natrium- Kalzium-Austauscher (mNCX) eine Rolle. Letzterer ist für den Ca^{2+} -Ausstrom zurück in das Zytosol verantwortlich.

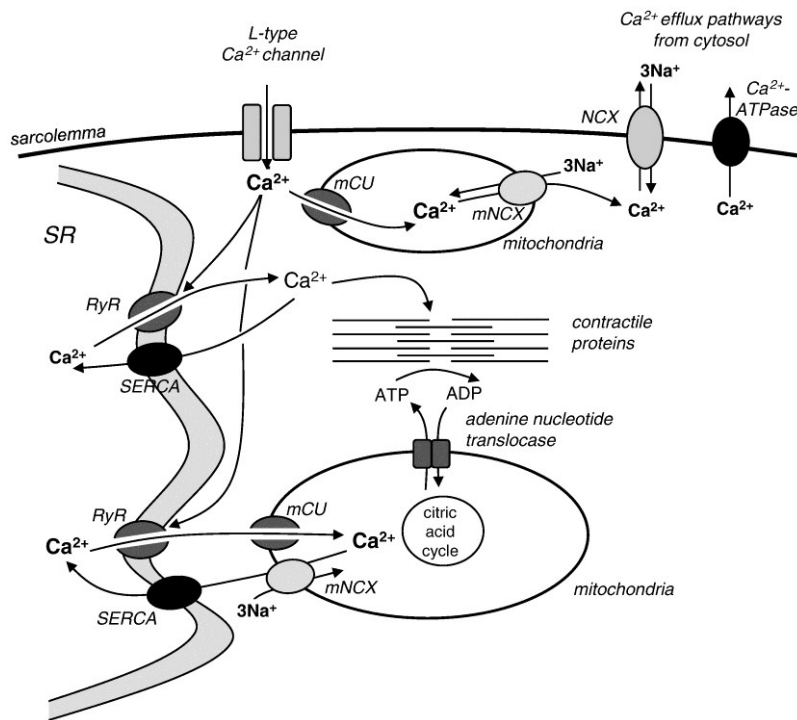


Abbildung 4: Mechanismen mitochondrialer Ca^{2+} -Homöostase in Verbindung mit Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Ca^{2+} gelangt direkt nach Freisetzung über RYR oder L-Typ Ca^{2+} Kanal über mitochondriale Ca^{2+} uniporter (MCU) in das Mitochondrium und nimmt dort Aufgaben im Rahmen des Zitratzyklus (TCA) und der Atmungskette (RC) wahr. Diese Zellorganelle verfügt zudem über mitochondriale Natrium- Kalzium-Austauscher (mNCX), deren Ca^{2+} ausstrom zur SR- Ca^{2+} -Füllung während der Relaxation beiträgt^[29].

Für die wichtigsten beiden mitochondrialen Ca^{2+} -Transporter, MCU und mNCX, existieren mehrere blockierende Substanzen. MCU lässt sich beispielsweise mit Ru360 inhibieren (Abbildung 5).

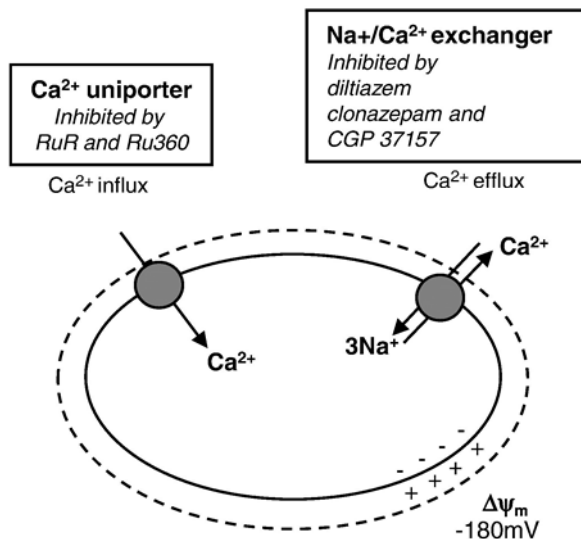


Abbildung 5: Die wichtigsten Mechanismen mitochondrialer Ca^{2+} -Homöostase: Ca^{2+} -Uniporter und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger können mittels spezifischer Substanzen gehemmt werden. Das durchgezogene Oval steht für die innere, das gestrichelte Oval für die permeable äußere mitochondriale Membran. $\Delta\psi_m$ bezeichnet das Membranpotential mit etwa -180 mV bei aktiven Mitochondrien. (Modifiziert nach Griffiths et al.^[29]).

Bei der Frage nach dem mitochondrialen Anteil an der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung spielt die Unterscheidung einer kontinuierlichen von einer schnellen Ca^{2+} -Entfernung auf „Herzschlag zu Herzschlag“-Basis (Beat-to-Beat) eine große Rolle.

In der Literatur wird nach wie vor kontrovers diskutiert, ob eine schnelle, kontinuierliche bzw. eine Beat-to-Beat Ca^{2+} -Entfernung in Mitochondrien existiert und wie groß deren jeweilige Beteiligung bei der Ca^{2+} -Entfernung ist. Konsens ist jedoch, dass eine starke Spezies-Abhängigkeit beobachtet werden kann. So konnten einige Autoren zeigen, dass mitochondriale Ca^{2+} -Transienten in Meerschweinchen aber nicht in Ratten oder Hamstern messbar waren^[29].

Bei der Beat-to-Beat unabhängigen Ca^{2+} -Entfernung ist der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter ausschlaggebend. Das Ion gelangt aufgrund eines elektrochemischen Gradienten (erzeugt durch die Atmungskette) in die Zelle. Der K_m Wert (Substratkonzentration mit Halbmaximaler Sättigung des Uniporters) dieses Prozesses liegt bei über $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Da das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter physiologischen Bedingungen bei ca. $0.1 - 1 \mu\text{M}$ liegt, ist die Influx-Rate des Uniporters also relativ gering^[30].

Zudem ist die Dichte dieser Kanäle an der inneren mitochondrialen Membran vergleichbar mit der von DHPR im Sarkolemm und beträgt ca. $\sim 10-40$ Kanäle pro μm^2 ^[31].

Der potentielle Einfluss des MCU auf die basale Ca^{2+} -Homöostase zeigte sich in Experimenten von Bassini et al.: Hierbei wurden sowohl NCX als auch SERCA blockiert, die Zelle mit Ca^{2+} beladen und in Folge dessen, $30 - 50 \%$ der Ca^{2+} -Menge durch den MCU innerhalb von 30 Sekunden entfernt^[32].

Für eine langsame Ca^{2+} -Entfernung spricht unter anderem eine Studie von Sedova et al. Hierbei wurde das mitochondriale Ca^{2+} , nach Permeabilisierung der Zellmembran mittels der Substanz Saponin und Applikation von intermittierenden schnellen Ca^{2+} -Spitzen via Perfusions-Lösung gemessen. Es fanden sich keine Beat-to-Beat-Veränderungen des $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Erst bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (500 nM) kam es zu einer langsamen Anhäufung des Ions im Inneren der Mitochondrien^[33]. Eine Tatsache, die zum einen für einen Schwellenwert der mitochondrialen Ca^{2+} -Entfernung und zum anderen für die geringe Geschwindigkeit dieses Prozesses spricht.

Weitere Beweise für diese Behauptung lieferten auch andere Gruppen, bei denen es praktisch keine Veränderung des mitochondrialen Ca^{2+} -Levels während einer normalen Kontraktion in ventrikulären Herzmuskelzellen gab^[34].

Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise für eine schnelle Beat-to-Beat-abhängige mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase: Wendt-Gallitelli und Irsenbergs beschrieben mittels Elektronensonden Mikroanalyse von gefrorenen Schweinekardiomyozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten während zytosolischer Ca^{2+} -transienten, mitochondriale Ca^{2+} -Veränderungen. Diese Transienten hatten ihre größte Amplitude etwa 20 ms nach der Spitze des zytosolischen Transienten^[35]. Auch Studien von Lemaster et al konnten eine schnelle mitochondriale Ca^{2+} -Entfernung in mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen nachweisen^[36].

Limitationen ergeben sich allerdings aus der schlechten Trennschärfe von zytosolischem und mitochondrialem Signal. Bei dem derzeitigen Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops ist es kaum möglich, ein rein mitochondriales Signal aufzuzeichnen, insbesondere, da bei diesen

Messungen die Bewegung der Kardiomyozyten nicht durch Kontraktionsinhibitoren vermindert wurde^[31].

Die bereits beschriebenen klassischen Experimente von Bassini et al. liefern allerdings auch Argumente für eine Beat-to-Beat Ca^{2+} -Entfernung^[32]. Die Autoren beobachteten, dass der MCU im regulären Zyklus einer Kontraktion mit nachfolgender Relaxation zu ca. 1% an der Ca^{2+} -Entfernung beteiligt ist^[37].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die langsame mitochondriale Ca^{2+} -Entfernung wie auch eine Beat-to-Beat-abhängige Ca^{2+} -Entfernung nach wie vor kontrovers diskutiert werden. Da beide Bedingungen einander allerdings auch nicht ausschließen, scheint eine Koexistenz dieser Erklärungsansätze ebenso möglich zu sein, wie mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass dieses Phänomen stark speziesabhängig ist.

Die mitochondriale Ca^{2+} -Entfernung ist im Allgemeinen zudem stark von der Lokalisation des einzelnen Mitochondriums abhängig. Demnach sind Mitochondrien in der Nähe von RYR einer wesentlich höheren Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt. Einige Autoren berichten, dass eine pharmakologisch induzierte starke Freisetzung von SR-Ca zu einer schnellen Zunahme von mitochondrialem Ca^{2+} geführt hat und dass diese Zunahme durch die Gabe von Ruthenium Red (MCU Inhibitor) verhindert werden konnte. Diese „Mikrodomänen“ hoher lokaler Ca^{2+} -Konzentration könnten also zu einer Subpopulation von Mitochondrien führen, die Ca^{2+} auf Beat-to-Beat Grundlage internalisieren^[29].

SUBZELLULÄRE Ca^{2+} -MIKRODOMÄNEN

Da Ca^{2+} -Ionen in Kardiomyozyten ubiquitär zu finden sind und dabei nicht nur eine Rolle im Rahmen der Kontraktion sondern unter anderem auch in intrazellulären Signalwegen spielen, ist eine exakte Orchestrierung des Anstiegs und Abfalls des zytosolischen Ca^{2+} nötig. Neben dem Ca^{2+} -Ion selbst verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Komponenten, die die Rahmenbedingungen für lokale Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen schaffen^[38].

T-Tubuli, Couplons und PMCA

T-Tubuli sind Invaginationen der sarkolemmalen Membran und, da sie für die Weiterleitung des Aktionspotentials in das Zellinnere verantwortlich sind, wichtige Strukturen im Rahmen der Kopplung von Zell-Erregung und -Kontraktion. Quantitative Studien der Ultrastruktur der Membran führten zur Erkenntnis, dass T-Tubuli an der so genannten Z-Linie in Intervallen von 2 μm (longitudinale Achse) zu finden sind^[39]. Dabei formen T(ransverse)-Tubuli, wie der Name sagt, ein nahezu im 90° Winkel transversales Netz(Abbildung 6).

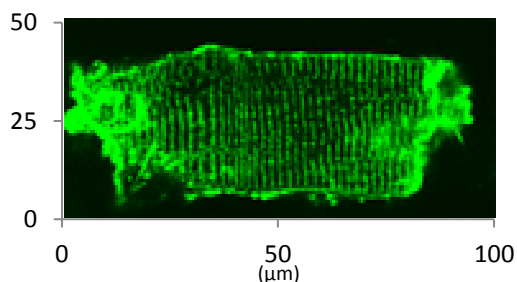


Abbildung 6: T-Tubuli in einem Maus-Kardiomyozyten. Färbung: DiI8-ANEPPS.

Zusammen mit der nicht-tubulären sarkolemmlen Membran ist dieses System mit Ionenkanälen assoziiert, die teilweise für die diastolische Entfernung von Ca^{2+} während der Systole verantwortlich sind. Als wichtigste Kanäle sind hier PMCA und NCX zu nennen.

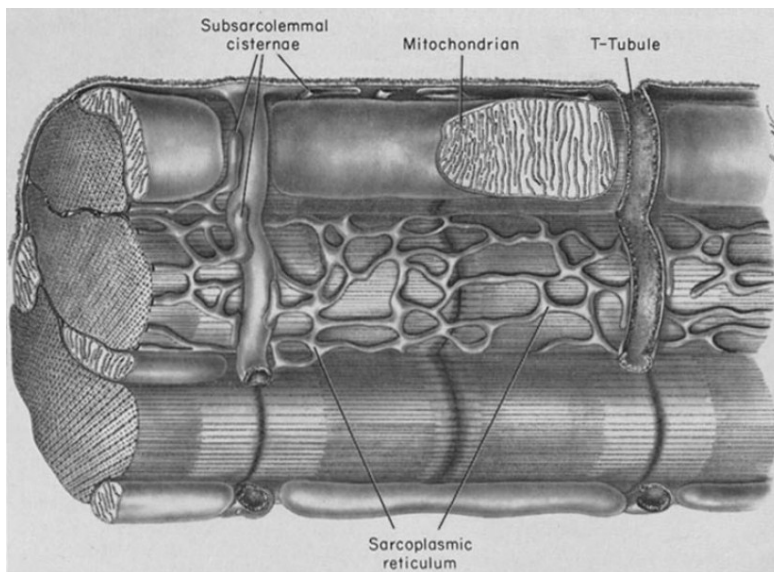


Abbildung 7: Ausschnitt aus einem kardialen Myozyten: T-Tubuli stehen in engem Kontakt mit Sarkoplasmatischem Retikulum und Teilen der Mitochondrienpopulation^[40].

Die Verbindung des transversalen Teils des Sarkoplasmatischen Retikulums und eines T-Tubulus wird als Diade bezeichnet (Abbildung 7). Dieses Gebilde enthält eine hohe Zahl an sarkolemmlen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (DHPR), die durch den langsamen Einstrom von Ca^{2+} die Gesamtöffnungswahrscheinlichkeit von sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Kanälen bzw. Ryanodinrezeptoren (RYR) erhöhen und damit systolisch die initial höchste lokale Ca^{2+} -Konzentration aufweisen^[8]. 75 % aller Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran befinden sich in den T-Tubuli, während 33 % des Sarkolems T-Tubuläre Membran ist^[41]. Im Gegensatz zur engen Verbindung zwischen RYR und DHPR in Couplon-Strukturen sind T-Tubuläre NCX nur in geringem Maße mit Na^+ oder RYR Kanälen assoziiert und dabei relativ homogen verteilt^[21].

T-Tubuli bilden also ein sehr ausgeprägtes Netzwerk, das aufgrund seiner Komplexität eine diffusionsbedingte Verzögerung der Fortleitung von veränderten $[\text{Na}^+]_o$ oder $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in das Zellinnere wahrscheinlich macht. Laut aktueller Literatur kann es mehr als 500 ms dauern bis Änderungen des $[\text{Na}^+]_o$ oder $[\text{Ca}^{2+}]_o$ in den Bereich innerster T-Tubuli übertragen werden^[12].

Sarkoplasmatisches Retikulum und SERCA

Das SR stellt den größten Ca^{2+} -Speicher des Kardiomyozyten dar. Es bildet (1) einen transversalen Teil der mit dem sarkolemmlen T-Tubulären System verbunden ist und hier Diaden formt. (2) Longitudinale Tubuli, die vor allem die Myofibrillen umgeben. (3) Seitliche Zisternen, welche das longitudinale SR in seiner Ausdehnung auch ohne Verbindung zur sarkolemmlen Membran erweitern.

Das junktionale, transversale SR (1) enthält RYR, welche für die systolische Ca^{2+} -Freisetzung quantitativ von großer Bedeutung sind. Sie erscheinen dabei in Couplons als tetramere „Fuß“-ähnliche Strukturen, an denen das SR in nächster Nachbarschaft zu DHPR-reichen T-Tubuli liegt^[42].

Longitudinale Tubuli (2), wie auch laterale (3) und subsarkolemmale Zisternen enthalten außerdem die SERCA. In lateralen Zysternen (3) kann eine hohe Dichte an Ca^{2+} affinen Proteinen wie Calsequestrin beobachtet werden. Diese Moleküle sind vor allem für die hohe Ca^{2+} -spezifische Speicherkapazität und Pufferung verantwortlich und beeinflussen die lokale Ca^{2+} -Konzentration unterschiedlich stark^[43].

Mitochondrien und Nuklei

Mitochondrien finden sich relativ regelmäßig im Zytoplasma verteilt, mit Anhäufungen im Bereich der Myofibrillen und in enger Verbindung mit dem SR (Abbildung 8). Insgesamt betrachtet nehmen diese Zellorganellen bis zu 30% des gesamten Zellvolumens ein^[31].

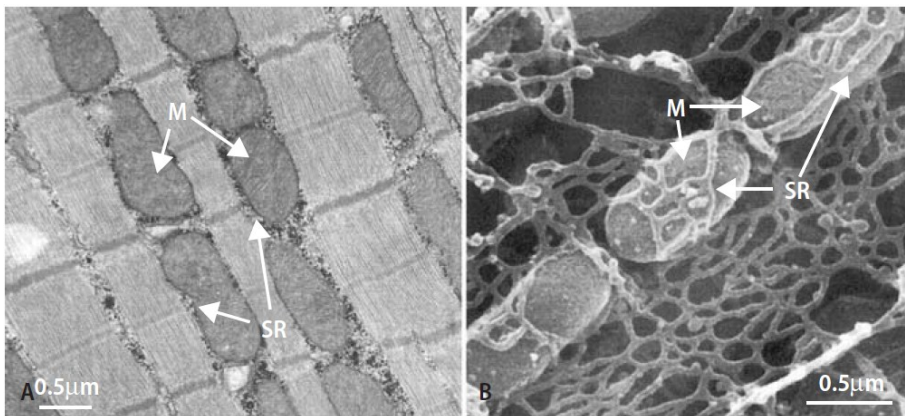


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Herzmuskelzelle. M Mitochondrien, SR Sarkoplasmatisches Retikulum. Mitochondrien stehen in engem Kontakt mit dem SR und Myofibrillen^[44, 45].

Insbesondere die SR-nahen Mitochondrien sind bereits früh in der Systole einer hohen Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt und können die Ca^{2+} -Rückaufnahme lokal signifikant beeinflussen. Es findet sich daher eine große Heterogenität in der Mitochondrienpopulation bzgl. des Anteils an der Ca^{2+} -Entfernung. In einigen Zelltypen stellen diese Organellen dabei eine Art „Firewall“ dar und finden sich präferentiell in der Nähe des Zellkerns: Sie sind in der Lage große Ca^{2+} -Mengen zu puffern. Erst ein globaler Ca^{2+} -Anstieg der diese Schwelle überschreitet, vermag die intranukleäre Ca^{2+} -Konzentration und somit Genexpression zu verändern. Nuklei stellen daher vor allem im Rahmen der Signalweiterleitung eine Mikrodomäne dar^[38].

PHYSIOLOGISCHE MODULATION DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -HOMÖOSTASE

Eine Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ist von eminenter Wichtigkeit, um die kardiale Auswurfleistung unter verschiedensten Bedingungen zu gewährleisten.

So vermag das sympathische Nervensystem beispielsweise die Herzkraft (Inotropie) und die Relaxationsfähigkeit (Lusitropie) über Ca^{2+} -Veränderungen zu beeinflussen.

Die Gabe von beta-adrenergen oder vergleichbaren Substanzen führt zu einer Vergrößerung der Zell- und damit Herzkontraktion, einer Zunahme der Amplitude des systolischen zytosolischen Ca^{2+} und eine Beschleunigung der Relaxation durch raschere zytosolische Ca^{2+} -Entfernung. Hierbei handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Mechanismus der zum Anstieg des intrazellulären cAMPs und damit zu einer Änderung der Phosphorylierung von SERCA und RYR führt. Dies hat

unter anderem eine Erhöhung der RYR-Öffnungswahrscheinlichkeit und eine Verstärkung der SERCA-Funktion zur Folge.

Ein weiterer Mechanismus der physiologischen Ca^{2+} -Veränderungen im Zytosol ist die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Proteinkinase (CaMKII): Die Aktivität der CaMKII wird durch Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie sie auch während normaler Herzzyklen frequenzabhängig von statten gehen, moduliert. Diese Kinase arbeitet dabei nur in Gegenwart von Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexen und kann den Zustand der SERCA, des RYR und des DHPR verändern.

Des Weiteren führt eine gesteigerte Herzfrequenz im physiologischen Bereich zu einer Zunahme der Herzkraft^[46]. Auch bei der Vermittlung dieser frequenzabhängigen Inotropie ist die CaMKII in der Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms pro Zeit von ursächlicher Bedeutung.^[12]

VERÄNDERUNGEN DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -FREISETZUNG BEI HERZINSUFFIZIENZ

Allen Formen der Herzinsuffizienz ist eine mehr oder weniger ausgeprägte kontraktile Dysfunktion, häufig einhergehend mit einer ausgeprägten Arrhythmie neigung gemein. Ersteres führt beim Patienten zu einer verringerten Auswurfleistung des Muskels und geht mit massiven subzellulären Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase einher. Man spricht in diesem Zusammenhang von „Remodelling“^[47].

Untersucht wurden im wesentlichen Tiermodelle in fortgeschrittenen Stadien des kardialen Remodellings und der Herzinsuffizienz, sowie terminal insuffiziente Herzen.

Charakteristische zelluläre Veränderungen im menschlichen Gewebe wurden von Beuckelmann et al. und Piacento III et al. beschrieben. Demnach ist die akute Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR reduziert, das diastolische zytosolische Ca^{2+} auf Grund von „fehlphosphorylierten“ Ryanodinrezeptoren erhöht und die vorherrschende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Folge quantitativ nicht mehr ausreichend zur vollen Aktivierung der Myofilamente. Die Abnahme des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Diastole ist ebenfalls signifikant langsamer^[48-50].

In Tiermodellen der kardialen Dysfunktion zeigte sich als pathophysiologische Grundlage eine Reduktion der RYR-Expression und RYR-Funktion. Auf mRNA-Ebene fanden Forschungsgruppen eine verminderte Expression bei ischämischer Kardiomyopathie. Die Bindungsfähigkeit des RYR und seine Funktion als Ca^{2+} -Freisetzungskanal waren ebenfalls verändert. Zudem sind Hyperphosphorylierungen des RYR und Alterationen in der Regulatoruntereinheit FKBP beschrieben. Hierdurch kommt es sowohl aufgrund einer Verschiebung der Ca^{2+} -Sensitivität zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, als auch durch eine funktionelle Entkoppelung der RYR im Couplon zu einem asynchronen „RYR-Gating“^[51].

Letzteres hat zur Folge, dass nicht alle RYR einer bestimmten Region zur selben Zeit Ca^{2+} freisetzen und teilweise auch während der Diastole geöffnet bleiben– eine Tatsache, die zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} und damit einer Veränderung von Kontraktilität und Rhythmus beiträgt.

IP3-Rezeptoren haben in Herzmuskelzellen generell einen geringeren Einfluss auf die Ca^{2+} -Freisetzung. Nichtsdestotrotz findet sich eine relative Zunahme der IP3-Rezeptoren im insuffizienten menschlichen Herzen^[51].

DYSSYNCHRONE Ca^{2+} -FREISETZUNG ALS MECHANISMUS DER KONTRAKTILEN DYSFUNKTION

Eine Verminderung der synchronen Freisetzung von Ca^{2+} ist ein Konzept zur Erklärung pathophysiologischer Mechanismen kardialer Dysfunktion. Zu Grunde liegt hierbei eine inhomogene Freisetzung sarkoplasmatischen Ca^{2+} durch Veränderungen des Aktionspotential, der DHPR, des RYR und der DHPR-RYR-Interaktion.

Diverse Tiermodelle liefern Evidenz für eine ursächliche Involvierung des T-Tubulären Netzwerks. So finden sich in Arealen später Ca^{2+} -Freisetzung signifikant weniger T-Tubuli. In Modellen des myokardialen Remodellings findet sich eine lokale Veränderung der T-Tubulus-Dichte^[10].

ZIELE DER STUDIE

In Analogie zur beschriebenen Dyssynchronität in der Ca^{2+} -Freisetzung, könnten auch bei der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung subzelluläre Unterschiede in der Verteilung oder Funktion, der am Ca^{2+} -Transport beteiligten Proteine, zu einer inhomogenen Ca^{2+} -Entfernung führen. Die subzelluläre Verteilung der Kinetik der Ca^{2+} -Entfernung wurde bisher noch nicht untersucht.

HYPOTHESEN

1. Die Kinetik der subzellulären Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol ist nicht in allen Regionen des Zytosols homogen.
2. Sarkolemmale oder sarkoplasmatische Transportmechanismen tragen zu subzellulären Unterschieden in der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung bei.
3. Mitochondriale Ca^{2+} -Entfernung über den MCU trägt zu subzellulären Unterschieden in der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung bei.
4. Myokardiale Dysfunktion ist mit einer erhöhten Dyssynchronität der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung verbunden.

MATERIAL UND METHODEN

TIERMODELL

Alle Tiere wurden in Einvernehmen mit den internationalen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren betreut („Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals“ des National Institute of Health, U.S.A.).

WILDTYPE-MAUS

Zur Beurteilung der subzellulären Kinetik der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung wurden zunächst Kardiomyozyten aus dem linken Ventrikel männlicher und weiblicher junger Mäuse (Mauslinie FVB/N, Alter 11 – 20 Wochen) untersucht.

HETEROZYGOTE NCX KNOCK-OUT MAUS

Um den Einfluß des NCX auf subzelluläre Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol zu untersuchen, wurde linksventrikuläre Kardiomyozyten von heterozygoten NCX knockout Mäusen ($\text{NCX}^{+/-}$, Alter: 16 Wochen) gewonnen und mit Kardiomyozyten gleich alter Wildtyp-Mäuse (WT), mit ähnlichem genetischen Hintergrund, verglichen. Das verwendete transgene heterozygote NCX-Knockout-Mausmodell wurde erstmals von Nguidjoe et al. beschrieben^[52]. Die Tiere wurden von Prof. A. Herchuelz der Universität Brüssel, Belgien zur Verfügung gestellt.

Patch-Clamp Experimente von Antoons et al. (Leuven; unveröffentlichte Daten) zeigten eine Reduktion des Ca^{2+} -Ein- bzw. Ausstroms durch den NCX um 40 % bei $\text{NCX}^{+/-}$ Mäusen im Vergleich mit WT-Tieren.

CHRONISCHE REGIONALE MYOKARDIALE ISCHÄMIE IM SCHWEIN

Als Modell der kardialen Dysfunktion verwendeten wir ein Tiermodell der regionalen Myokardischämie im Schwein (MI-Schwein)^[53]. Die in der vorliegenden Studie durchgeführten Messungen beruhen auf der post-hoc Analyse von aufgezeichneten Ca^{2+} -Transienten, die bereits in Hinblick auf die subzellulären Mechanismen der Ca^{2+} -Freisetzung von Heinzel et al. untersucht wurden^[54].

Für die erwähnte vorausgehende Studie wurde bei jungen Hausschweinen (N=15 Kontroll-Schweine; N=13 MI-Schweine) durch Implantation eines Stents eine Koronarstenose und chronische Ischämie im abhängigen Myokardareal induziert. Zur Instrumentierung wurden die Tiere zunächst mit Tiletamin und Zolazepam (4 mg/kg IM und Xylazasin 0.25 mg/kg IM) prämediziert. Die Betäubung wurde mit Propofol i.v. 7 mg/kg/Stunde aufrechterhalten. Die Schweine wurden intubiert und mit 1:1 Sauerstoff/Luft-Mischung beatmet. Ein Kupfer beschichteter Stent wurde in den Ramus Circumflexus der linken Koronararterie (LCX) junger Hausschweine (20-25 kg) implantiert, um so eine Intimaproliferation und nicht-thrombotische Koronarstenose zu erzeugen. Am Tag vor der Stentimplantation erhielten die Tiere 600 mg Acetylsalicylsäure (ASS) und 300 mg Clopidogrel als „Loading dose“; die darauf folgenden Tage erhielten sie 300 mg ASS und 75 mg Clopidogrel täglich bis zur Organentnahme 4-6 Wochen nach Stent-Implantation^[54].

Der Stenosegrad wurde vor Organentnahme im Finalversuch quantitativ mittels Koronarangiographie als minimaler luminaler Stentdurchmesser ermittelt. Eine Echokardiographie

wurde vor, sowie drei und sechs Wochen nach Stentimplanation durchgeführt. Die regionale kontraktile Funktion der basalen inferolateralen Wand des linken Ventrikels (LV) wurde unter Baseline- und Dobutamin-Stress (5-20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) untersucht, um gesunde, vitale chronisch ischämische und infarzierte Myokardareale zu identifizieren^[53, 54].

Einige der Tiere wurden mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht, um sowohl die globale als auch die regionale linksventrikuläre Funktion und das Ausmaß der myokardialen Nekrose zu evaluieren. Die MRT-Aufnahmen wurden in einer Serie der den linken Ventrikel abdeckenden kurzen Achse sowie in der horizontalen und vertikalen langen Achse erstellt. Hierbei akquirierten wir Daten in Ruhe und unter niedrig (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) bzw. hoch (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) dosierter Dobutamininfusion. Die epi- und endokardialen Ränder wurden in der späten Diastole und Systole in der kurzen Achse mittels selbsterstellter Software (CardioViewer, Katholische Universität Leuven, Belgien) konturiert. Das enddiastolische und endsystolische Volumen sowie die linksventrikuläre Masse wurden berechnet. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und die regionale systolische radiale Belastung, d.h. die Dicke der Wand wurden gemessen.

Zur Verbesserung des Kontrastes wurden 0.1 mmol/kg Gadolinium diethylenetriamine-pentaacid (Gd-DTPA) 10-15 min vor der Aufnahme verabreicht. Die myokardiale Infarzierung wurde als Fraktion der gesamten linksventrikulären Masse mit verzögertem Enhancement quantifiziert. Des Weiteren wurden die regionale Myokardfunktion in den Infarktarealen, sowie in den anliegenden Segmenten des Circumflexa-Versorgungsgebietes (Infarkt-nah) und distaler Bereiche/analoge Segmente in Kontrolltieren quantifiziert^[54].

Zum Zeitpunkt der Organentnahme (47 ± 1 Tage nach Stentimplantation) hatten Schweine mit Myokardinfarkt (MI, N=13) ein Gewicht von 51 ± 2 kg; Gleich alte, gesunde Schweine dienten als Kontrollgruppe (CTRL, N=15, Gewicht 55 ± 4 kg).

Im MI-Schwein zeigte sich in diesem Tiermodell unter anderem eine signifikant reduzierte globale EF und regionale linksventrikuläre Funktion (Abbildung 9).

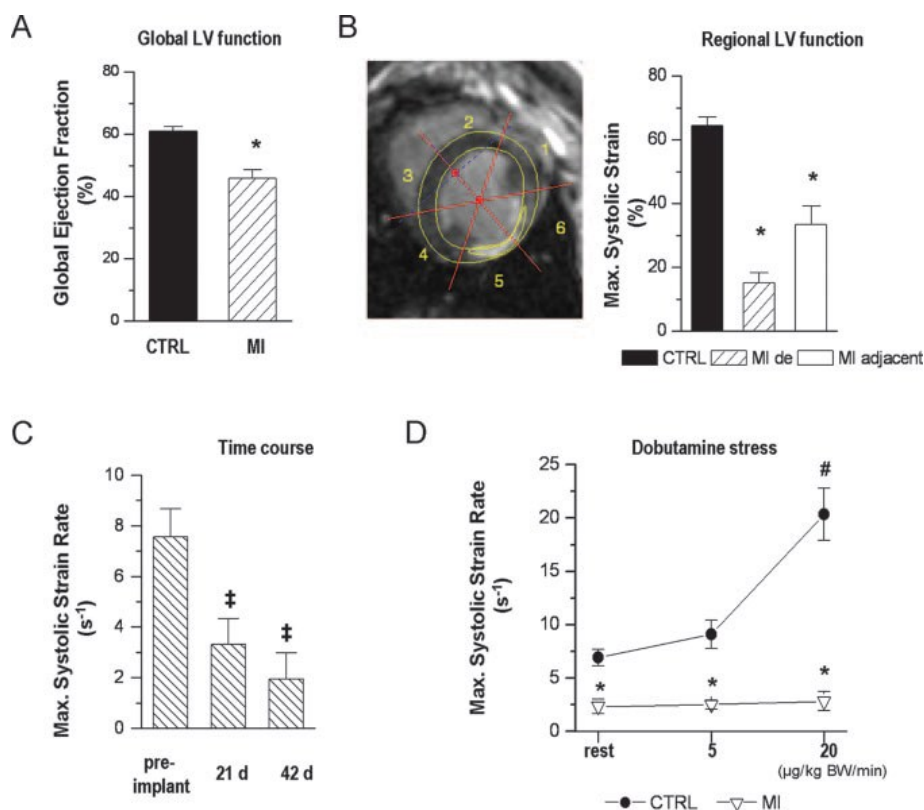


Abbildung 9: In vivo Myokardfunktion im Ischämie-Modell. A. Globale EF im Vergleich von 9 MI- und 7 Kontrolltieren. B. Beispiel MRT-Bild in der kurzen Achse. Endo- bzw. Epikard sowie die verlangsamte Kontrastmittelaufnahme (MI de) sind markiert. Die regionale linksventrikuläre Funktion wurde in MI de und myokardinfarkt-nahen Bereichen (MI adjacent) quantifiziert und mit Kontrolltieren verglichen. C. Maximale systolische Dehnungsrate in der inferolateralen Wand der MI Gruppe vor und nach Stentimplantation sowohl unter Ruhebedingungen (links) als auch unter Dobutamingabe (rechts) ‡p<0,05 vs preimplant, *p<0,05 vs CTRL, #p<0,05 vs rest^[54].

ZELLISOLATION

DISSEKTION UND PRÄPARATION DES HERZGEWEBES

Bei der Maus wurde zunächst eine Kurzanästhesie mit Hilfe von Isofluran vorgenommen. Erst bei fehlender Reaktion auf einen Schmerzreiz an den Extremitäten des Tieres wurde es auf eine Styroporplatte gelegt um, mit einer Pinzette als Widerlager, eine Fraktur der cervikalen Wirbelsäule und eine Durchtrennung des Rückenmarks durchzuführen. Es folgten die Fixierung der Maus auf der Unterlage mit Hilfe von entsprechenden Nadeln und Eröffnung des Abdomens mittels eines, von subcostal medial nach lateral, durchgeführten Schnitts. Nach vorsichtiger Eröffnung des Thorax durch eine Durchtrennung des Zwerchfells von distal, Erweiterung der thorakalen Schnittführung Richtung lateral rechts und links oben und Fixierung des nun nach kranial aufklappbaren Thorax.

Durch diese Schritte wurde die Sicht auf das Herz frei. Anschließend Fassen des Herzens mit einer anatomischen Pinzette an den großen Gefäßen unmittelbar am Abgang derselben und Herauslösen mittels Schere aus dem Thorax. Das Organ wurde letztlich vom hinteren Mediastinum und Lungenresten befreit und in ein gekühltes Becherglas mit Kannülierungslösung (s. u.) gegeben^[55].

In der vorausgegangenen Studie am Schwein: Alle Tiere wurden unter voller Anästhesie mit Propofol i.v. 7 mg/kg/Stunde bei Prämedikation mit Tiletamin und Zolazepam, 4 mg/kg IM und Xylazasin 0.25 mg/kg IM intubiert und beatmet. Zur Sacrifizierung wurde den Tieren ein Pentobarbitalbolus (100 mg/kg i.v.) verabreicht. Das Herz wurde nach der Eröffnung des Thorax entnommen und in kalte Kannülierungslösung gegeben

KANÜLIERUNG DES HERZENS UND PERFUSION AM LANGENDORFF-SYSTEM

Maus: Das Organ wurde nach Entnahme aus der ersten Kanülierungslösung direkt in eine Petrischale mit der gleichen Lösung überführt. Dort wurde die Aorta, unter Zuhilfenahme eines Mikroskops, mit Splitterpinzetten gefasst und über eine Kanüle gebracht. Hierbei war auf die korrekte Lage der Kanüle vor der Aortenklappe und Fixierung derselben mittels Nahtmaterial zu achten. Dies machte die Perfusion der Koronararterien mit eigenen extrazellulären Lösungen und damit eine Erhaltung vitalen Herzgewebes möglich. Die Kanüle inklusive des daran befestigten Herzens wurde schließlich entfernt und am Langendorff-System angeschlossen^[55].

Dieses System dient der Gewinnung von Einzelkardiomyozyten aus dem Herzgewebeverbund. Zu diesem Zweck wurde das Organ möglichst Luftblasenfrei über die Kanüle am Langendorff-Apparat angeschlossen und zur Gänze über die Koronararterien mit Perfusionslösung (s. u.) versorgt. Das komplette System wurde, ohne direkten Kontakt zum Herzen, von beheizter Flüssigkeit umspült und bestand aus einer Haupt- und zwei Nebenkammern. In den Nebenkammern befand sich eine zusätzliche Sauerstoffversorgung, um die Flüssigkeit mit O₂ anzureichern, sowie Ca²⁺ freie Lösung bzw. Enzymlösung^[55].

In einem ersten Schritt wurde das Herz für 90 Sekunden mit Ca²⁺-freier Lösung perfundiert, gefolgt von sechs Minuten enzymatischem Verdau mittels Enzymlösung (s.u.). Je nach Aktivität der enthaltenden Kollagenase kam es nach wenigen Minuten zu ersten sichtbaren Veränderungen (Anschwellens und Abblässens des Gewebes,). Nach 7-10 min wurde die Perfusion beendet und das linksventrikuläre Gewebe von den Vorhöfen gesondert für 10 Minuten in ein Gefäß mit 0,125 mM [Ca²⁺] Tyrode-Lösung (s. u.) gegeben. Dort wurde es mittels verschieden-lumiger Transferpipetten in kleinere Stücke zerteilt. Nach Filterung durch ein engmaschiges Netz (Porengröße 300 µm), wurde schließlich eine Suspension von Kardiomyozyten gewonnen. Bei gutem Isolationserfolg kam es schnell zur Pelletierung der isolierten Kardiomyozyten^[55].

Ziel des folgenden Schrittes war es, diese Zellen in eine Lösung mit 1 mM [Ca²⁺] zu überführen. Hierzu wurde die Calcium-Konzentration in der Suspension jeweils für 10 Minuten in 0,25 mM bzw. 0,5 mM [Ca²⁺] Tyrode eingebracht. Zuletzt wird auch die 0,5 mM [Ca²⁺] Tyrode-Lösung dekantiert und das Pellet mit 1 mM Tyrode-Lösung (s.u.) resuspendiert.

Im Durchschnitt fand sich nach mikroskopischer Kontrolle der in Tyrode-Lösung gelösten Zellen eine Viabilität von ca. 25 %.

Bei Schweineherzen erfolgte die Perfusion des abhängigen Myokardareals über die LCX distal der Stenose. „Das in diesem Versorgungsgebiet befindliche Myokard wurde schließlich mit Ca²⁺freier Tyrode und Kollagenase-haltiger Lösung perfundiert. Nach dem Verdau des Gewebes wurden das demarkierte Infarkareal und 5-10 mm des umgebenden Gewebes verworfen. Midmyokardiales Gewebe des verbleibenden verdauten Myokards wurde in Tyrode-Lösung gegeben und

Kardiomyozyten durch mechanische Dispersion aus dem Zellverband gelöst. Herzmuskelzellen der Hinterwand gesunder Schweine wurden als Kontrollzellen benutzt.“^[54]

MESSUNG VON ZYTOSOLISCHEM $[Ca^{2+}]$

Zur Quantifizierung der zytosolischen Ca^{2+} -Transienten nutzen wir Fluo4-AM (Invitrogen, Österreich) als Ca^{2+} -Indikator. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein, in der Gegenwart von Ca^{2+} , fluoreszierendes Molekül mit speziellem Excitations- und Emissionsspektrum. Es ist vor allem zytosolisch anzutreffen.

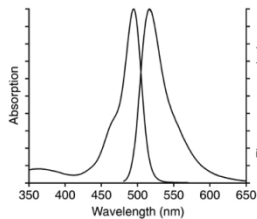


Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektrum von Fluo4-AM^[56].

Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass das Molekül an Acetoxymethylester (AM) gebunden ist und damit eine hohe Lipophilie und Membran-Diffusionsfähigkeit aufweist. AM wird im Zytosol durch unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch Fluo-4 auch nach einem Waschschrift im Zellinneren verbleibt.

Die Kardiomyozyten wurden 30 Minuten mit Fluo4-AM (0.009 mM) beladen und anschließend, als Waschschrift, in Tyrode-Lösung überführt.

Fluo-Farbstoffe reagieren, besonders stark in Anwesenheit von Ca^{2+} und unter Anregung mit einem 488 nm-Laser, mit der Emission von Licht im Wellenlängenbereich von 505 nm (Abbildung 10).

DARSTELLUNG DER T-TUBULÄREN STRUKTUREN

Um eine Qualifizierung des T-Tubulären Signals vornehmen zu können, verwendeten wir Di-8-ANEPPS (Invitrogen, Österreich). Dieser Farbstoff ist wenig anfällig für eine Internalisierung in die Zelle und eignet sich daher besonders gut für die Sichtbarmachung der äußeren Membran und der T-Tubuli bei gleichzeitig hoher Fotostabilität.

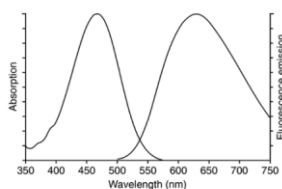


Abbildung 11: Absorptions- und Emissionsspektrum von Di8-ANEPPS^[56].

Die Kardiomyozyten wurden für 20 Minuten mit Di-8-ANEPPS beladen und anschließend für 15 Minuten in Tyrode-Lösung überführt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

Auch hier erfolgte die Anregung des Farbstoffs mittels Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm (Abbildung 11).

SIMULTANE DARSTELLUNG T-TUBULÄRER STRUKTUREN UND DES SUBZELLULÄREN $[Ca^{2+}]$

Aufgrund des breiten Spektralbereichs und der Überlappung mit dem Signal des Fluo-4-AM-Farbstoffs, sind Doppelfärbungen von Di8-ANEPPS und Fluo4-AM nicht möglich.

Daher kam Weat germ agglutinin-Alexa Fluor 594 (WGA-Alexa, Invitrogen, Österreich) als Sarcolemmaler und T-Tubulärer Indikator zum Einsatz. Die Zellen wurden zusätzlich, gemäß des bereits erläuterten Protokolls, mit Fluo4-AM gefärbt.

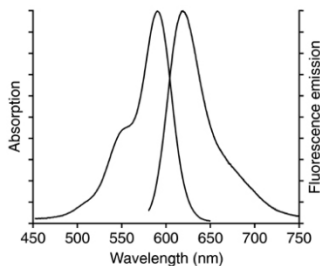


Abbildung 12: Absorptions- und Emissionsspektrum von WGA-Alexa^[56].

Bedingt durch den Unterschied der Spektren besteht die Möglichkeit lebende Zellen mit beiden Farbstoffen simultan zu färben und beide Signale gleichzeitig, unbeeinflusst und unabhängig voneinander zu messen.

Die Kardiomyozyten wurden für 30 Minuten mit WGA-Alexa und für 30 Minuten mit Fluo4-AM beladen und anschließend für 15 Minuten in Tyrode-Lösung überführt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

Das Anregungsmaximum von WGA-Alexa liegt bei 590 nm, das Exzitationsmaximum bei 617 nm.

DARSTELLUNG DER MITOCHONDRIEN

Zur Visualisierung der Mitochondrien nutzen wir Mitotracker Red FM. Dieser Fluoreszenzfarbstoff diffundiert passiv in die Zelle und färbt Mitochondrien, aufgrund seines thiol-reaktiven Chloromethylanteils, selektiv an.

Für Kolokalisationsstudien mitochondrialer Strukturen und intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen verwendeten wir Mitotracker Red FM in einer Kombination mit Fluo4-AM. Die Kardiomyozyten wurden für 30 Minuten mit Fluo4-AM (0.009 mM) und Mitotracker Red FM (25nM) beladen und anschließend 15 Minuten in Tyrode-Lösung belassen (Waschschritt).

Beide Farbstoffe werden in etwa im selben Wellenlängenbereich angeregt, weisen aber deutlich unterschiedliche Emissionsspektren auf. Dies macht eine synchrone Messung der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale möglich. Die maximale Exzitation des Mitotracker Red FM Farbstoffs liegt im Bereich von 543 nm, die höchste Emission bei 644 nm.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Farbstoffe.

Farbstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration	Hersteller
Fluo 4-AM	1096.95	9 μ M	Invitrogen, F14201
WGA-Alexa	38000	5 μ g/ml	Invitrogen, W11263
Di8-ANEPPS	592.88	10 μ M	Invitrogen, D3167
Mitotracker Red FM	724	25nM	Invitrogen, M22425

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Farbstoffe.

LÖSUNGEN

Tyrode-Lösung (NT):

Substanz	Molekulargewicht	Konzentration [mM]	Hersteller
NaCl	58.44	136	Sigma Aldrich 71382
KCl	74.56	5	Merck 1.04933.0500
CaCl ₂	147.02	3	Merck 1.02382.1000
MgCl ₂ *6H ₂ O	203.3	1	Merck 1.05833.1000
HEPES	238.3	10	Sigma Aldrich H3375
Glucose	180.2	10	Merck 1.08337.1000

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung (pH = 7,4).

Vor der Durchführung der Experimente wurde der Lösung zudem Butanedione Monoxime (BDM, 10 mM; Sigma Aldrich) oder der Myosin-II-ATPase Hemmer Blebbistatin (10 μ M; Tocris,) zur Verminderung von Zellkontraktionen während der elektrischen Stimulation zugegeben.

Perfusions-/Isolutionslösung:

Substanz	Molekulargewicht	Konzentration [mM]	Hersteller
NaCl	58.44	136	Sigma Aldrich 71382
KCl	74.56	4	Merck 1.04933.0500
Taurin	125.15	5	Sigma Aldrich T0625
MgCl ₂ *6H ₂ O	203.3	1	Merck 1.05833.1000
HEPES	238.3	10	Sigma Aldrich H3375
Glucose	180.2	10	Merck 1.08337.1000
BDM	101.11	20	Sigma Aldrich B0753

Tabelle 3: Zusammensetzung der Perfusions-Lösung (pH = 7,4).

Enzymlösung:

40 ml Perfusionslösung
4 μ l 0.1 M CaCl ₂
32 mg CLS-2 (Kollagenase) 280 U/mg

Tabelle 4: Zusammensetzung der Enzym-Lösung (pH = 7,4).

Ca²⁺-Reihe:

Zielkonzentration CaCl ₂ [mM]	Perfusionslösung [ml]	CaCl ₂ 0.1 M [μ l]
0.125	8	10
0.25	4	10
0.5	8	40

Tabelle 5: Zusammensetzung der Ca²⁺-Reihe (pH = 7,4).

In einem letzten Schritt wurden die Zellen in Tyrode-Lösung überführt.

KONFOKALE MIKROSKOPIE UND MESSPLATZ

Bei dem verwendeten inversen Mikroskop handelte es sich um ein LSM 510 Beta der Firma Zeiss®. Es besteht aus dem optischen Mikroskop mit elektrischen Detektoren, Laser und Computer.

Im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie arbeitet das LSM mit Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen sowie zwei speziellen Lochblenden. Diese Blenden können in ihrem Durchmesser variiert werden und befinden sich in konjugierten Ebenen zur Objektebene im zu scannenden Präparat^[57].

Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie werden die Fluoreszenzfarbstoffe im Objekt durch einen Laserstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge (Exzitationswellenlänge) in einem sehr begrenzten Bereich in der horizontalen (XY-) Ebene angeregt. Emittierte sekundäre Fluoreszenz aus angeregten Bereichen oberhalb und unterhalb des interessierenden Fokus (Z-Achse) wird zwar ebenfalls über einen dichromatischen Spiegel in Richtung der elektrischen Detektoren gelenkt, zuvor aber durch die konfokale Lochblende des Emissionsweges gefiltert. Die außerhalb des sogenannten „Pinholes“ entstehende Lichtscheibe trägt damit nicht zum Bild bei. Durch Variation der Weite des konfokalen „Pinholes“ lässt sich die Z-Achse des Scans im Sinne einer Erweiterung oder Verkleinerung der Konfokalebene verändern. Das emittierte Signal wird schließlich auf einen Photomultiplier geleitet und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Hierbei entspricht die Stärke des induzierten Stroms der Fluoreszenzamplitude^[57].

Um das Fluoreszenzsignal aus einer größeren Region im Präparat aufzuzeichnen, wird der Anregungslaser über einen galvanometergesteuerten Spiegel entlang der X-Achse und einen weiteren Spiegel entlang der Y-Achse gesteuert. Dadurch können Linien und Flächen innerhalb des Präparats abgetastet werden (Scannen). Das Scannen des Präparats entlang einer einzelnen Linie in der X-Achse wird als „Linescan“ bezeichnet und ermöglicht eine sehr hohe zeitliche Auflösung bei gleichzeitigem Erhalt räumlicher Information. Bei den von uns durchgeführten Messungen betrug die Scanzeit pro Linie 1.5 ms^[57].

Der konfokale Meßplatz verfügte über eine Mehrkanal-Perfusionsanlage zur kontinuierlichen Superfusion der Zellen (37°). Durch eine elektrische Pumpe wurde ein konstanter Fluß der verwendeten Lösungen gewährleistet. Versuche mit dem Farbstoff Fluorescein ergaben einen Zeitraum von weniger als zwei Sekunden bis zum vollständigen Austausch der die Zelle umgebenden Flüssigkeit (Daten nicht gezeigt).

Die Zellsuspension wurde fünf bis zehn Minuten vor Versuchsbeginn in das Bad gegeben und anschließend konstant mit Tyrode-Lösung bzw. je nach Versuchsprotokoll (vgl. Kapitel „Versuchsprotokolle“) mit verschiedenen Substanzen perfundiert. Simultan erfolgte eine Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale mit Hilfe des konfokalen Mikroskops.

MESSUNG DER Ca^{2+} -TRANSIENTEN

Zur Simulierung eines Herzzyklus auf subzellulärer Ebene verwendeten wir eine externe Stimulation bei einer Frequenz von einem Herz.

Die Zelle wurde entlang einer Linie parallel zu ihrer Längsachse gescannt und in einem elektrischen Feld (Platinelektroden im Bad) bei 1 Hz stimuliert. Sobald eine gleichbleibende Amplitude des Ca^{2+} -Transienten erreicht war („Steady-State“), wurde eine Linescan-Aufnahme des Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignals aufgezeichnet (Abbildung 13)

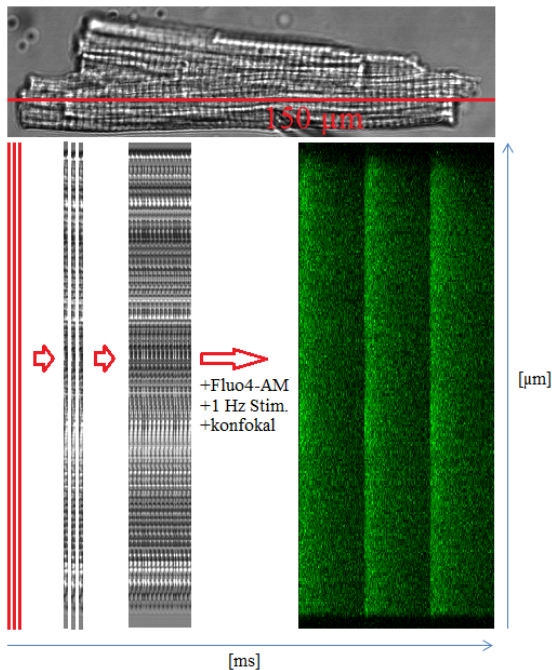


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Mauskardiomyozyten (oben). Die rote Linie steht für den Scanbereich des anschließenden konfokalen Linescans. In elektrisch stimulierten Zellen (1 Hz) lässt sich nach Beladung mit Fluo4-AM ein Fluoreszenzsignal (hier grün dargestellt) entsprechend der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration darstellen.

VERSUCHSPROTOKOLLE

WIRKUNG VON FORMAMID

Zur Untersuchung der subzellulären Dyssynchronität in der Ca^{2+} -Entfernung nutzen wir unter anderem Formamid. Es handelt sich hierbei um ein Amid der Methansäure, das durch seine hygroskopischen Eigenschaften osmotisch aktiv ist. Wie von Kawai et. al 1999 und Brette et al. 2002 beschrieben eignet es sich daher besonders gut zur Induktion eines „osmotischen Schocks“ und damit einer Detubulierung von Zellen.

Das Modell der akuten Detubulierung mittels Formamide in Kardiomyozyten erlaubte den Vergleich von Stellen in der Zelle mit dichtem und homogenem T-tubulärem Netzwerk mit Bereichen funktionell inaktiver T-Tubuli. Dies wurde durch eine Trennung der T-Tubuli vom eigentlichen Sarkolemm durch einen osmotischen Schock erzielt.

Durch Inkubation einer Zellsuspension in einer Formamidhaltigen Lösung wurde die Substanz internalisiert. Zu Beginn des Auswaschens von Methanamid mit Tyrode-Lösung kam es zu einer kurzzeitigen Zunahme des Zelldurchmessers durch die hygroskopische Wirkung von Formamid. Im Rahmen dieses Prozesses wurden sämtliche in der Zelle befindliche T-Tubuli physikalisch von der äußeren sarkolemmalen Membran entkoppelt.

WIRKUNG VON SEA0400

SEA0400 oder 2-[4-[(2,5-difluorphenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyanilin ist ein Anilinderivat, das insbesondere durch seine Eigenschaften als hochpotenter NCX-Inaktivator in der experimentellen Neurologie, Nephrologie und Kardiologie zunehmend eingesetzt wird.

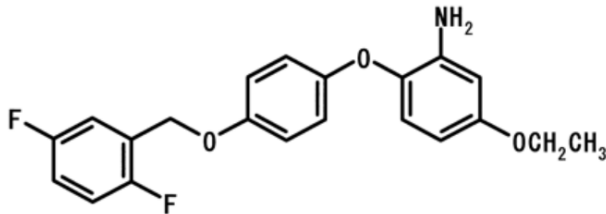


Abbildung 14: Strukturformel von SEA-0400^[58].

Diese neuartige Substanz vermag den NCX im Forward-mode (Ca^{2+} verlässt im Austausch gegen Natrium die Zelle) bei einer Konzentration von $0.3 \mu\text{M}$ zwischen 50 und 60 %, im Reverse-mode gar zu 90% zu hemmen und ist damit der derzeit stärkste und selektivste bekannte NCX-Inhibitor.

Aus elektrophysiologischer Sicht könnte diese Substanz kardialen Arrhythmien vorbeugen, da sie über eine höhere selektive Blockade des die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration anhebenden Reverse-mode wirkt. Diese Beobachtung konnte unter Bedingungen erhöhten Ca^{2+} -Einstroms bereits gemacht werden^[59].

Wie Ozemir et al. allerdings zeigen konnten, führt SEA0400 unter Normalbedingungen zu einem Nettozuwachs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und eignet sich daher eher im experimentellen Setting als für therapeutische Zwecke. Erwähnenswert ist zudem die Tatsache, dass die NCX-Hemmung und damit einhergehende Erhöhung des zytosolischen Ruhe- Ca^{2+} , zu einem indirekten Block des DHPR führt. Zusammen mit einer angenommenen direkten Wirkung der Substanz auf den DHPR führt dies bei einer Konzentration von $0.3 \mu\text{M}$ in Mäusen zu einer Verminderung der DHPR-Aktivität um bis zu 25%^[60].

Die Ca^{2+} -Überladung der Zelle hatte in den Experimenten von Ozdemir et al. eine positiv inotrope Reaktion zur Folge: Mäusemyozyten zeigten eine erhöhte Kontraktionsamplitude bei signifikant längerer Zeit bis zur Relaxation der Zelle^[60].

WIRKUNG VON CPA

Bei Cyclopiazonsäure (CPA) handelt es sich um ein Mykotoxin das in der Natur von verschiedenen Vertretern der Asp. flavus Gruppe und Penicillium spp. synthetisiert wird^[61].

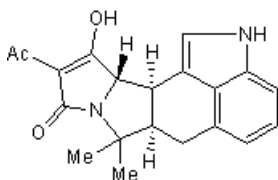


Abbildung 15: Struktur von CPA^[61].

Es führt zu einer selektiven Inhibierung der sarkoplasmatischen Retikulum ATPase und damit zu einer Verlangsamung der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung und Relaxation der Zelle.

WIRKUNG VON FORSKOLIN

Forskolin ist eine zur Gruppe der Diterpene gehörende Substanz die als direkter Stimulator der Adenylatzyklase eine Vielzahl an Zellfunktionen moduliert.

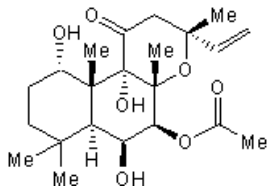


Abbildung 16: Struktur von Forskolin^[62].

Dazu bindet es mit Hilfe hydrophober Wechselwirkungen zwischen der C1 und C2-Domäne an der Adenylatzyklase^[63].

Dies bewirkt eine Erhöhung des zellulären cAMP-Niveaus und damit eine Verstärkung vieler G-Protein-gekoppelter Prozesse (Abbildung 17). Forskolin hat unter anderem einen positiv inotropen Effekt und führt über eine cAMP-Erhöhung zur Modulation der über Proteinkinase A (PKA) gesteuerten Phospholamban-Phosphorylierung und damit der SERCA-Aktivität^[64]. Des Weiteren kommt es zu einer Verstärkung der systolischen SR- Ca^{2+} -Freisetzung über den RYR und eine Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Zusammenfassend führt Forskolin zur Verstärkung der Zellkontraktion, Erhöhung der systolischen Ca^{2+} -Amplitude und Beschleunigung der SR- Ca^{2+} -Entfernung.

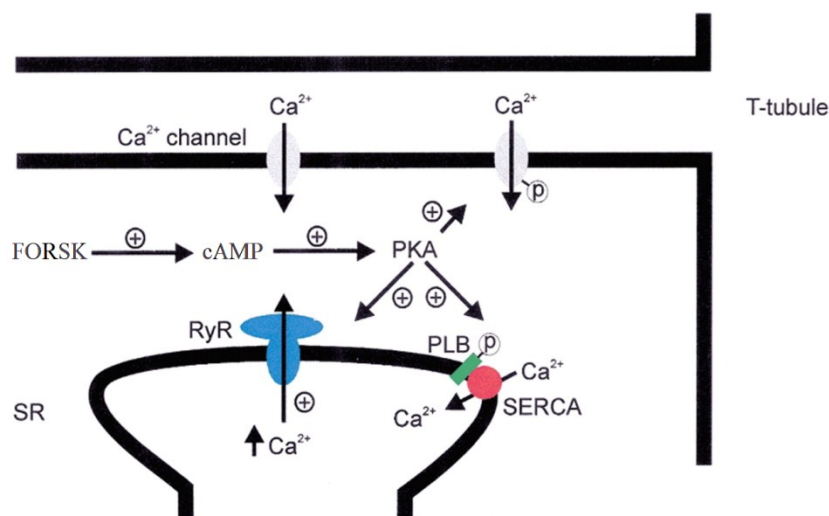


Abbildung 17: Effekte von Forskolin. Die direkte Stimulation der Adenylatzyklase führt zu einer Erhöhung des cAMP, welche wiederum cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA) aktiviert. PKA phosphoryliert diverse Schlüsselproteine wie Toponin I, sarkolemmale Ca^{2+} Kanäle (Ca^{2+} channel), Phospholamban (PLB) und SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanäle (RYR) (Modifiziert nach Santana et al.^[65]).

WIRKUNG VON RU360

Ru360 ist ein selektiver MCU-Inhibitor und als zellpermeable Substanz hochaffin an Mitochondrien bindend ($K_d = 340 \text{ pM}$). Selbst bei hohen Konzentrationen und vollständigem MCU-Block (bei ca. $10 \text{ }\mu\text{M}$ Inkubation über 30min) interagiert Ru360 nicht direkt mit anderen Komponenten des intrazellulären Ca^{2+} -Transports^[66].

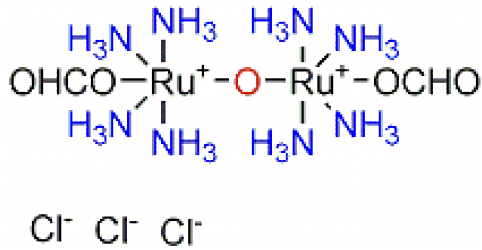


Abbildung 18: Struktur von Ru360^[66].

Die Substanz führte bei Ratten bereits bei zytosolischen Konzentrationen von 10 nM zu einer Verlangsamung der Ca²⁺-Entfernung^[67]. Seguchi et al. fanden positiv inotrope Effekte sowie eine beschleunigte Ca²⁺-Entfernung bei Mäusen bei 5 und 10 µM Ru350-Konzentration^[68].

Ru360-/SEA-/CPA-/FORSKOLIN-PROTOKOLL

Die mit Fluo4-AM beladenen Zellen wurden mit 1 Herz elektrisch stimuliert und die subzelluläre Ca²⁺-Konzentration quantitativ erfasst.

Zur Hemmung des MCU wurde Ru360 in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt^[68]. Die Inhibierung des NCX erfolgte durch 0,3 µM SEA0400^[60]. CPA (5 µM) und Forskolin (10 µM) dienten der Beeinflussung der SR-Ca²⁺-Entfernung.

Dabei kam das in Abbildung 19 dargestellte Protokoll jeweils für die Substanzen Ru360, SEA0400, CPA und Forskolin zum Einsatz.

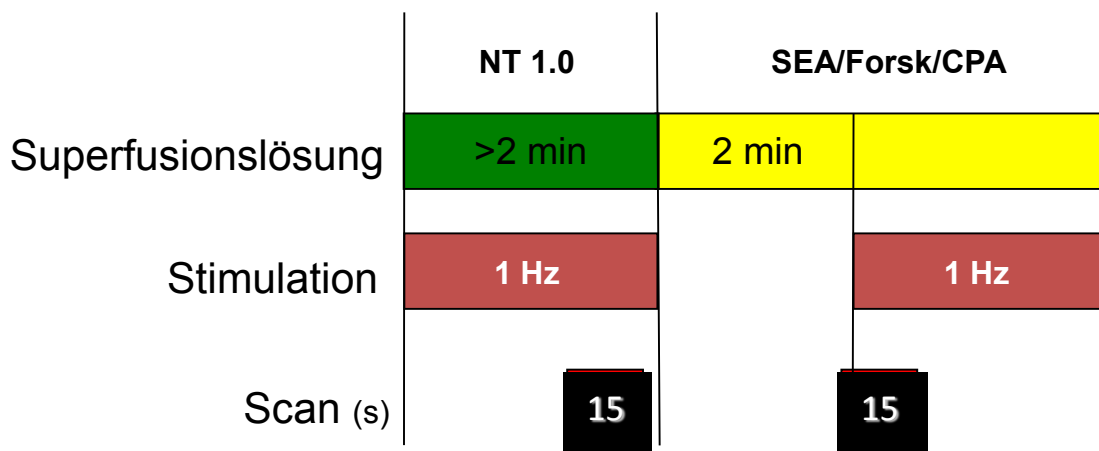


Abbildung 19: Protokoll 2, 3, 4: Nach Perfusion des Zellbades mit Tyrode-Lösung für mindestens zwei Minuten und Erreichen von „Steady-State“-Bedingungen unter 1 Herz elektrischer Stimulation wurde ein 15 sek. Linescan durchgeführt. Dann Umschalten auf eine SEA, Forskolin oder CPA haltige Lösung und erneuter 15 sek. Linescan nach 1:55 min.

Diese Protokolle wurden unter anderem im Rahmen von Experimenten an Wildtyp-Mäusen (SEA-/Forsk-/CPA-Protokoll) und MI-Schweinen (Forsk-Protokoll) durchgeführt.

Die unten dargestellte Abbildung (Abbildung 20) zeigt den Ausschnitt einer Beispielaufnahme unter Kontrollbedingungen und würde somit dem ersten Scan aus Protokoll 2, 3, 4 und dem Scan aus Protokoll 1 entsprechen.

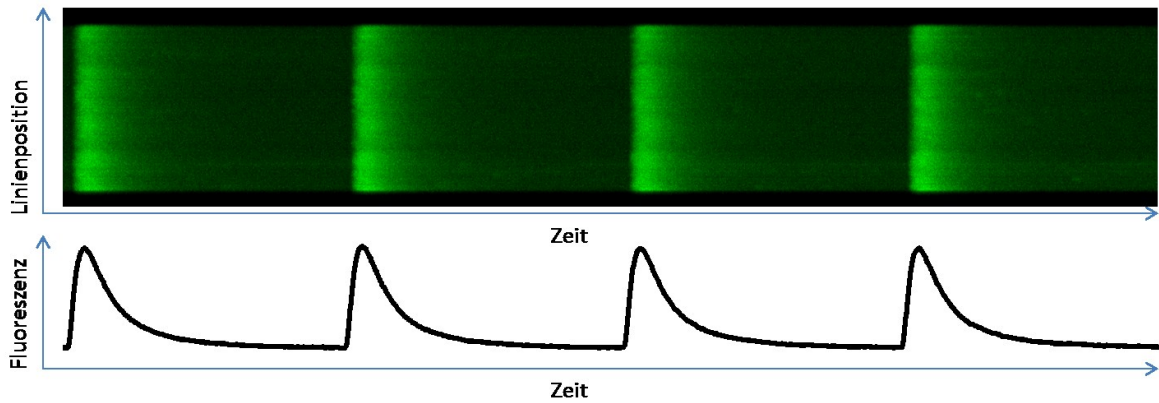


Abbildung 20: Fluo4-AM beladene Beispielzelle im Steady-State Linescan bei 1 Herz-Stimulation. Grün: Fluoreszenz des Ca^{2+} -abhängigen Farbstoffs an verschiedenen Positionen in der Zelle. Die schwarz dargestellten Kurven zeigen das Ausmaß der Reaktion zwischen Farbstoff und Ca^{2+} .

DOPPELFÄRBUNG (MITOTRACKER RED FM UND FLUO4-AM)

Nach der Beladung der Zellen mit beiden Farbstoffen und auswaschen derselben, erfolgte eine synchrone Messung beider Fluoreszenzsignale bei 1 Hz Steate-State Stimulation. Zur Perfusion der Zellen kam, wie beschrieben, Tyrode-Lösung in Verbindung mit Blebbistatin/BDM zur Verhinderung der Zellkontraktion zum Einsatz.

Alle Aufnahmen wurden gemäß dem in Abbildung 21 dargestellten Protokoll durchgeführt.

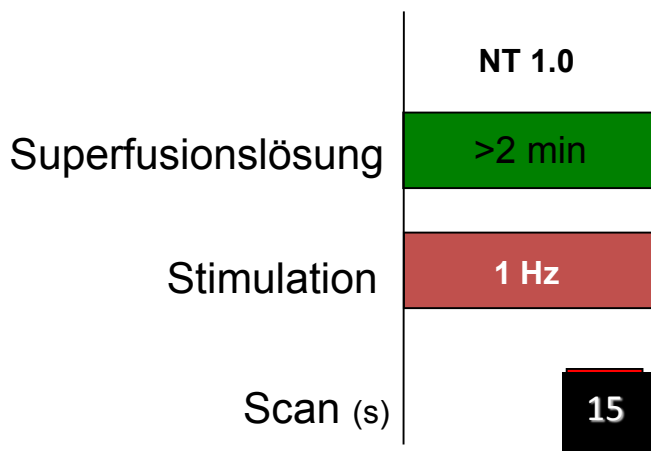


Abbildung 21: Protokoll 1: Perfusion des Zellbades mit Tyrode-Lösung und 15 sek. Linescan.

Die unten stehende Abbildung 22 zeigt eine Beispielaufnahme dieser Doppelfärbung.

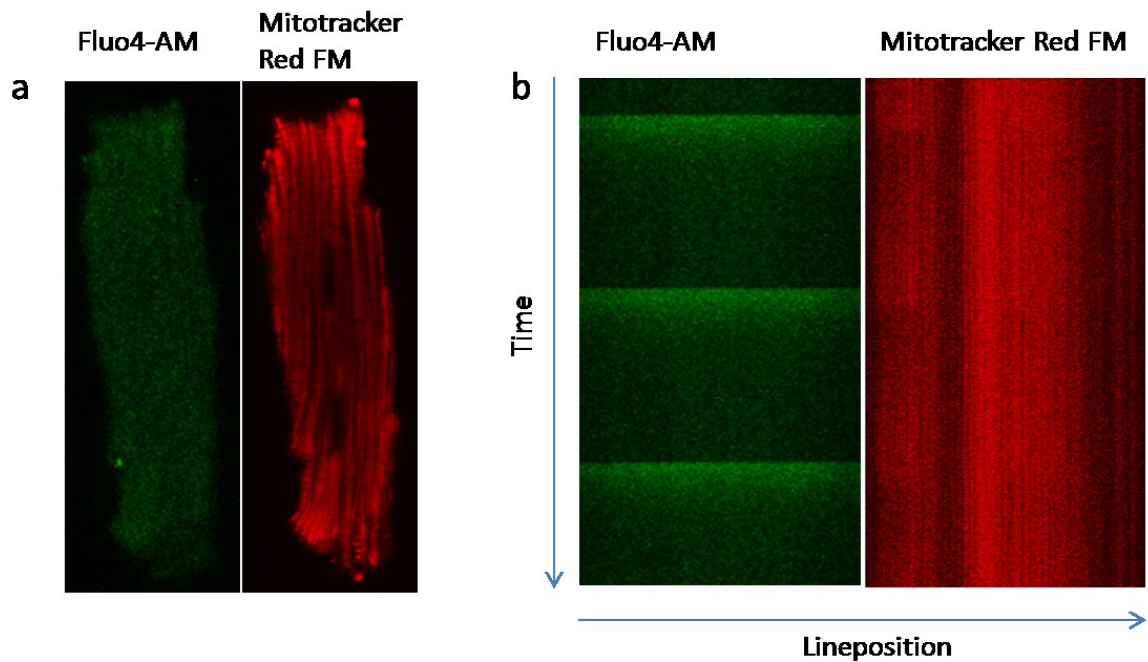


Abbildung 22: Konfokale Aufnahme einer Beispielszelle mit Mitotracker Red FM und Fluo4-AM Doppelfärbung. a) Konfokales Bild einer Gesamtzelle. b) Beispiel eines Linescans nach Doppelfärbung und Registrierung beider Fluoreszenzsignale im 1 Hz Steady-State Linescan.

DETUBULIERUNG

Wie von Brette und Orchardre 2002 beschrieben, wurde die Detubulierung durch einen osmotischen Schock induziert: Die Kardiomyozyten wurden dazu in einer Lösung mit 113.0 NaCl, 5.0 KCl, 1.0 MgSO₄, 1.0 CaCl₂, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 Natriumazetat, 10.0 Glukose, 10.0 HEPES, and 5.0 U/l Insulin, pH 7.4 gebadet.

Zur Induktion der Disruption der T-Tubuli badeten wir die Zellen in dieser Lösung plus Formamid (1,5 mM) für 15 Minuten und überführten sie schließlich in eine Kontrolllösung (Tyrode-Lösung)^[41]. Nach Verifizierung einer erfolgreichen Detubulierung (Abbildung 23) mittels des T-Tubulären Fluoreszenzmarkers WGA-Alexa 594 erfolgte die Messung des subzellulären Ca²⁺-Signals (Fluo4-AM) unter den oben beschriebenen Bedingungen.

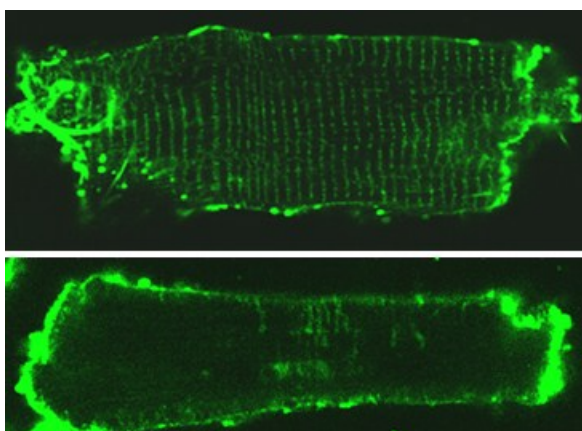


Abbildung 23: Kontrollmauskardiomyozyten in T-Tubuli spezifischer Fluoreszenzfärbung, vor (oben) und nach (unten) Formamid-induzierter Detubulierung. Farbstoff: Di-8-ANEPPS.

WILDTYP-/NCX-KNOCKOUT-MAUS UND WILDTYP-/INFARKT-SCHWEIN: SUBZELLULÄRE Ca^{2+} -MESSUNG

Alle Aufnahmen wurden gemäß folgendem Protokoll durchgeführt (Abbildung 24).

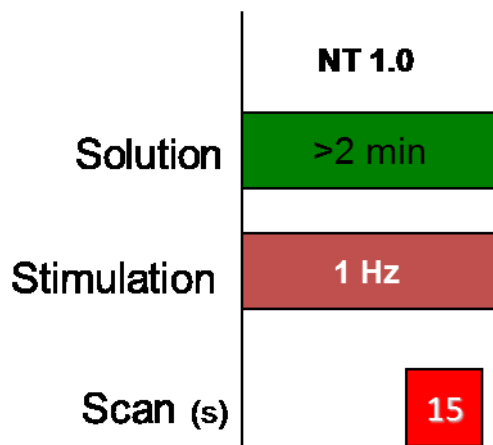


Abbildung 24: Unter Perfusion des Zellbades mit Tyrode-Lösung für mindestens zwei Minuten wurde ein 15 sek. „Steady-State“-Linescan unter 1 Hz elektrischer Stimulation durchgeführt.

ANALYSE DER Ca^{2+} -TRANSIENTEN

PRINZIP

Das Fluoreszenzsignal über die Zeit wurde aufgezeichnet und mittels eigens in IDL programmierter Software (Liscana, F. Heinzel) analysiert. Zur Visualisierung des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs und – Abfalls verwendeten wir den gemittelten Transienten aus fünf Einzelschlägen. Zur Normalisierung der Transienten wurde für jeden Punkt auf der Linie ein mittlerer enddiastolischer Wert aus den 30 ms vor dem Stimulus berechnet (=minimale Fluoreszenz, F_0). Alle an diesem Punkt über die Scanzeit gemessenen Fluoreszenzwerte wurden dann durch F_0 geteilt (F/F_0).

PARAMETER DER ANALYSE: τ , CV_{τ} , $TF50$, F_{PEAK} , $TR50$, $TR90$

Zur Analyse der Ca^{2+} -Entfernung in Herzmuskelzellen und möglicher Zusammenhänge zu Amplitude oder Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} erhoben wir folgende Parameter:

Die Zeitkonstante **Tau** bei monoexponentieller Anpassung des Ca^{2+} -Abfalls diene uns als Marker für die Kinetik der subzellulären Ca^{2+} -Entfernung. Diese Konstante gibt den Zeitraum eines monoexponentiell absinkenden Prozesses auf $1/e$ (ca. 36,8 %) an. Des Weiteren bestimmten wir für jede Linienposition die Zeit bis zum Halbmaximum der Amplitude (**TF50**) sowie das Maximum der Amplitude (**F_{peak}**). Die Zeit bis zu 50 % Abfall des F_{peak} wurde als **TR50**, die Zeit bis 90 % Abfall als **TR90** bezeichnet (Abbildung 25).

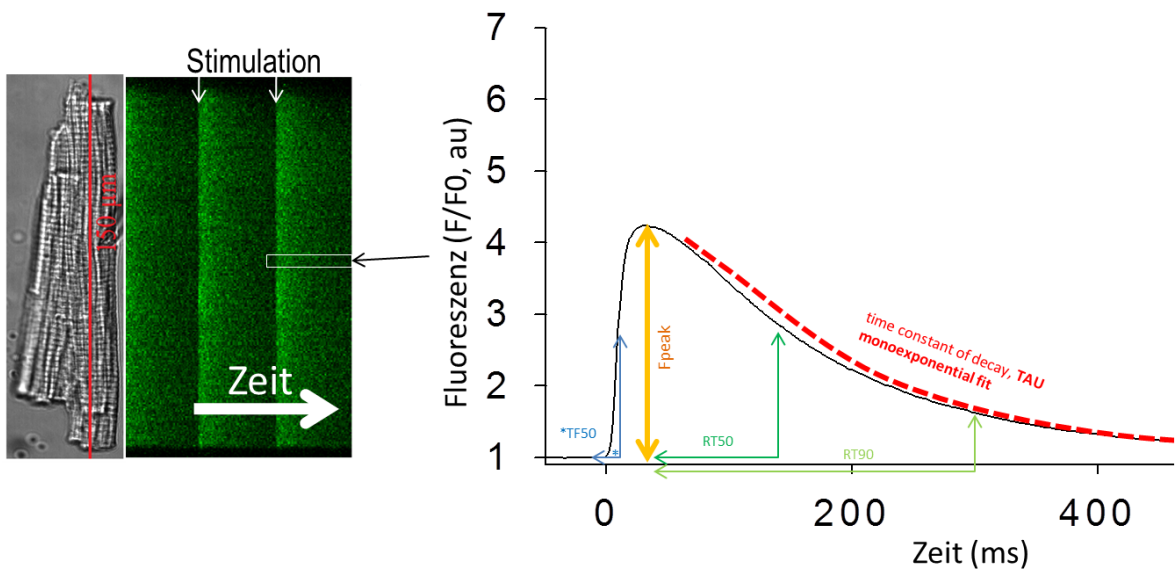


Abbildung 25: Diagramm eines lokalen Ca^{2+} -Transients mit der Zeitkonstanten Tau bei monoexponentieller Anpassung (rote Linie), beginnend 10 % nach der maximalen Amplitude. Das Maximum der Fluoreszenz (F_{peak}) und die Zeit bis zum Halbmaximum der Fluoreszenz (TF50) sind Gelb bzw. Blau dargestellt. Die Zeit bis 50 bzw. 90 % nach dem Maximum der Fluoreszenz wurden als RT50 (grün) bzw. RT90 (hellgrün) definiert.

Ein hoher Tau-Wert ist damit gleichbedeutend mit einer langsamen Ca^{2+} -Entfernung, ein niedriger Tau-Wert mit einer schnellen Ca^{2+} -Entfernung. Dieser Wert wurde dabei für jede Linienposition und damit für jeden lokalen Transienten bestimmt. Wir berechneten hierfür einen gleitenden Mittelwert mit einem Fenster von $1 \mu\text{m}$ für jeden Punkt entlang der Scanlinie.

Mittels dieser Methode war eine objektive Gesamtvisualisierung der Ca^{2+} -Entfernung möglich (Abbildung 26).

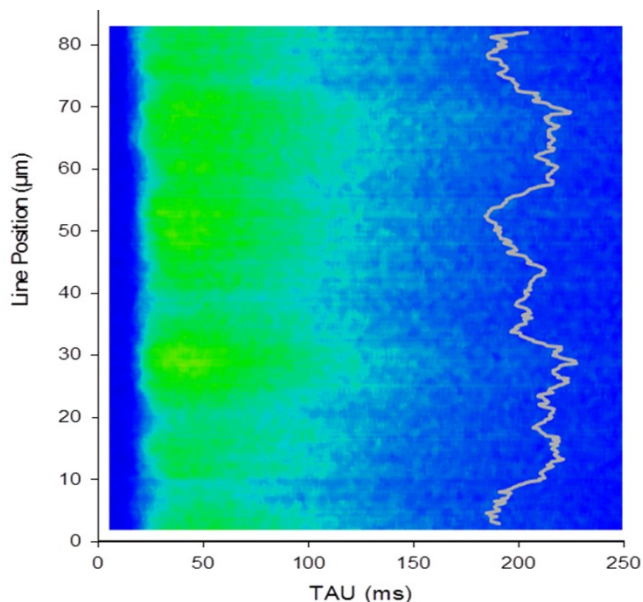


Abbildung 26: Gemittelter Ca^{2+} -Transient eines mit Fluo4-AM beladenen Mauskardiomyozyten. Die graue Linie repräsentiert Tau für jede Linienposition (Tau-Profil).

Zur Quantifizierung der durch die Darstellung des Tau-Wertes pro Linienposition sichtbar gewordenen Inhomogenität in der Ca^{2+} -Entfernung verwendeten wir den sog. Variationskoeffizienten von Tau ($\mathbf{Cv}_{\text{TAU}} = \text{SD}_{\text{tau}}/\text{Tau}_{\text{mean}}$).

DEFINITION VON „SLOW SITES“ UND „FAST SITES“

Wir unterschieden zudem Regionen schneller von Regionen langsamer Ca^{2+} -Entfernung. Diese slow (SlowCaR) bzw. fast sites (FastCaR) sind Bereiche mit größerem bzw. kleinerem mittleren Tau ($\text{Tau}_{\text{mean,local}}$). Die kumulative zytosolische Ca^{2+} -Belastung in den entsprechenden Regionen wurde mittels Errechnung des bestimmten Integrals der Funktion des lokalen Ca^{2+} -Transienten bestimmt.

STATISTISCHE AUSWERTUNG UND SOFTWARE

Die eingesetzten Softwarelösungen waren AIM-ImageBrowser, Liscana, MacSpark, SigmaPlot und Microsoft Excel.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) unter Verwendung von Chi-Quadrat- oder Student-T-Tests angegeben. Unterschiede zweier Gruppen von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

ERGEBNISSE

ÖRTLICHE INHOMOGENITÄTEN DER SUBZELLULÄREN Ca^{2+} -ENTFERNUNG WÄHREND „STEADY-STATE“-STIMULATION

Abbildung 27 zeigt ein typisches Beispiel eines Linescan-Bildes aufgenommen während „Steady-State“-Stimulation. Die Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration war an unterschiedlichen Stellen in der Zelle nicht simultan und zeigte eine schnellere (FastCaR) oder langsamere (SlowCaR) Kinetik. Diese Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung konnten in allen untersuchten Zellen und Spezies beobachtet werden (n=223 Zellen).

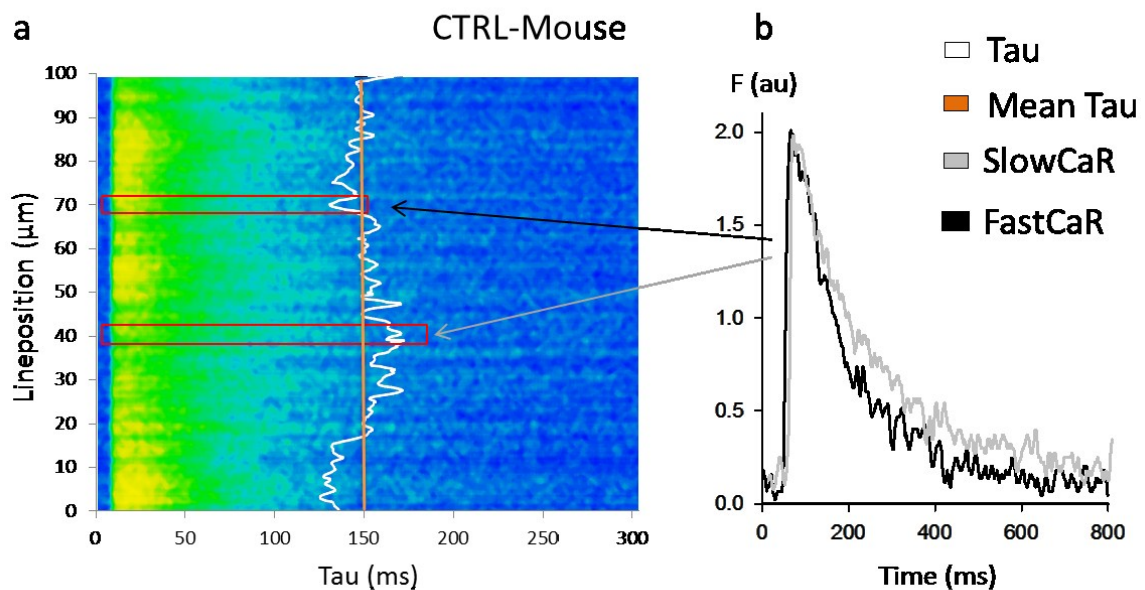


Abbildung 27: a Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung bei einem Maus-Kontrollkardiomyozyten (1Hz, „Steady-State“, gemittelter Linescan). Die orange Linie repräsentiert Tau_{mean} als Grenze zwischen FastCaR und SlowCaR. b Lokaler normalisierter Ca^{2+} -Transient der markierten Region schneller (FastCaR) bzw. langsamer (SlowCaR) Ca^{2+} -Entfernung („Sample“-Größe: 1 µm). Unterschiede in der Kinetik werden sichtbar.

CHARAKTERISIERUNG DER INHOMOGENITÄTEN IN DER ZYTOSOLISCHEN Ca^{2+} -ENTFERNUNG

Zur weiteren Charakterisierung der Inhomogenitäten etablierten wir Tau als Marker der Ca^{2+} -Entfernung. In 16 Kontrollmäusen korrelierte Tau zu RT50 bzw. RT90 linear und war damit zur Darstellung des Prozesses der Ca^{2+} -Entfernung geeignet (Abbildung 28). Tau war in „slow und fast sites“ (SlowCaR bzw. FastCaR) im Mittel um 33 ± 4 ms unterschiedlich (Abbildung 29).

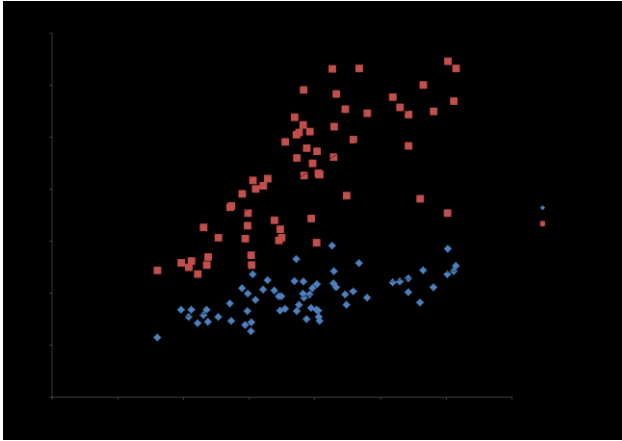


Abbildung 28: Korrelation zwischen Tau, RT50 (blau) und RT90 (rot).

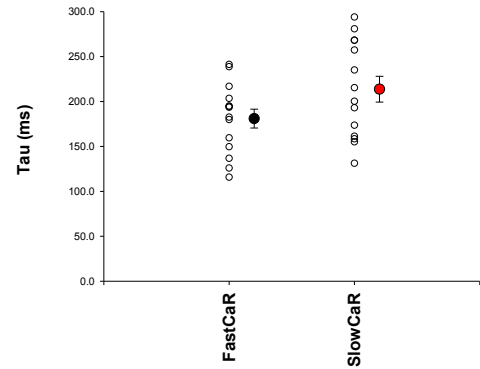


Abbildung 29: Unterschied in Tau zwischen FastCaR ($\text{Tau}_{\text{mean}} = 180 \pm 10 \text{ ms}$) und SlowCaR ($\text{Tau}_{\text{mean}} = 213 \pm 14 \text{ ms}$); $n=14$ Mauszellen.

Die maximale Differenz im lokalen Tau ($\text{Tau}_{\text{local}}$) betrug $237 \pm 29 \text{ ms}$ ($97 \pm 30\%$ des globalen Taus; $n=10$ Mauszellen) und einem Cv_{TAU} von $14 \pm 7 \%$. Die Breite von Regionen größer bzw. kleiner als Tau_{mean} betrug $4,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (FastCaR) und $5,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$ (SlowCaR).

Zur Erfassung der globalen zellulären Gesamtinhomogenität berechneten wir Cv_{TAU} . Da zwischen Tau und der Standardabweichung des mittleren Taus ein nahezu linearer Zusammenhang besteht (Abbildung 30), teilten wir zur Korrektur und Normalisierung die Standardabweichung durch das mittlere Tau und erhielten so Cv_{TAU} als Maß der Gesamt-Inhomogenität der zytosolischen subzellulären Ca^{2+} -Entfernung.

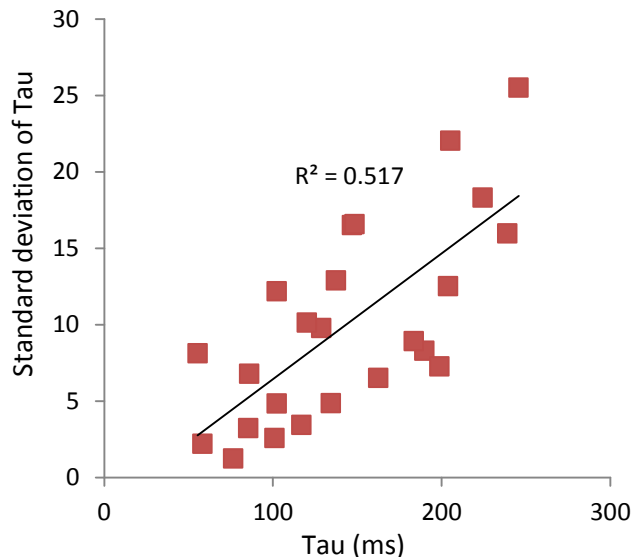


Abbildung 30: Zusammenhang zwischen mittlerem Tau und Standardabweichung einer Zelle (rot, $n=23$ Maus-Zellen): Linearer Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,517$.

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN Ca^{2+} -FREISETZUNG UND Ca^{2+} -ENTFERNUNG

Wie bereits einleitend dargestellt, gibt es Evidenz für eine Inhomogene Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR. Dabei konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass in der Genese der

Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Freisetzung, das t-tubuläre Netzwerk eine große Rolle spielt. Heinzl et al. fanden in Arealen später Ca^{2+} -Freisetzung signifikant weniger T-Tubuli, bei gleichzeitig homogener Verteilung der RYR^[69]. Wir untersuchten nun, ob es eine Verbindung zwischen den beobachteten Inhomogenitäten der Ca^{2+} -Entfernung und den T-Tubuli bedingten Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Freisetzung gibt.

Zwischen TF50 als Parameter der Ca^{2+} -Freisetzung und Tau als Parameter der Ca^{2+} -Entfernung bestand weder in Kontrollschweinen noch Kontrollmäusen ein signifikanter Zusammenhang (n=10 Zellen pro Gruppe, Abbildung 31, Abbildung 32).

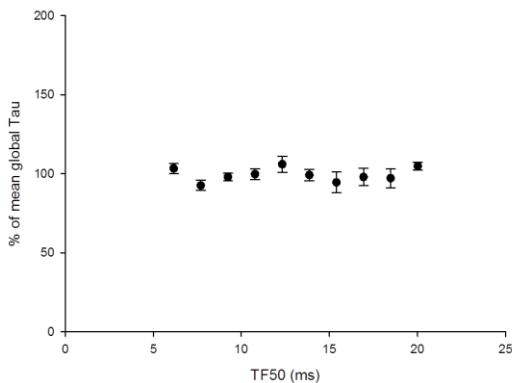


Abbildung 31: Histogramm-Analyse („Bin“-Größe: 1,54 ms; „Samples“ pro Datenpunkt: 4 - 20). Relation zwischen TF50 und Tau (% des mittleren Tau). N=6 CTRL-Mäuse; n=10 Zellen.

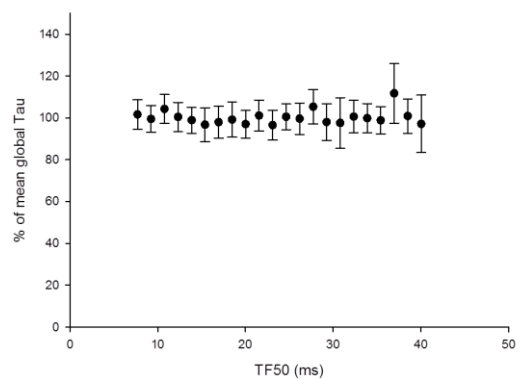


Abbildung 32: Histogramm-Analyse („Bin“-Größe: 1,54 ms; „Samples“ pro Datenpunkt: 8 - 10). Relation zwischen TF50 und Tau (% des mittleren Tau). N=5 CTRL-Schweine; n=10 Zellen.

Die räumliche Variation in der Ca^{2+} -Entfernung war zudem, wie aus Abbildung 33 hervorgeht, größtenteils nicht durch Unterschiede im Amplitudenmaximum des lokalen Ca^{2+} -Transienten (F_{peak}) erklärbar (inverse Korrelation $R^2=0,15$; $p > 0,5$).

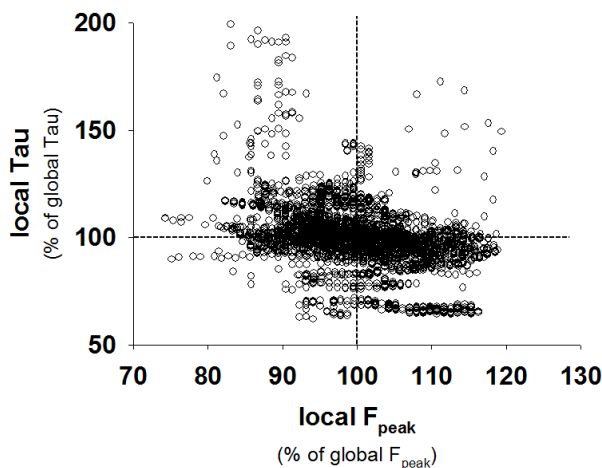


Abbildung 33: Korrelation zwischen lokalem F_{peak} (% des globalen F_{peak}) und lokalem Tau (% des mittleren Taus) in 10 Kontrollmauskardiomyozyten ($R^2=0,15$).

Zur weiteren Abklärung der Verbindung zwischen Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Entfernung wurden die Zellen detubuliert. Damit waren L-Typ Ca^{2+} -kanäle sowie NCX durch funktionell ausgeschaltet.

Die T-Tubuli verbleiben zwar im Zellinneren, haben aber kaum mehr Anteil an der Ca^{2+} -Homöostase.

Detubulierte Zellen zeigten während elektrischer Stimulation Unterschiede in der Ca^{2+} -Freisetzung wie auch in der Ca^{2+} -Entfernung in Abhängigkeit der Entfernung zur sarkolemmalen Membran (Abbildung 34). So war das Signal durch den Einfluss von Couplons und CICR subsarkolemmal schneller und höher im Anstieg als im detubulierten Zellzentrum. Dort wurde die Ca^{2+} -Freisetzung erst durch Diffusion sarkolemmalen Ca^{2+} initiiert^[70]. Nach Normalisierung der Fluoreszenz auf dieselbe Amplitude (Daten nicht gezeigt) wurde zudem eine verlangsamte Ca^{2+} -Entfernung im Zellzentrum sichtbar (Abbildung 35). Auch hierbei spielt die funktionelle Entkopplung der T-Tubuli die ausschlaggebende Rolle. Auch unter diesen Bedingungen war das Auftreten von FastCaR und SlowCaR in allen untersuchten Zellen beobachtbar.

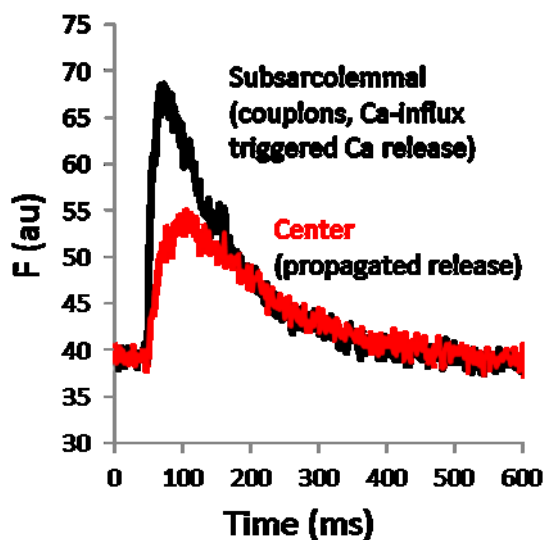


Abbildung 34: Fluoreszenzsignal pro Zeiteinheit aus einer subsarkolemmalen und einer zentralen Region („Sample“-Größe: 1 μm). Subsarkolemmale Ca^{2+} -Freisetzung durch Couplons und CICR; im Zellzentrum wird die Freisetzung erst nach Diffusion subsarkolemmalen Ca^{2+} in das Zentrum initiiert.

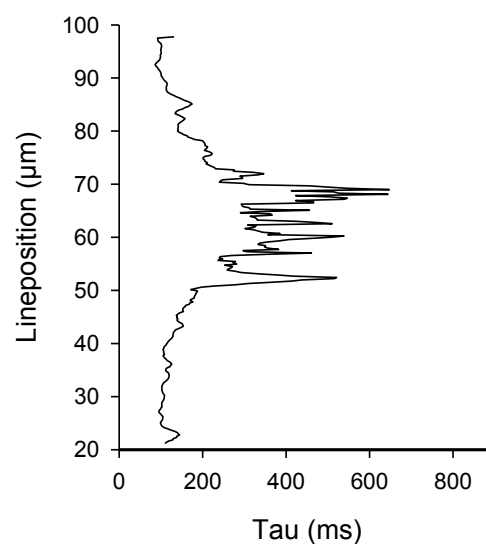


Abbildung 35: Tau (ms) bezogen auf die Linienposition in einer repräsentativen Beispielzelle. Im detubulierten Zellzentrum (Linienposition 50 – 70 μm) verlangsamte Ca^{2+} -Entfernung gegenüber einer normalen Ca^{2+} -Entfernung im subsarkolemmalen Zellrandbereich. Auch im Zellzentrum nach wie vor sichtbares Auftreten von FastCaR und SlowCaR.

UNTERSCHIEDE IN DEN INHOMOGENITÄTEN DER Ca^{2+} -ENTFERNUNG IM VERGLEICH MAUS – SCHWEIN

Schweinkardiomyozyten verfügen über ein wesentlich inhomogeneres, wenig dichtes T-Tubuläres Netz^[69], aber auch über eine im Vergleich mit Mäusen geringere SERCA-Aktivität^[13].

Die globale Ca^{2+} -Entfernung ist dabei etwas langsamer und das diastolische Ca^{2+} über einen längeren Zeitraum höher als bei Mäusen. Der SERCA-Anteil an der Ca^{2+} -Entfernung ist zu Gunsten der NCX-Aktivität relativ verringert. Abbildung 36 zeigt anhand zweier Beispielszellen die qualitativen Veränderungen im Tau-Profil beim Vergleich von Maus und Schwein.

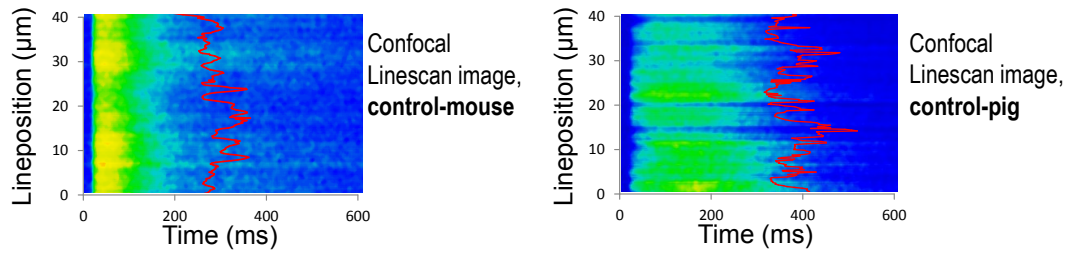


Abbildung 36: Inhomogenität der Ca^{2+} -Entfernung in Maus und Schwein. Ausschnitt einer konfokalmikroskopischen Aufnahme (Fluo4-AM, 1 Herz Steady State, gemittelter Transient) eines Kardiomyozyten von der Maus (links) bzw. vom Schwein (rechts). Die rote Linie repräsentiert das Tau-Profil der Zelle. Im Kontrollschwein ist die Inhomogenität ausgeprägter.

Cv_{TAU} als Maß der Inhomogenität war in 58 Schweinekardiomyozyten signifikant größer als in den untersuchten 33 Mauskardiomyozyten (Abbildung 37, Cv_{TAU} Maus = 0.10 ± 0.06 vs. Cv_{TAU} Schwein = 0.20 ± 0.06 ; $n=33$ Mauszellen, $n=58$ Schweinezellen; $p<0.001$).

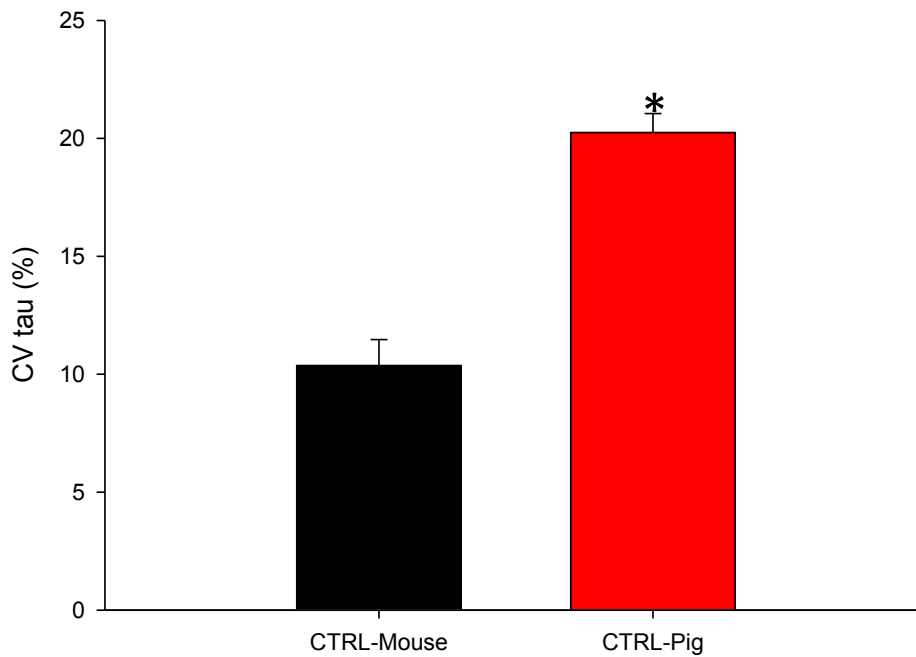


Abbildung 37: Schweine zeigen eine höhere Inhomogenität in der Ca^{2+} -Entfernung als Mäuse. Die normierte Variation vom Mittelwert des Tau (Cv_{TAU}) ist im Schwein mit $20 \pm 6\%$ doppelt so groß wie in Mäusen mit $10 \pm 6\%$.

DIE ROLLE DES NCX

SEA-0400

SEA-0400 als hochselektiver NCX-Blocker erhöhte Tau signifikant von 268 ± 61 auf 295 ± 67 ms ($p < 0,001$) (vgl. Abbildung 38) und die Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration in der verwendeten Dosierung von $0,3 \mu\text{M}$ nicht signifikant um 8 % ($F_{diast, Ctrl} = 45 \text{ au} \pm 10$ $F_{diast, SEA} = 49 \text{ au} \pm 12$). Des Weiteren kam es zu einer Reduktion von F_{peak} um 17 % ($F_{peak, Ctrl} = 2,55 \pm 0,54$ $F_{peak, SEA} = 2,12 \pm 0,32$, $p < 0,05$ $n=6$) bei fehlendem Einfluss auf die räumliche Verteilung der FastCaR und SlowCaR ($n=5$ Kontrollmauszellen; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}} = 197 \pm 59$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}} = 212 \pm 57$ ms ; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}, \text{SEA}} = 203 \pm 75$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}, \text{SEA}} = 219 \pm 82$; $p < 0,05$).

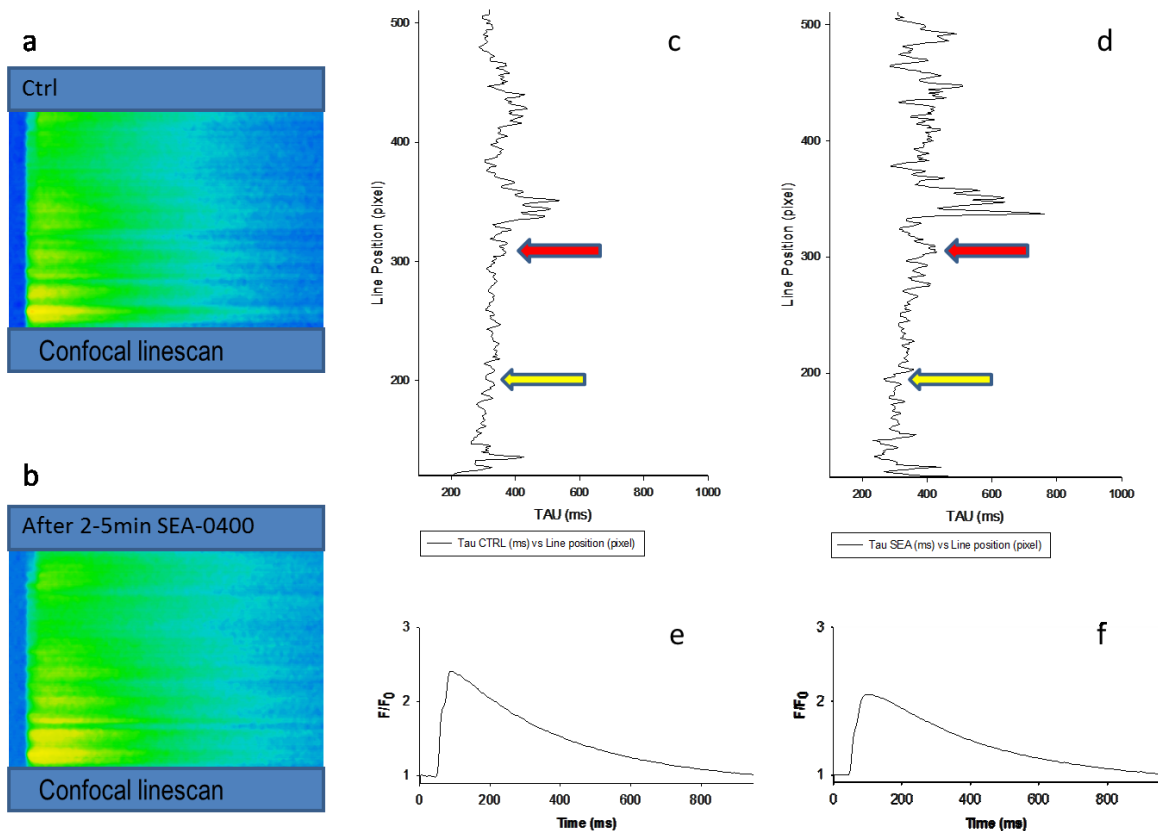


Abbildung 38: Wirkung von SEA0400 anhand einer repräsentativen Beispiellelle. Von links nach rechts **a** Kontroll- Ca^{2+} -Transient (Fluo4-AM, 1 Herz Steady State, gemittelter Transient); **b** Nach 2-5 Minuten gemäß Protokoll 4.; **c-d** Tau-Verteilung des CTRL (links) bzw. SEA-Transienten (rechts); **e-f** F/F_0 des CTRL (links) bzw. SEA-Transienten (rechts). Der gelbe Pfeil steht für SlowCaR, der rote Pfeil für FastCaR.

SEA erhöhte das lokale Tau in vergleichbarem Ausmaß in SlowCaR und FastCaR ($108 \pm 1\%$ vs. $112 \pm 1\%$; $p > 0,05$; $n=5$ Mäusezellen)(vgl. Abbildung 39).

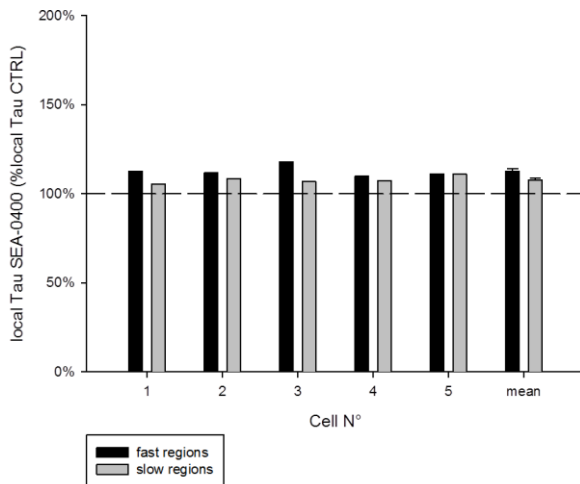


Abbildung 39: Vergleich des Einflusses von SEA auf Regionen schneller (schwarz) bzw. langsamer (grau) Ca^{2+} -Entfernung. Die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Ca^{2+} -Entfernung im Rahmen des SEA-Protokolls ist in SlowCaR und FastCaR vergleichbar.

INHOMOGENITÄTEN IN DER Ca^{2+} -ENTFERNUNG IM NCX-KNOCKOUT MAUSMODELL

Zur weiteren Erforschung des Einflusses des NCX auf die Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Wiederaufnahme zogen wir ein NCX-Knockout-Modell der Maus heran (NCX^{+/-}-Maus) und verglichen dieses mit Zellen aus Kontrolltieren (NCX-WT).

Der Vergleich von 15 NCX^{+/-}-Mauszellen mit 9 NCX-WT-Mauszellen erbrachte einen nicht signifikanten Unterschied in Cv_{TAU} von $0,09 \pm 0,03$ vs. $0,07 \pm 0,02$ und damit ein unveränderte Inhomogenität im Vergleich der Knockout-Tiere mit Kontrollmäusen ($p=0,12$). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang sicherlich die Tatsache, dass das mittlere Tau in NCX-WT mit 215 ± 15 ms signifikant kleiner als in NCX^{+/-} mit 174 ± 76 ms war ($p<0,05$).

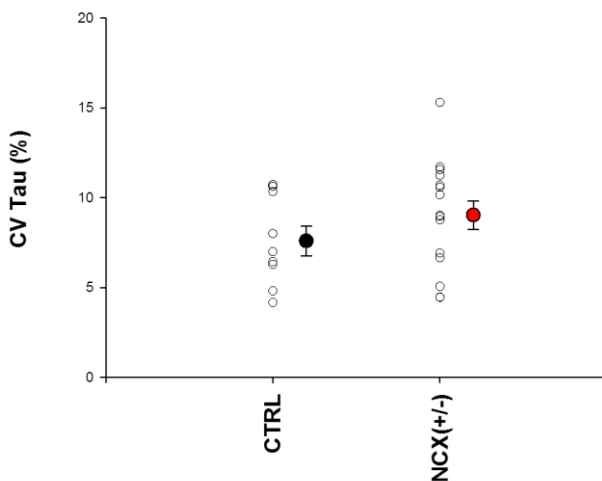


Abbildung 40: Vergleich von 9 Kontroll- (NCX-WT) und 15 NCX-Knockout-Tieren. Der Unterschied im mittleren Cv_{TAU} ist nicht signifikant (Cv_{TAU} CTRL = $0,07 \pm 0,02$ vs. Cv_{TAU} NCX (+/-) = $0,09 \pm 0,03$; $n_{NCX+/-} = 15$, $n_{CTRL} = 9$; $p=0,12$. $Tau_{meanCTRL} = 215 \pm 77$ ms, $Tau_{meanNCX+/-} = 174 \pm 76$ ms, $p<0,05$).

DIE ROLLE DER SERCA

FORSKOLIN

Wir untersuchten die Möglichkeit, ob eine Verstärkung der SERCA—Aktivität und damit der Ca^{2+} -Entfernung in das SR zu einer Verminderung der Inhomogenität bzw. zu einer Veränderung des Auftretens früher Ca^{2+} -Entfernungsregionen bzw. später Ca^{2+} -Entfernungsregionen führen würde. Forskolin hat, wie bereits einleitend beschrieben, PKA-vermittelte Effekte auf die Zellkontraktion, die systolische Ca^{2+} -Amplitude und die SR- Ca^{2+} -Entfernung (Abbildung 17).

Forskolin verminderte Tau dabei signifikant von 148 ± 36 ms auf 95 ± 41 ms ($p < 0,001$, $n = 7$ Zellen) und hatte keinen Einfluss auf die räumliche Verteilung der FastCaR und SlowCaR (vgl. Abbildung 41). Letzteres zeigte sich in der Tatsache, dass es sich in fünf Beispielzellen bei je zwei FastCaR und zwei SlowCaR auch nach pharmakologischer Intervention um Regionen größer als Tau_{mean} bzw. kleiner als Tau_{mean} handelte ($n = 5$ Kontrollmauszellen; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}} = 99 \pm 31$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}} = 113 \pm 34$ ms ; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}, \text{Forsk}} = 80 \pm 12$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}, \text{Forsk}} = 88 \pm 14$; $p < 0,05$).

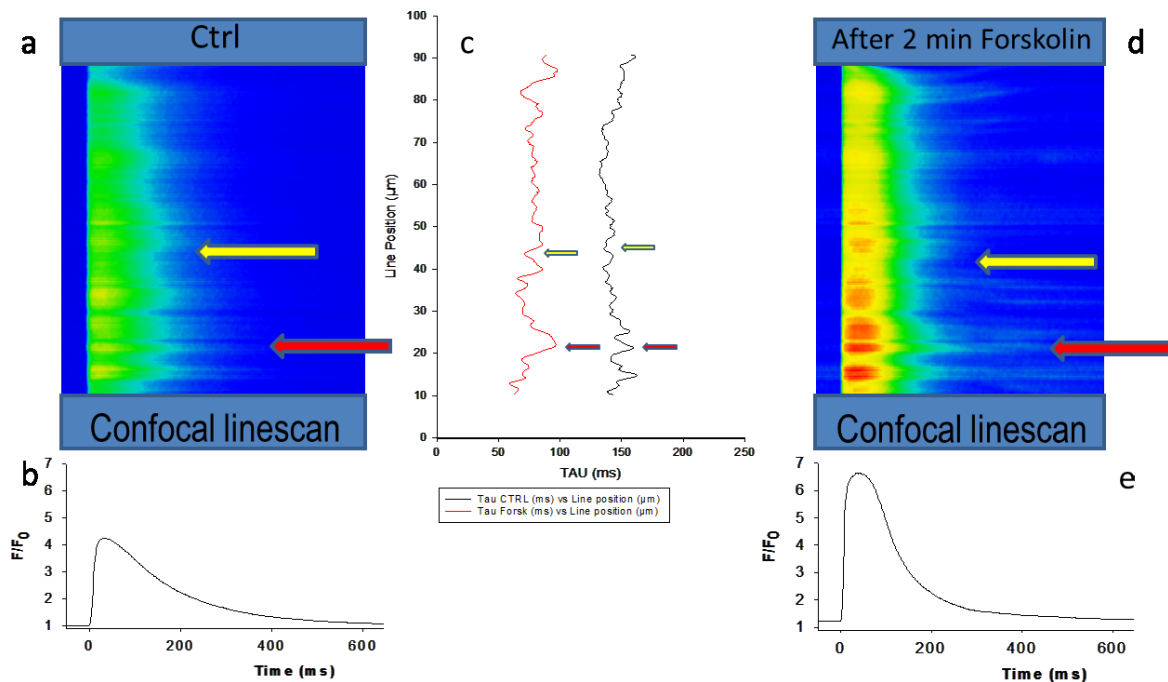


Abbildung 41: Wirkung von Forskolin anhand einer repräsentativen Beispielzelle. Von links nach rechts **a** Ca^{2+} -Transienten eines Mauskardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (Fluo4-AM, 1 Herz Steady State, gemittelter Transient); **b** F/F_0 desselben Transienten; **c** Tauverteilung bezogen auf die Linienposition vor und nach Forskolin-Gabe; **d/e** Ca^{2+} -Transient derselben Zelle nach Versuchsdurchführung gemäß Protokoll 2. Der gelbe Pfeil markiert FastCaR, der rote Pfeil SlowCaR.

Wie aus Abbildung 42 ersichtlich, verringerte Forskolin das lokale Tau dabei in SlowCaR signifikant stärker als in FastCaR (auf 72 ± 4 % vs. 78 ± 5 % in FastCaR; $p < 0,05$, $n = 7$ Mauszellen). Abbildung 42 zeigt anhand zweier repräsentativer Beispielzellen die quantitativ stärkere Beeinflussbarkeit langsamer Ca^{2+} -Entfernungsregionen: Regionen größer als 100% des „Baseline“-Taus zeigen ein höheres ΔTau , dh. eine größere Modulation durch Forskolin als Bereiche mit niedrigerem „Baseline“-Tau.

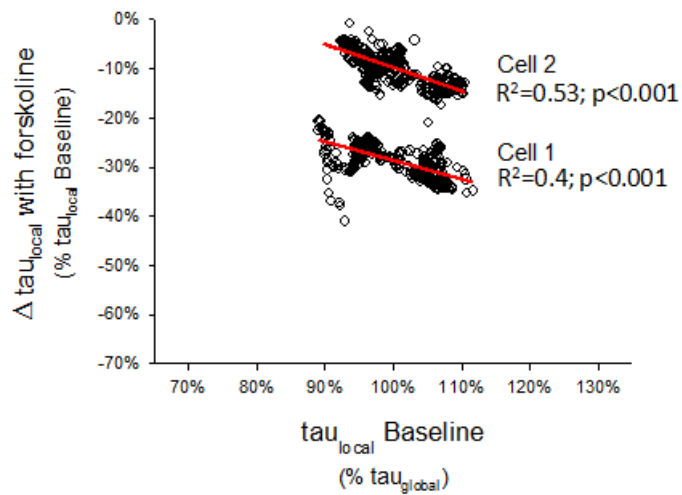


Abbildung 42: Wirkung von Forskolin auf Bereiche schnellerer bzw. langsamerer Ca²⁺-Entfernung (Tau) anhand von zwei repräsentativen Beispielszellen.

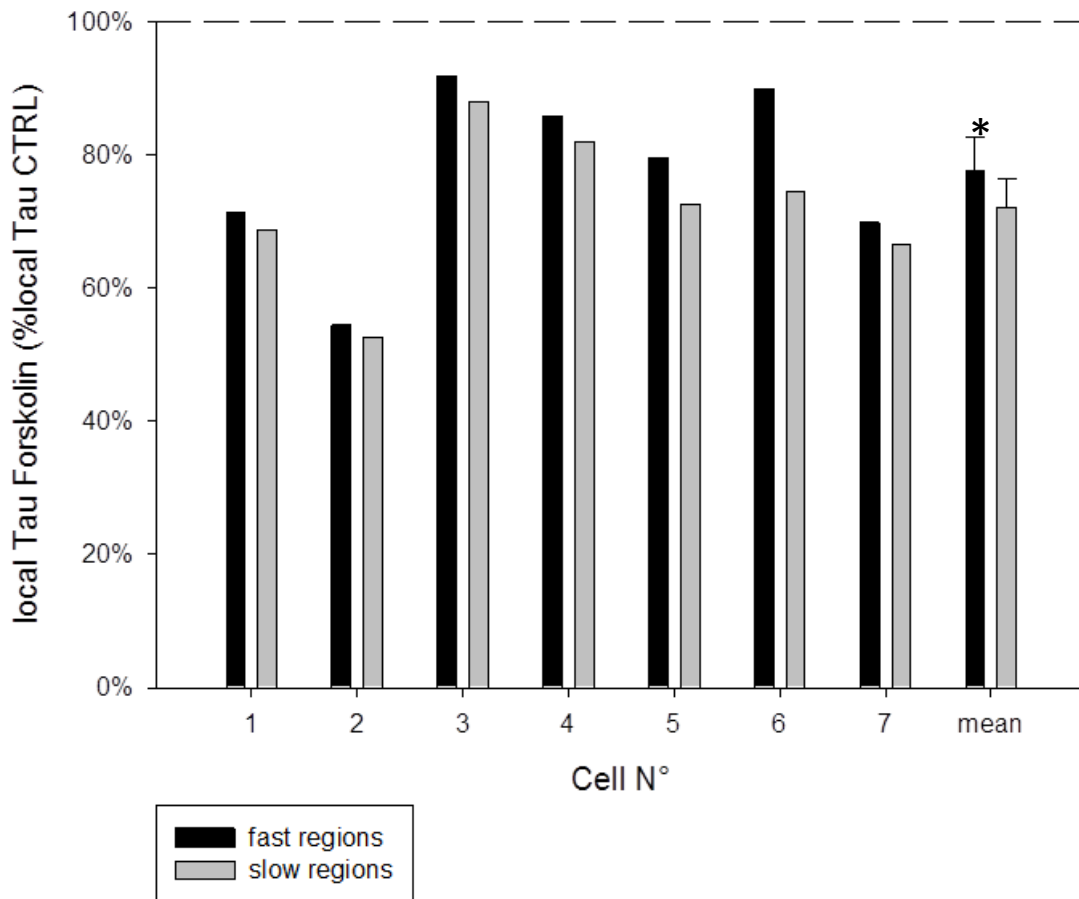


Abbildung 43: Vergleich des Einflusses von Forskolin auf Regionen schneller (schwarz) bzw. langsamer (grau) Ca²⁺-Entfernung. Die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Ca²⁺-Entfernung ist in SlowCaR signifikant stärker als in FastCaR.

CPA

Zur Hemmung der SERCA-Aktivität kam niedrig dosiertes CPA zum Einsatz.

In der von uns verwendeten Dosierung von 5 μM führte es zu einer teilweisen Blockade der SERCA und erhöhte Tau dabei signifikant von 211 ± 68 auf 274 ± 94 ms ($p < 0.01$). CPA hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die räumliche Verteilung der FastCaR und SlowCaR (Abbildung 44). In sieben zufällig ausgewählten Zellen kam es bei je zwei FastCaR und zwei SlowCaR nach CPA-Behandlung zu keiner Veränderung bzgl. ihres Verhaltens zu Tau_{mean} . ($n=7$ Kontrollmauszellen; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}} = 138 \pm 36$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}} = 164 \pm 47$ ms ; $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{FastCaR}, \text{CPA}} = 176 \pm 52$ ms $\text{Tau}_{\text{mean}, 2 \times \text{SlowCaR}, \text{CPA}} = 220 \pm 53$; $p < 0,05$).

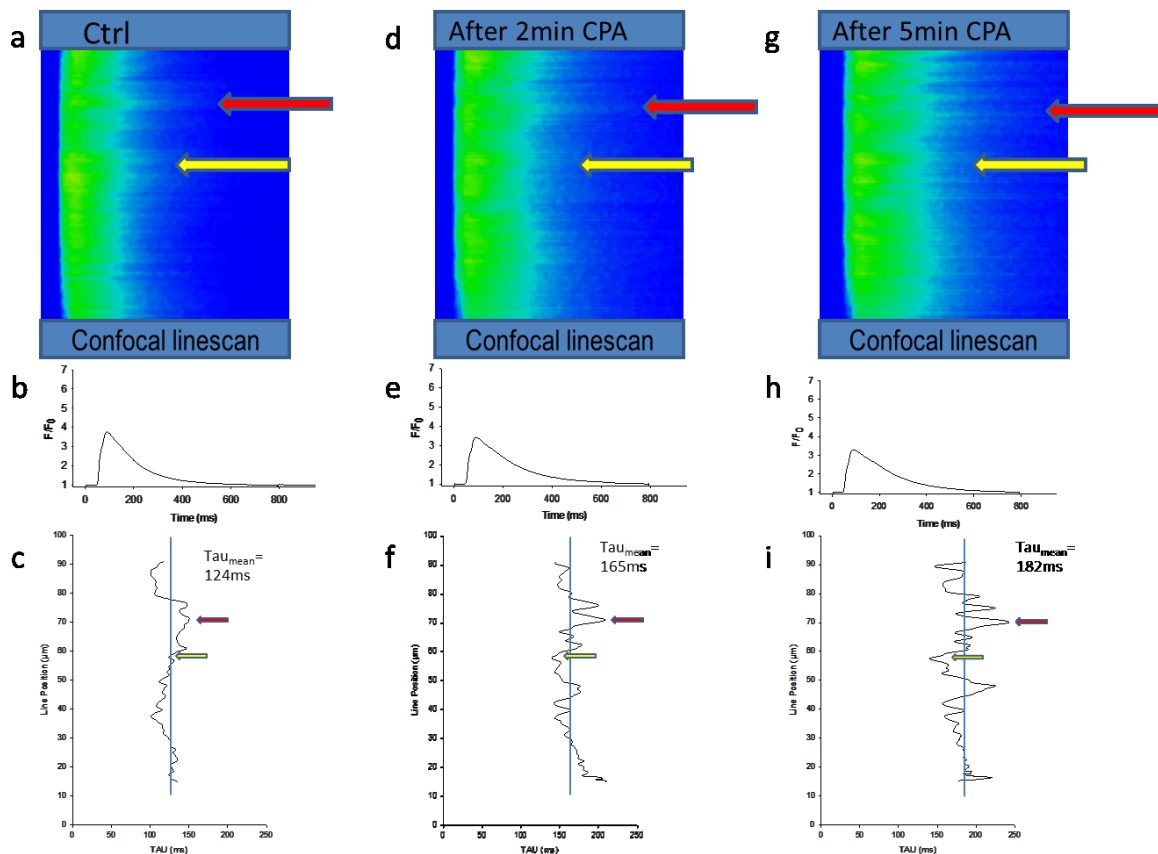


Abbildung 44: Wirkung von CPA anhand einer repräsentativen Beispielzelle. Von links nach rechts **a** Kontroll- Ca^{2+} -Transient (Fluo4-AM, 1 Herz Steady State, gemittelter Transient); **b** F/F0 desselben Transienten; **c** Tau-Verteilung desselben Transienten; **d** nach zwei Minuten CPA gemäß Protokoll 3; **e-f** vgl. Kontrollzelle; **g-i** entsprechend fünf Minuten nach CPA-Gabe. Die Blaue Linie markiert das mittlere Tau. Der gelbe Pfeil steht für SlowCaR, der rote Pfeil für FastCaR.

CPA erhöhte das lokale Tau dabei in SlowCaR signifikant stärker als in FastCaR (auf $164 \pm 5\%$ vs. $134 \pm 6\%$ in FastCaR; $p < 0,05$, $n=7$ Mausezellen; vgl. Abbildung 45) und führte damit zu einer Verstärkung der Inhomogenität der Ca^{2+} -Entfernung mit CPA ($\text{Cv}_{\text{TAU}} 19 \pm 5\%$ vs. $15 \pm 7\%$; $p < 0.001$). Durch Applikation dieser Substanz und damit einer SERCA-Hemmung, ließ sich also die Inhomogenität der Ca^{2+} -Entfernung verstärken. Gleichzeitig war, wie unter Forskolin, die Beeinflussbarkeit der SlowCaR größer als die der FastCaR.

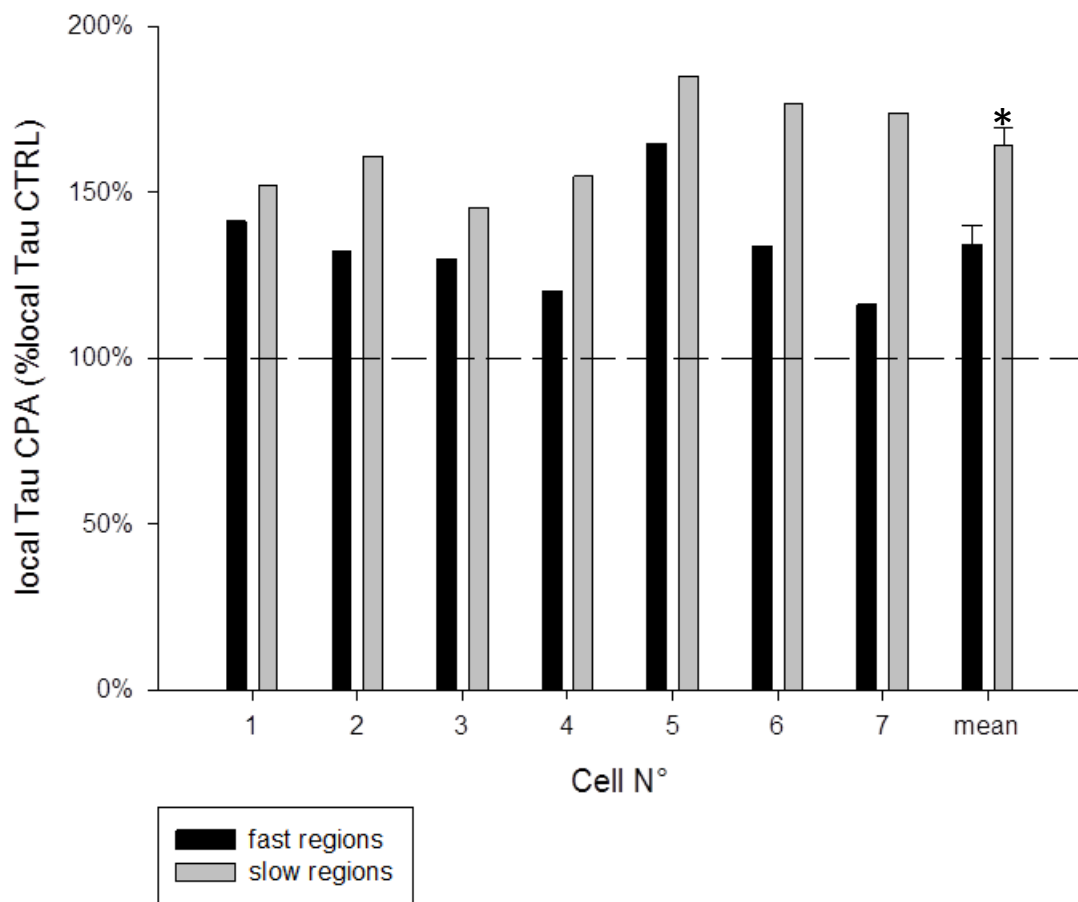


Abbildung 45: Vergleich des Einflusses von CPA auf Regionen schneller (schwarz) bzw. langsamer (grau) Ca^{2+} -Entfernung. Die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Ca^{2+} -Entfernung ist in SlowCaR signifikant stärker als in FastCaR.

DIE ROLLE DER MITOCHONDRIEN

MITOTRACKER

Ein weiterer Mechanismus der Ca^{2+} -Entfernung ist die Ca^{2+} -Entfernung durch Mitochondrien. Die durchgeführte Doppelfärbung mit Mitotracker Red FM und Fluo4-AM ermöglichte eine visuelle Korrelation der Signale (Abbildung 46). Diese Kolokalisationsstudien zwischen mitochondrialem und Ca^{2+} -Fluoreszenz-Signal zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen SlowCaR bzw. FastCaR und höherem bzw. niedrigerem Mitotracker-Signal ($n=9$ Mauszellen, 2-4 FastCaR/SlowCaR pro Zelle; $p<0,05$).

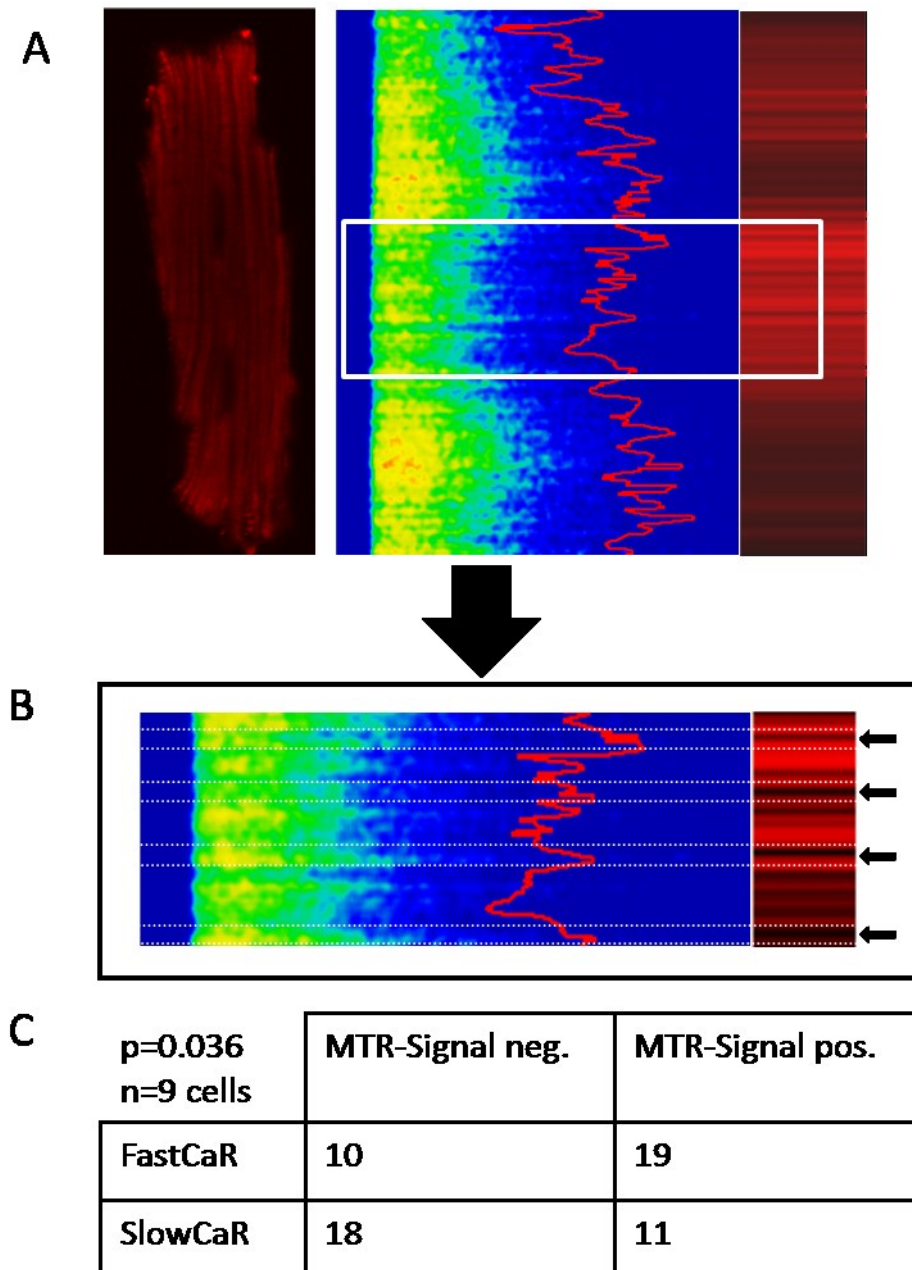


Abbildung 46: **A** Eine mit Mitotracker Red FM gefärbte Beispielizele sowie ein Beispieltransient inkl. Taupprofil und loko temporär synchronem mitochondrialem Signal (Doppelfärbung). **B** Darstellung ausgewählter SlowCaR und Korrelation mit mitochondrialem Signal (rot entsprechend der mitochondrialen Dichte). **C** Gegenüberstellung von FastCaR bzw. SlowCaR und der Mitotracker (MTR) Signale.

Ru360

Nach Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Entfernung durch teilweise Blockade des MCU konnten zwei Zellgruppen unterschieden werden. Eine erste Gruppe (6 von 16 Zellen), die eine Beschleunigung der Gesamt- Ca^{2+} -Entfernung zeigte, wie sie in Mäusen bereits von Seguchi et al. beschrieben wurden^[68]. Des Weiteren eine zweite Gruppe (10 von 16 Zellen), bei der eine signifikante Vergrößerung von Tau_{mean} beobachtet werden konnte. Bei letzteren Zellen wurden weitere fünf Zellen aufgrund sehr ausgeprägter Zellkontraktion von der Analyse ausgeschlossen.

In Gruppe 1 wurde die Ca^{2+} -Entfernung in schnellen Regionen signifikant stärker beschleunigt, während die Hemmung in SlowCaR besser wirkte.

In Gruppe 2 verminderte Ru360 das lokale Tau lediglich in FastCaR signifikant stärker, während SlowCaR kaum beeinflusst wurden (auf $126 \pm 12\%$ vs. $112 \pm 10\%$ in SlowCaR; $p < 0,05$, einseitiger T-Test; $n=5$ Mauszellen; Abbildung 47).

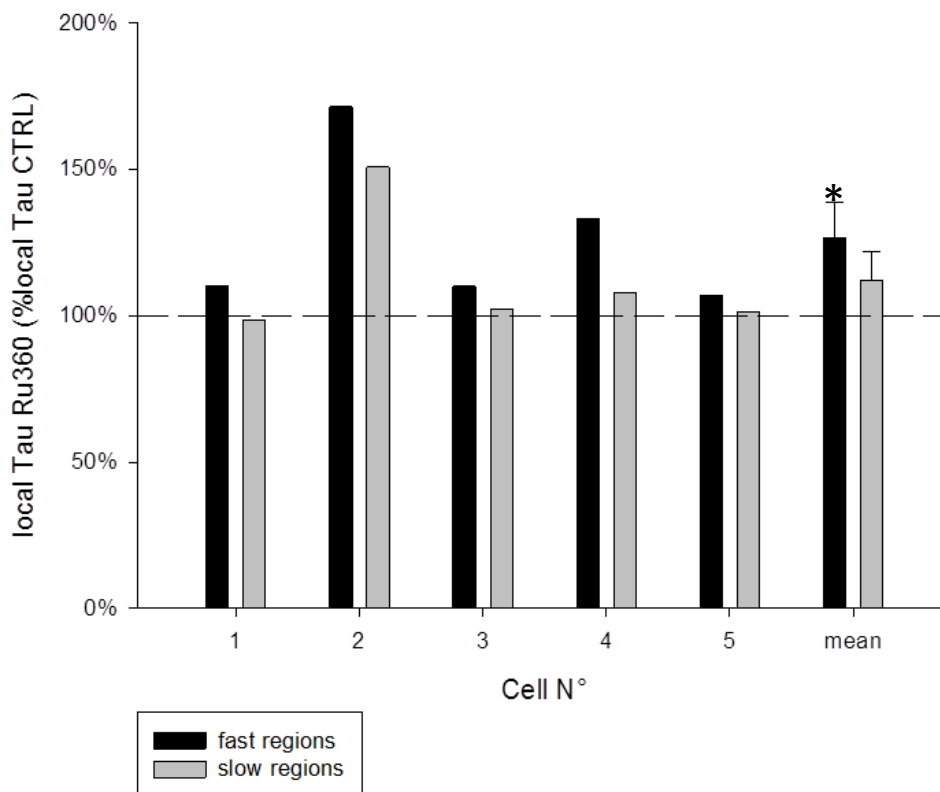


Abbildung 47: Vergleich des Einflusses von Ru360 in Gruppe 2 auf Regionen schneller (schwarz) bzw. langsamer (grau) Ca^{2+} -Entfernung. Die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Ca^{2+} -Entfernung ist in schnellen Regionen signifikant stärker als in langsamen Bereichen.

KONSEQUENZEN INHOMOGENER Ca^{2+} -ENTFERNUNG

SUBZELLULÄRE Ca^{2+} -BELASTUNG

Die Beobachtung von Regionen langsamer bzw. schneller Ca^{2+} -Entfernung führt zur Hypothese einer lokal unterschiedlichen Ca^{2+} -Belastung der Zelle. Daher evaluierten wir die Ca^{2+} -Belastung in SlowCaR und FastCaR durch Berechnung des Integrals lokaler Ca^{2+} -transienten. Das Integral des normalisierten lokalen Ca^{2+} -Transienten war hierbei in SlowCaR signifikant größer als in FastCaR (450 ± 66 vs. 418 ± 52 a.u. in FastCaR, $n=8$ Mauszellen, $p<0,05$).

DAS AUFTRETEN VON INHOMOGENITÄTEN IN DER Ca^{2+} -ENTFERNUNG IM MODELL KARDIALEN „REMODELINGS“ BEIM POST-INFARKT SCHWEIN

Abbildung 48 zeigt anhand eines Ausschnitts einer konfokalen Aufnahme zweier Beispielzellen die Unterschiede im Tau-Profil zwischen CTRL- und MI-Tieren.

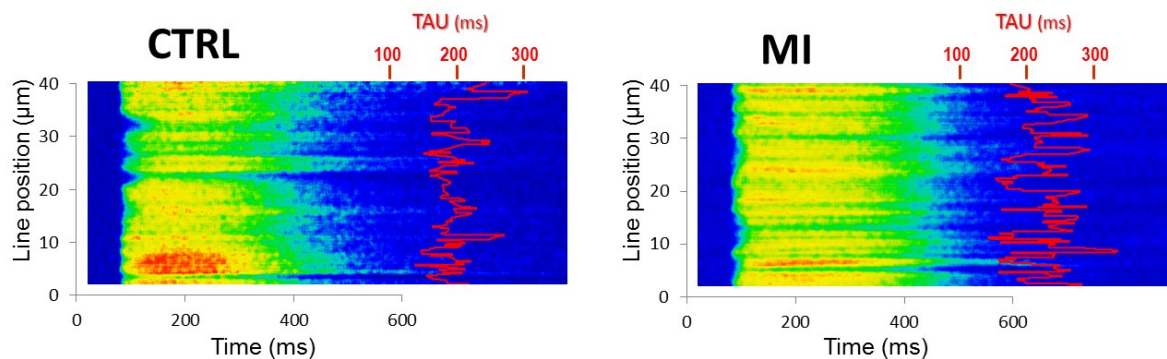


Abbildung 48: Inhomogene Ca-Entfernung im Modell des kardialen Remodellings. Ausschnitt einer konfokalmikroskopischen Aufnahme (Fluo4-AM, 1 Herz Steady State, gemittelter Transient) eines Kardiomyozyten vom Kontroll-Schwein(CTRL) bzw. vom Schwein mit kardialer Dysfunktion (MI). Die rote Linie repräsentiert das Tau-Profil der Zelle. Im MI-Schwein findet sich eine erhöhte Inhomogenität.

Es fand sich in quantitativen Untersuchungen des Inhomogenitätsparameters Cv_{TAU} ein Unterschied zwischen der Gruppe der Kontrollschweine und den Zellen bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie. Die Inhomogenitäten der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung war in MI-Schweinen mit $24 \pm 9 \%$ signifikant stärker ausgeprägt als in Kontrollschweinen mit $20 \pm 6 \%$ ($n = 57$ Zellen pro Gruppe; $p<0,05$).

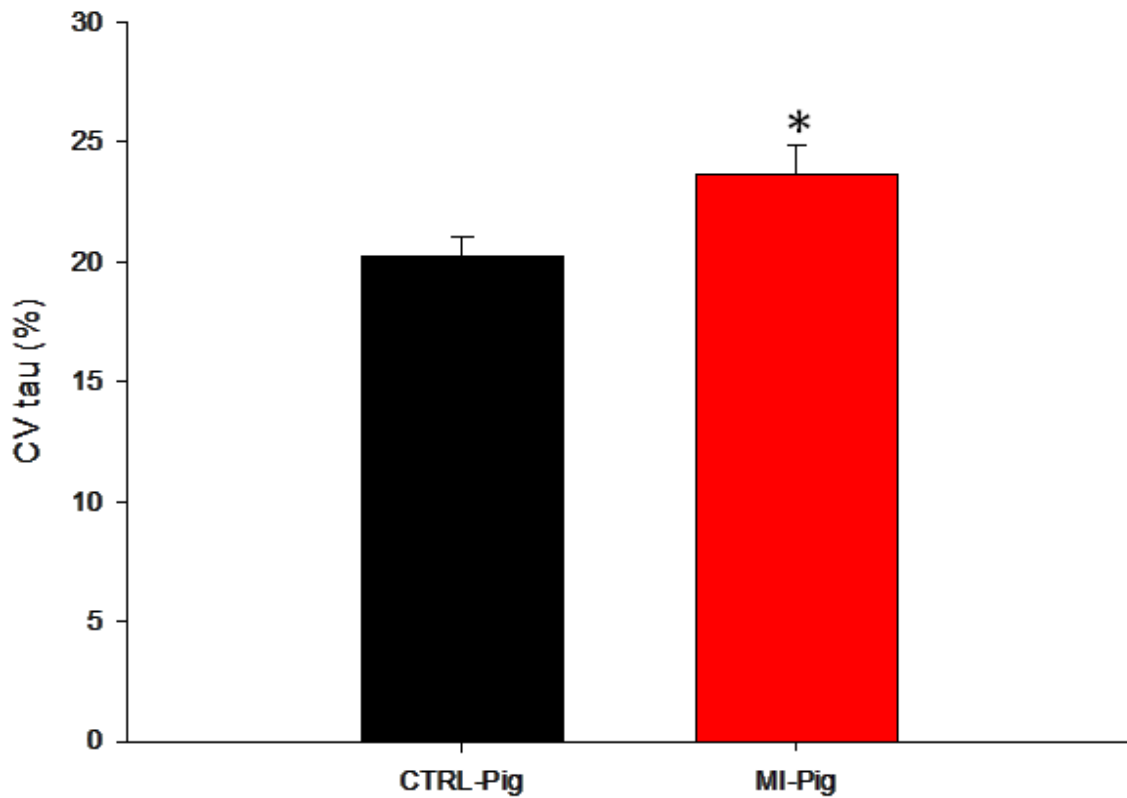


Abbildung 49: MI-Schweine zeigen eine höhere Inhomogenität in der Ca^{2+} -Entfernung als Kontrolltiere. CV_{TAU} ist im MI-Schwein mit $24 \pm 9\%$ signifikant größer als in Kontrollschweinen mit $20 \pm 6\%$ ($n = 57$ Zellen/Gruppe; $p < 0,05$).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass auch im Modell der kardialen Dysfunktion die Regionen langsamer Ca^{2+} -Entfernung ebenfalls auf eine pharmakologische Intervention mit Forskolin besser ansprechen als FastCaR. Dabei verringerte Forskolin das lokale Tau in SlowCaR signifikant stärker als in FastCaR (auf $46 \pm 5\%$ vs. $56 \pm 7\%$ in FastCaR; $p < 0,05$, $n = 10$ MI-Schweinezellen).

DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals das Auftreten von räumlich-zeitlichen Inhomogenitäten in der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung in Kardiomyozyten. Dieses Phänomen konnte sowohl in ventrikulären Kardiomyozyten von Mäusen als auch von Schweinen beobachtet werden.

Bereiche langsamer Ca^{2+} -Entfernung wurden stärker durch Hemmung/Stimulierung der SR Ca^{2+} -Entfernung beeinflusst. Bereiche mit schneller Ca^{2+} -Entfernung korrelierten mit einem dichteren mitochondrialen Signal und wurden stärker durch den MCU-Inhibitor Ru360 moduliert. Schweine mit chronisch ischämischem Myokard zeigten eine Zunahme in der Inhomogenität der Ca^{2+} -Entfernung.

INHOMOGENITÄTEN IN DER ZYTOLOGISCHEN Ca^{2+} -ENTFERNUNG

Die Inhomogenitäten in der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung traten sowohl bei der Maus, als auch beim Schwein unter nahe physiologischen Bedingungen auf. In den beispielsweise von Heinzl et al. oder Song et al. in Studien verwendeten Abbildungen wurden Ca^{2+} -Entfernung-Inhomogenitäten bereits sichtbar, bis dato allerdings nie systematisch untersucht^[69, 71].

Durch Mittelung der Transienten unter „Steady State“ Bedingungen haben wir uns in dieser Studie auf Inhomogenitäten der Ca^{2+} -Entfernung konzentriert, die von Beat-to-Beat Veränderungen unabhängig sind. Die Größe zusammenhängender Regionen mit langsamer oder schneller Ca^{2+} -Entfernung ($5,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$ und $4,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$) überstieg die Größe eines Sarkomers und schwankte deutlich.

Ein Beitrag des Zellkerns ist unwahrscheinlich, da die Linie so gewählt wurde, dass der Zellkern ausgespart war. Außerdem entspricht das unregelmäßige Muster entlang der Längsachse der Zelle nicht der typischen zentralen, langgestreckt ovalen Form der Zellkerne ventrikulärer Kardiomyozyten.

URSACHEN GRÖßERER INHOMOGENITÄTEN IN SCHWEIN UND MAUS

Es bestand eine schwache, nicht signifikante inverse Korrelation zwischen der Zeitkonstante der Ca^{2+} -Entfernung und der Amplitude des lokalen Ca^{2+} -Transienten. Diese schnellere Ca^{2+} -Entfernung bei höheren lokalen Ca^{2+} -Transienten könnte auf eine stärkere Aktivierung der SERCA bei höherem lokalen zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]$ zurückzuführen sein^[72, 73]. So war in Studien mit Ratten und Hasen die SERCA-vermittelte Ca^{2+} -Entfernung in das SR bei halbmaximaler CPA-vermittelter SERCA-Inhibierung, von der $[\text{Ca}^{2+}]_o$ abhängig.

Allerdings zeigt Abbildung 33, dass die Amplitude des lokalen Ca^{2+} -Transienten nur zu einem geringen Teil zur Variation der Kinetik der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung beiträgt.

Als Ursache der Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung kommen zum einen funktionelle Veränderungen an den Ca^{2+} transportierenden Proteinen (SERCA, NCX, PMCA, MCU) in Betracht. Eine weitere Möglichkeit stellen strukturelle Alterationen im Sinne einer subzellulär inhomogenen Verteilung der an der Ca^{2+} -Entfernung beteiligten Proteine dar.

T-TUBULI

T-Tubuli sind Invaginationen in der Zellmembran und durchziehen den gesamten Kardiomyozyten in, je nach Spezies, unterschiedlich hoher Dichte und Regelmäßigkeit. Entlang der T-Tubuli formen sich Couplons, die, im Rahmen der CICR, Orte präferentieller Ca^{2+} -Freisetzung darstellen^[74]. Balijepalli et al. konnten zeigen, dass die Dichte der T-Tubuli im kardialen Remodelling verringert ist^[75]. Rezente Studien belegen zudem die Bedeutung der T-Tubuli für die Synchronität der Ca^{2+} -Freisetzung^[54, 69, 71, 76]. Die Autoren konnten nachweisen, dass Bereiche mit verspäteter Ca^{2+} -Freisetzung mit einer geringeren Dichte an T-Tubuli in Verbindung zu bringen sind. Regionen langsamer Ca^{2+} -Freisetzung waren somit auf eine geringere Zahl funktioneller Couplons bei geringerer T-Tubuli-Dichte zurückzuführen.

PMCA und NCX sind ebenfalls entlang der T-Tubuli zu finden und tragen zur Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol bei. Es könnte daher ein Zusammenhang zwischen der T-Tubuli-Verteilung und der Entstehung von Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung bestehen. Wir untersuchten dies in der vorliegenden Studie in zwei Versuchsansätzen: Zum einen Korrelierten wir TF50, als Surrogat-Parameter für T-Tubuli, und Tau. Zum anderen nutzten wir die Technik der Formamid-induzierten Detubulierung.

Des Weiteren konnten wir im direkten Vergleich zwischen Mäusen, mit ihrem dichten regelmäßig aufgebauten T-Tubulären Netz, und Schweinen, bei Letzteren eine Erhöhung der Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung feststellen.

Gegen einen Zusammenhang von Regionen inhomogener Ca^{2+} -Entfernung mit der Struktur der T-Tubuli spricht die fehlende Korrelation zwischen Tau und TF50. TF50, als Zeitraum bis zur halbmaximalen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR, ist in Couplon- und damit zwingend auch T-Tubulus-nahen Bereichen kleiner^[69]. Eine Korrelation zwischen Tau und TF50 würde daher eine Verbindung zwischen relevanten Ca^{2+} -Entfernungskomponenten und den T-Tubuli bedeuten. Dass dies nicht der Fall ist, wird aus den Abbildung 31 und Abbildung 32 sowohl in der Maus als auch im Schwein deutlich.

Die Ergebnisse der funktionellen Entkopplung der T-Tubuli von der äußeren sarkolemmalen Membran sprechen ebenfalls gegen eine T-Tubulären Beteiligung bei der Entstehung der Inhomogenitäten. Diese als Detubulierung bekannte Intervention, führt zu einem verspäteten Ca^{2+} -Anstieg im Zellzentrum sowie zu einer Verlängerung der Ca^{2+} -Entfernung^[41]. Zu Grunde liegt hierbei eine fehlende Teilnahme von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen an der Induktion von CICR aus dem SR bzw. eine Verhinderung der Teilnahme von NCX am Prozess der zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung. NCX sind dabei vornehmlich homogen, aber präferentiell in den T-Tubulären Strukturen der sarkolemmalen Membran lokalisiert^[22].

Das Auftreten von Inhomogenitäten und Regionen schneller bzw. langsamer Ca^{2+} -Entfernung war nach dieser Intervention nach wie vor beobachtbar.

NCX

Wir untersuchten nun den direkten Einfluss des NCX auf die subzellulären Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung. Die pharmakologische Intervention mit dem NCX-Blocker SEA-0400 führte zu einer Reduktion der Zeit bis zur vollständigen Entfernung des zytosolischen Ca^{2+} . Dabei zeigte die Substanz jedoch keine präferentielle Wirkung in Regionen langsamer oder schneller Ca^{2+} -Entfernung. Des Weiteren kam es zu keiner Veränderung im räumlichen Auftreten der Regionen schneller bzw. langsamer Ca^{2+} -Entfernung. Diese Ergebnisse decken sich mit NCX-Distributionsstudien von Scriven et al.^[21]. Die Autoren konnten unter Verwendung von Antikörper-vermittelten, NCX-spezifischen Markierungen zeigen, dass es sich um ein relativ homogen verteiltes Protein handelt.

Eine direkte Beteiligung des NCX unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse der $\text{NCX}^{+/-}$ -Maus wurde zunehmend unwahrscheinlich: Es fand sich keine signifikante Änderung im Inhomogenitätsparameter Cv_{TAU} im Vergleich mit Kontrolltieren. Ein partieller globaler Knock-out des Natrium-Kalzium-Austauschers beeinflusste das Auftreten der Inhomogenitäten also nicht. Die Funktion des NCX war in diesem Modell um bis zu 40 % vermindert (Antoons et al., unveröffentlichte Daten). Ob die dabei beobachtete globale schnellere Ca^{2+} -Entfernung in diesem Tiermodell auf eine kompensatorische Überregulation oder Überexpression der SERCA zurückzuführen ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht festzustellen.

SERCA

SERCA stellt den Hauptmechanismus der globalen zytosolischen Ca^{2+} -Entfernung des Kardiomyozyten dar^[13].

Zur funktionellen pharmakologischen Beeinflussung des Proteins kamen die Substanzen CPA und Forskolin zum Einsatz. CPA hemmt SERCA hochselektiv und in der von uns verwendeten Dosierung partiell. Forskolin führt über eine cAMP-Erhöhung zur Modulation der über Proteinkinase A (PKA) gesteuerten Phospholamban-Phosphorylierung und damit der SERCA-Aktivität^[64]. Des Weiteren kommt es zu einer Verstärkung der systolischen SR- Ca^{2+} -Freisetzung über den RYR und eine Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle.

Während CPA präferentiell in den SlowCaR eine Verlangsamung der Ca^{2+} -Entfernung bewirkte, führte Forskolin in SlowCaR zu einer stärkeren Beschleunigung der Ca^{2+} -Entfernung. Es zeigte sich also ein besseres Ansprechen der SlowCaR auf unsere SERCA spezifischen pharmakologischen Interventionen. Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionelle Kompartimentalisierung in der Zelle als Ursache der Inhomogenitäten. SERCA2a/2b als in der Ca^{2+} -Entfernung dominante Isoformen in humanen Kardiomyozyten sind vor allem in T-Tubulus-Nähe und im Bereich des longitudinalen SRs anzutreffen^[77]. Andere Autoren beschrieben eine erhöhte Dichte und Kompartimentalisierung des Proteins im longitudinalen SR sowie in den terminalen Zisternen in RYR-Nähe^[78]. Es könnte sich also bei SlowCaR um RYR-nahe Bereiche oder um Regionen mit größerem SERCA-Rekrutierungspotential, vermutlich im longitudinalen SR, handeln. Nichtsdestotrotz besteht natürlich auch die Möglichkeit einer vergleichbaren subzellulären lokalen SERCA-Aktivität, wobei eine SERCA-Hemmung/-Aktivierung in einigen Bereichen durch Ca^{2+} -Entfernungsmechanismen stärker bzw. schwächer kompensiert werden könnte. Auch dies wäre eine Erklärung für das stärkere Ansprechen von SlowCaR auf eine SERCA spezifische pharmakologische Intervention.

MITOCHONDRIEN

Eine potentielle funktionelle oder strukturelle Beteiligung an der Entstehung der Inhomogenitäten stellen Mitochondrien dar. Mit dem MCU verfügen sie über ein wesentliches Protein zur Ca^{2+} -Entfernung.

Die Art und Weise wie dieser Transporter arbeitet wird nach wie vor kontrovers diskutiert (vgl. oben): So beschreiben mehrere Gruppen eine Beat-to-Beat abhängige Ca^{2+} -Internalisierung^[32, 35, 36], während andere Autoren von einer rein kontinuierlichen, langsamen Ca^{2+} -Entfernung sprechen^[33, 34]. Die vorliegenden Daten sprechen für eine Beat-to-Beat abhängige Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien: So fanden sich FastCaR signifikant häufiger in Bereichen mitochondrialen Signals. Des Weiteren war die Wirkung der MCU-Hemmung in FastCaR ausgeprägter bzw. eine potentielle Kompensation des MCU-Ausfalls in SlowCaR größer (vgl. Abbildung 47): Diese Indizien deuten auf den MCU als den, in der Entstehung von Beat-to-Beat konstanten FastCaR, ausschlaggebenden Mechanismus hin.

Eine weitere Erklärung für die Assoziation mitochondrialer Signale mit FastCaR könnte die funktionelle Koppelung mitochondrialer Strukturen mit SERCA sein. Verschiedene Studien lieferten bereits Hinweise auf eine Verbindung dieser beiden Zellkomponenten. Belke et al. berichten von einer Zunahme der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration in Mäusen mit genetischer SERCA-Überexpression^[79]. Ob diese Tatsache einer Interaktion zwischen SERCA und Mitochondrien oder einer generellen Ca^{2+} -Überladung unter diesen Bedingungen geschuldet ist, bleibt ungeklärt. Auch andere Gruppen beschreiben eine enge Interaktion zwischen Mitochondrien und Sarkoplasmatischem Retikulum. Boncompagni et al. fanden mittels Elektronenmikroskopie gar eine physikalische Verbindung zwischen der äußeren mitochondrialen Membran und den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern^[80].

Allerdings war in FastCaR und somit in Arealen mit stärkerem mitochondrialen Signal, eine pharmakologische Modulation der SERCA weniger effektiv. Diese Mitochondrien könnten daher eher in der Nähe des RYR als der SERCA sein und damit in FastCaR wesentlich zur Ca^{2+} -Entfernung beitragen. Wir beobachteten signifikant seltener eine Assoziation zwischen SlowCaR und positivem Mitotracker-Signal. Beide Beobachtungen sind vereinbar mit RYR-assoziierten mitochondrialen Subpopulationen^[29, 81] und dem generellen Vorkommen SR-ferner und SR-naher mitochondrialer Mikrodomänen^[38]. Organellen in der Nähe von RYR sind bei der Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR einer wesentlich höheren lokalen Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt, als es dem zytosolischen Mittel entspricht. Diese „Mikrodomänen“ hoher lokaler Ca^{2+} -Konzentration könnten zu einer Population von Mitochondrien führen, die Ca^{2+} auf Beat-to-Beat Grundlage internalisieren, während andere eher kontinuierlich und Ca^{2+} -Transienten-unabhängig, Ca^{2+} aufnehmen^[29].

Mackenzie et al. zeigten in atrialen Kardiomyozyten, dass Mitochondrien in der Lage sind, die Diffusion von Ca^{2+} im Zytosol im Rahmen der CICR zu beeinflussen^[82]. Dabei verglichen sie das Ca^{2+} -Signal in peripheren und zentralen Bereichen Rhod-2 gefärbter Zellen vor und nach Gabe von Antimycin/Oligomycin. Nach Depolarisation und damit „Inaktivierung“ der mitochondrialen Membran zeigte sich eine Zunahme der Zell-zentralen Amplitude der Ca^{2+} -Transienten. Diese Intervention führte somit zu einer Verringerung der mitochondrialen Pufferwirkung im Rahmen der CICR. Auch in unserem Modell könnte dies zur Entstehung der Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -

Entfernung beitragen. Gegen diese These spricht die Tatsache, dass dies unter anderem die maximale lokale systolische Ca^{2+} -Konzentration und somit auch F_{peak} beeinflussen würde. Wir konnten allerdings feststellen, dass zwischen F_{peak} und Tau lediglich ein geringer Zusammenhang besteht.

Zusammenfassend könnten Mitochondrien in FastCaR einen größeren Beitrag zur Ca^{2+} -Entfernung leisten und lokal die Ca^{2+} -Entfernung beschleunigen, während SERCA in SlowCaR den dominanten Mechanismus der Ca^{2+} -Entfernung darstellt. Eine strukturelle Heterogenität der mitochondrialen Population könnte Ursache für das generelle Auftreten der Ca^{2+} -Entfernungs-Inhomogenitäten im Sinne von SlowCaR und FastCaR und die stärkere SERCA-spezifische pharmakologische Beeinflussbarkeit der SlowCaR sein.

LOKALE PUFFERUNG

Zudem muss die Frage der Beteiligung von Ca^{2+} -Pufferung an der Entstehung der Inhomogenitäten diskutiert werden. Berlin et al. unterschieden zwischen zwei verschiedenen Arten von zytosolischen Ca^{2+} -Puffern: Stationären, langsamen Puffern wie $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{+}$ -Bindungsstellen an Troponin C und Myosin sowie schnellen Puffern wie Calmodulin^[83].

Die Arbeitsgruppe von Eisner konnte zeigen, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung das Erscheinungsbild eines systolischen Ca^{2+} -Transienten abhängig von der Sättigung beeinflussen kann^[84]. Es erscheint daher möglich, dass eine vorbestehende Sättigung der Ca^{2+} -Puffer insbesondere der stationären Ca^{2+} -Puffer in FastCaR die Ursache für eine erhöhte Konzentration an freiem Ca^{2+} und damit eine schnellere Entfernung des Ca^{2+} aus dem Zytosol ist. Eine lokale Sättigung der stationären Ca^{2+} -Puffer durch Ca^{2+} setzt jedoch eine vorbestehende Erhöhung der lokalen $[\text{Ca}^{2+}]$ voraus. Da in der vorliegenden Studie jedoch nur ein schwacher Zusammenhang zwischen der lokalen Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und der Kinetik der Ca^{2+} -Entfernung bestand (vgl. oben), ließe sich eine lokale Sättigung der Ca^{2+} -Puffer nur durch länger bestehende, Herzzyklus-unabhängige, intrazelluläre Ca^{2+} -Gradienten erklären, die mit einer freien Diffusion des Ca^{2+} im Zytosol unvereinbar sind.

ANDERE ERKLÄRUNGSANSÄTZE

Die Beobachtung der Inhomogenitäten konnte nicht mit einer der verwendeten Methoden (Feld-Stimulation) in Verbindung gebracht werden, da es auch in „whole-cell“ gepatchten Zellen (Daten nicht gezeigt) zum Auftreten der Ca^{2+} -Entfernungs-Inhomogenitäten kam.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ergibt sich aus der mechanischen Kontraktion der Zelle: Unterschiedlich starke Zellbewegungen könnten einen Einfluss auf die sensible Berechnung des lokalen Taus nehmen. Wir verwendeten daher Blebbistatin oder BDM, um Kontraktionen weitestgehend zu vermindern. Das Auftreten von Artefakten, insbesondere im Zellrandbereich, ließ sich allerdings nicht komplett ausschließen und könnte die Darstellung von Inhomogenitäten beeinflussen.

Außerdem könnte eine unregelmäßige Verteilung des fluoreszierenden Farbstoffs die Ursache der damit vermeintlich inhomogenen Ca^{2+} -Entfernung sein. FastCaR und SlowCaR waren allerdings nicht nur unter Verwendung von Fluo2,3,4-AM, sondern auch nach Dialyse der Zelle mit einem nicht-esterifizierten Fluo4-Salz in der Patch-Clamping Ganzzellkonfiguration nachweisbar. Zudem

fanden sich auch in 2D-Übersichtsaufnahmen der Zellen in Maus und Schwein keine sichtbaren Farbstoffdichteunterschiede. Ein wesentlicher Beitrag der Kompartimentierung des esterifizierten Farbstoffes zu den Inhomogenitäten erscheint daher unwahrscheinlich.

IMPLIKATIONEN IM BEREICH CHRONISCHER KARDIALER ISCHÄMIE

In der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, beispielsweise im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie, sind „Steady-State“ Ca^{2+} -Transienten sowohl in ihrer Amplitude reduziert, als auch durch eine Verlangsamung des Aufschwungs und einer Verlängerung des Abschwungs charakterisiert^[10].

Es finden sich Veränderungen sowohl im Bereich der Couplons (verminderte DHPR-RYR-Kopplung^[85]) als auch eine Verminderung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes, letzteres zu weiten Teilen durch eine geringere SERCA-Aktivität verursacht. Eine Reduktion in der SERCA-Expression war eine der ersten Entdeckungen bei der näheren Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen der Herzinsuffizienz^[86]. Weitere Gruppen konnten in der Folge zeigen, dass eine Reduktion der SERCA-Expression auf mRNA und Proteinebene sowie der SERCA-Aktivität, bei erhöhter NCX-vermittelter Ca^{2+} -Entfernung^[47], charakteristisch sind. Dies dürfte zur Reduktion der Amplitude des Transienten sowie zum geringeren SR- Ca^{2+} -Gehalt beitragen.

Auch in unserem Modell der kardialen Ischämie waren die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und die Zeit bis F_{peak} signifikant niedriger als in Kontrolltieren. Der SR- Ca^{2+} -Gehalt zeigte hingegen eine Zunahme im MI-Tier – möglicherweise eine Folge reduzierter lokaler RYR-Aktivierung durch Veränderungen in der DHPR-RYR-Kopplung^[54, 85]. Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich hierbei um kein Herzinsuffizienz-Modell, sondern um frühes ischämisches Remodelling (bei insgesamt nur leicht reduzierter LVEF; vgl. Abbildung 9) handelte. Dabei ist außerdem die Tatsache anzuführen, dass Tau_{mean} in den MI-Schweinen im Vergleich mit Kontrollschweinen keinen Unterschied zeigte. Dies ist ein Hinweis auf den möglicherweise geringen Schweregrad des ischämischen Remodellings.

Wir konnten nun in diesem Modell^[54] in einer post-hoc Analyse von aufgezeichneten Ca^{2+} -Transienten, Inhomogenitäten in der subzellulären Ca^{2+} -Entfernung quantifizieren. Dabei fanden wir erstmals eine erhöhte Inhomogenität in der Ca^{2+} -Entfernung im Ischämie-Modell.

Die Gabe von Forskolin führte auch beim MI-Schwein zu einer signifikant stärkeren Wirkung auf das lokale Tau in SlowCaR. Dieses bessere Ansprechen von SlowCaR auf Forskolin auch in den MI-Tieren deutet auf einen Zusammenhang mit der SERCA hin. Inwieweit dabei die erhöhten Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung bei chronischer Ischämie einer Veränderung der mitochondrialen oder der SERCA Funktion/Lokalisation bzw. der Interaktion zwischen Mitochondrien und SERCA geschuldet ist, kann derzeit nur spekuliert werden. Unsere Versuche im Modell der Maus wären allerdings mit einem Einfluss der Mitochondrien auf die Ca^{2+} -Entfernung vereinbar. Kohlhaas et al. beschreiben im Herzinsuffizienz-Modell beim Schwein (durch chronische, operative Verengung der Aorta asc.) eine Verminderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Entfernung. Damit einhergehend beobachteten sie eine Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)^[87, 88]. Neben der Tatsache einer erhöhten $[\text{Na}^+]_i$ und damit gesteigerten mNCX-Aktivität, fanden andere Autoren eine Verringerung der MCU-Aktivität im menschlichen insuffizienten Myokard^[89]. Diese Veränderung der MCU-Aktivität in Verbindung mit einer lokalen Reduktion der

SERCA-Funktion könnten zur Zunahme der Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung, in dem von uns untersuchten Modell kardialer Ischämie, führen.

Eine direkte Folge einer stärker heterogenen Distribution bzw. Funktion der SERCA und der mitochondrialen Ca^{2+} -Entfernung im Ischämie-Modell könnte eine, bis dato noch nicht beschriebene, inhomogene subzelluläre diastolische Ca^{2+} -Belastung sein, wie wir sie in Kontrolltieren bereits erstmals verifizieren konnten. Die Auswirkungen dieser inhomogenen Ca^{2+} -Belastung werden von uns derzeit noch untersucht. Dabei könnte sie eine asynchrone Relaxation der Myofilamente verursachen und zu einer Verschlechterung der synchronen Kontraktion und Relaxation des Gesamtherzens und damit der Funktion dieses Organs als Muskelpumpe führen.

LIMITATIONEN

C_V τ_{TAU} wurde in dieser Studie als ein Parameter der subzellulären Inhomogenität in der Ca^{2+} -Entfernung verwendet. Die Normalisierung der Standardabweichung des lokalen Taus auf τ_{mean} setzt ein lineares Verhältnis zwischen diesen Parametern voraus. Diesen erwarteten linearen Zusammenhang konnten wir in unbehandelten Kardiomyozyten validieren. Ein Einfluß der TAU-modulierenden Pharmaka auf dieses Verhältnis wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Des Weiteren war die PKA vermittelte Modulation der SR Ca^{2+} -Entfernung mit Forskolin nicht auf die SERCA beschränkt und hatte beispielsweise ebenfalls eine Steigerung der Ca^{2+} -Freisetzung zur Folge. Veränderung der Ca^{2+} -Freisetzung könnten somit ebenfalls einen Einfluss auf das Auftreten von Inhomogenitäten in der Ca^{2+} -Entfernung unter Forskolin haben. Da wir allerdings, wie in Abbildung 31 und Abbildung 32 gezeigt, unter Kontrollbedingungen keine Korrelation zwischen Ca^{2+} -Freisetzung und Tau fanden, kann der Aspekt der Forskolinwirkung auf die Ca^{2+} -Freisetzung in unseren Untersuchungen vernachlässigt werden.

Im Rahmen der Messungen am $\text{NCX}^{+/-}$ -Modell, fand sich eine Beschleunigung der Kalziumentfernung. Es besteht daher nach wie vor die Frage, ob es hierbei zu einer kompensatorischen SERCA-Aktivitätsveränderung kam und die von uns beschriebenen Beobachtungen nicht $\text{NCX}^{+/-}$ -spezifischer Natur sind. Nichtsdestotrotz zeigten Patch-Clamp Experimente von Antoons et al. an Zellen des $\text{NCX}^{+/-}$ -Modells eine signifikante Reduktion des Ca^{2+} -Ein- bzw. Ausstroms durch den NCX um 40 % (unveröffentlichte Daten).

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Erstbeschreibung inhomogener diastolischer Ca^{2+} -Entfernung in isolierten Kardiomyozyten mit Hilfe verschiedener Tiermodelle und pharmakologischer Eingriffe und Aufklärung der Genese und Konsequenz dieser Inhomogenitäten.

Die Ca^{2+} -Entfernung war sowohl in Mäusen als auch in Schweinen nicht homogen und unabhängig von der maximalen Fluoreszenz (F_{peak}) und der Ca^{2+} -Freisetzung (TF50).

Dabei zeigte sich bei Modulation der SERCA-Aktivität eine signifikant ausgeprägtere Wirkung insbesondere auf Regionen langsamer Ca^{2+} -Entfernung. Eine Beteiligung der T-Tubuli und des NCX an der Entstehung der inhomogenen Ca^{2+} -Entfernung konnte mit Hilfe der Technik der Detubulierung, Verwendung eines NCX-Knockout-Modells und der Substanz SEA-0400 als unwahrscheinlich angenommen werden. Des Weiteren fand sich eine Korrelation geringen mitochondrialen Signals und SlowCaR in Fluoreszenz-Doppelfärbungen und eine stärkere pharmakologische Wirkung mitochondrien-spezifischer Blocker im Bereich von SlowCaR. Diese Daten lassen auf einen funktionellen Einfluss der SERCA in SlowCaR sowie der Mitochondrien in FastCaR schließen.

In unserem Schweine-Modell der ischämischen Kardiomyopathie fanden wir zudem eine signifikante Zunahme der Inhomogenitäten sowie auch hier eine stärkerer Beeinflussbarkeit von SlowCaR durch Forskolingabe. Diese Ergebnisse sprechen für eine SERCA-abhängige Veränderung der Ca^{2+} -Entfernung bei kardialer Dysfunktion und könnten aufgrund einer subzellulär ungleich verteilten Ca^{2+} -Konzentration zu einer Dyssynchronität der Myofilamentrelaxation und damit zu einer pathologischen Veränderung der diastolischen Herzrelaxation führen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Pschyrembel, W. and Walter de Gruyter & Co. Editorial office., *Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2011*. 262., neu bearbeitete und erweiterte Aufl. ed. 2010, Berlin ; New York: Walter de Gruyter. xxvii, 2296 p.
2. Hurst, J.W., et al., *Hurst's the heart*. 13th ed. 2011, New York: McGraw-Hill Medical.
3. Lang, *Basiswissen Physiologie*. 2 ed, Heidelberg: Springer.
4. Katz, A.M., *Physiology of the heart*. 5th ed. 2011, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. p.
5. Huxley, A.F. and R.E. Taylor, *Local activation of striated muscle fibres*. The Journal of physiology, 1958. **144**(3): p. 426-41.
6. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
7. Fabiato, A., *Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell*. The Journal of general physiology, 1985. **85**(2): p. 247-89.
8. Stern, M.D., G. Pizarro, and E. Rios, *Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. The Journal of general physiology, 1997. **110**(4): p. 415-40.
9. Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh, *Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles*. Biophysical journal, 1999. **77**(3): p. 1528-39.
10. Heinzl, F.R., et al., *Dyssynchrony of Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2011. **50**(3): p. 390-400.
11. Bassani, R.A., J.W. Bassani, and D.M. Bers, *Mitochondrial and sarcolemmal Ca2+ transport reduce [Ca2+]i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes*. The Journal of physiology, 1992. **453**: p. 591-608.
12. Bers, D.M., *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2 ed. 2011.
13. Inesi, G., A.M. Prasad, and R. Pilankatta, *The Ca2+ ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **369**(1): p. 182-7.
14. Hasselbach, W. and M. Makinose, *[The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting]*. Biochemische Zeitschrift, 1961. **333**: p. 518-28.
15. Lytton, J., et al., *Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(20): p. 14483-9.
16. Kamenzin, S., *Kontraktilität des isolierten menschlichen Kardiomyozyten - Einfluß von Calcium, Isoproterenol, Stimulationsfrequenz, Stimulationspause und Thapsigargin*.
17. Kirchberger, M.A., M. Tada, and A.M. Katz, *Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum*. The Journal of biological chemistry, 1974. **249**(19): p. 6166-73.
18. Tada, M. and A.M. Katz, *Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma*. Annual review of physiology, 1982. **44**: p. 401-23.
19. Misquitta, C.M., D.P. Mack, and A.K. Grover, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves*. Cell calcium, 1999. **25**(4): p. 277-90.
20. Philipson, K.D., S. Longoni, and R. Ward, *Purification of the cardiac Na+-Ca2+ exchange protein*. Biochimica et biophysica acta, 1988. **945**(2): p. 298-306.
21. Scriven, D.R., P. Dan, and E.D. Moore, *Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes*. Biophysical journal, 2000. **79**(5): p. 2682-91.

22. Frank, J.S., et al., *Distribution of the Na(+)-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study*. The Journal of cell biology, 1992. **117**(2): p. 337-45.
23. Philipson, K.D. and D.A. Nicoll, *Sodium-calcium exchange: a molecular perspective*. Annual review of physiology, 2000. **62**: p. 111-33.
24. Ishida, Y. and R.J. Paul, *Ca²⁺ clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice*. Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi, 2005. **41**(5): p. 235-45.
25. Abramowitz, J., et al., *Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2000. **32**(5): p. 777-89.
26. Hammes, A., et al., *Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats*. Circulation research, 1998. **83**(9): p. 877-88.
27. Oeandy, D., et al., *The regulatory function of plasma-membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) in the heart*. Biochemical Society transactions, 2007. **35**(Pt 5): p. 927-30.
28. Solaro, R.J. and F.N. Briggs, *Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Calcium binding*. Circulation research, 1974. **34**(4): p. 531-40.
29. Griffiths, E.J., D. Balaska, and W.H. Cheng, *The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1797**(6-7): p. 856-64.
30. Crompton, M. and I. Roos, *On the hormonal control of heart mitochondrial Ca²⁺*. Biochemical Society transactions, 1985. **13**(4): p. 667-9.
31. Maack, C. and B. O'Rourke, *Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics*. Basic research in cardiology, 2007. **102**(5): p. 369-92.
32. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, *Ca²⁺ cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes*. The Journal of physiology, 1993. **460**: p. 603-21.
33. Sedova, M., E.N. Dedkova, and L.A. Blatter, *Integration of rapid cytosolic Ca²⁺ signals by mitochondria in cat ventricular myocytes*. American journal of physiology. Cell physiology, 2006. **291**(5): p. C840-50.
34. Miyata, H., et al., *Measurement of mitochondrial free Ca²⁺ concentration in living single rat cardiac myocytes*. The American journal of physiology, 1991. **261**(4 Pt 2): p. H1123-34.
35. Wendt-Gallitelli, M.F. and G. Isenberg, *X-ray microanalysis of single cardiac myocytes frozen under voltage-clamp conditions*. The American journal of physiology, 1989. **256**(2 Pt 2): p. H574-83.
36. 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*. Biophysical journal, 2000. **79**(1): p. 39-50.
37. Sipido, K.R. and W.G. Wier, *Flux of Ca²⁺ across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling*. The Journal of physiology, 1991. **435**: p. 605-30.
38. Rizzuto, R. and T. Pozzan, *Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences*. Physiological reviews, 2006. **86**(1): p. 369-408.
39. Page, E., *Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology*. The American journal of physiology, 1978. **235**(5): p. C147-58.
40. Fawcett, D.W. and N.S. McNutt, *The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle*. The Journal of cell biology, 1969. **42**(1): p. 1-45.
41. Kawai, M., M. Hussain, and C.H. Orchard, *Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation*. The American journal of physiology, 1999. **277**(2 Pt 2): p. H603-9.
42. Franzini-Armstrong, C., *STUDIES OF THE TRIAD : I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers*. The Journal of cell biology, 1970. **47**(2): p. 488-99.

43. Martonosi, A., et al., *Structure of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum*. Society of General Physiologists series, 1987. **41**: p. 257-86.
44. Territo, P.R., et al., *Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(4): p. 2586-99.
45. Yoshikane, H., T. Nihei, and K. Moriyama, *Three-dimensional observation of intracellular membranous structures in dog heart muscle cells by scanning electron microscopy*. Journal of submicroscopic cytology, 1986. **18**(4): p. 629-36.
46. Herold, G., *Herold - Innere Medizin*. 2010. 939.
47. Sipido, K.R. and D. Eisner, *Something old, something new: changing views on the cellular mechanisms of heart failure*. Cardiovascular research, 2005. **68**(2): p. 167-74.
48. Houser, S.R., V. Piacentino, 3rd, and J. Weisser, *Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2000. **32**(9): p. 1595-607.
49. Beuckelmann, D.J., M. Nabauer, and E. Erdmann, *Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. Circulation, 1992. **85**(3): p. 1046-55.
50. Piacentino, V., 3rd, et al., *Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes*. Circulation research, 2003. **92**(6): p. 651-8.
51. Hasenfuss, G. and B. Pieske, *Calcium cycling in congestive heart failure*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2002. **34**(8): p. 951-69.
52. Nguidjoe, E., et al., *Heterozygous Inactivation of the Na/Ca Exchanger Increases Glucose-Induced Insulin Release, {beta}-Cell Proliferation, and Mass*. Diabetes, 2011.
53. Weidemann, F., et al., *Defining the transmural viability of a chronic myocardial infarction by ultrasonic strain-rate imaging: implications for identifying intramural viability: an experimental study*. Circulation, 2003. **107**(6): p. 883-8.
54. Heinzl, F.R., et al., *Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca²⁺ release in myocytes from chronically ischemic myocardium*. Circulation research, 2008. **102**(3): p. 338-46.
55. Freidl, P., *Frühe Veränderungen der Calcium Homöostase und Remodelling der T-Tubuli in β1-transgenen Mäusen*. 2010.
56. *Invitrogen.com*. 2011 [cited 2011 06.2011].
57. Sacherer, M., *Modulation der Ca²⁺ Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Digitalis und JTV519 in Herzmuskelzellen der Maus*. 2010: Graz.
58. Matsuda, T., et al., *SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2001. **298**(1): p. 249-56.
59. Nagy, Z.A., et al., *Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed after depolarization in canine heart*. British journal of pharmacology, 2004. **143**(7): p. 827-31.
60. Ozdemir, S., et al., *Pharmacological inhibition of na/ca exchange results in increased cellular Ca²⁺ load attributable to the predominance of forward mode block*. Circulation research, 2008. **102**(11): p. 1398-405.
61. Weidenbörner, M., *Lebensmittel-Mykologie*. 1999.
62. Bioscience, T. *Structure of forskolin*. Available from: <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=2337>.
63. Tang, W.J. and J.H. Hurley, *Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases*. Molecular pharmacology, 1998. **54**(2): p. 231-40.
64. Daly, J.W., *Forskolin, adenylyl cyclase, and cell physiology: an overview*. Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research, 1984. **17**: p. 81-9.

65. Santana, L.F., et al., *Functional coupling of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes*. The Journal of physiology, 2002. **544**(Pt 1): p. 57-69.
66. EMD-Chemicals. *Structure of Ru360*. 2011 13.06.2011]; Available from: http://www.emdchemicals.com/life-science-research/ru360/EMD_BIO-557440/p_1TSb.s1OYOAAAAErL8JYr4gm.
67. Griffiths, E.J., *Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2009. **46**(6): p. 789-803.
68. Seguchi, H., et al., *Propagation of Ca²⁺ release in cardiac myocytes: role of mitochondria*. Cell calcium, 2005. **38**(1): p. 1-9.
69. Heinzl, F.R., et al., *Spatial and temporal inhomogeneities during Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes*. Circulation research, 2002. **91**(11): p. 1023-30.
70. Brette, F. and C. Orchard, *T-tubule function in mammalian cardiac myocytes*. Circulation research, 2003. **92**(11): p. 1182-92.
71. Song, L.S., et al., *Orphaned ryanodine receptors in the failing heart*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(11): p. 4305-10.
72. Hove-Madsen, L. and D.M. Bers, *Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes*. Circulation research, 1993. **73**(5): p. 820-8.
73. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, *Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms*. The Journal of physiology, 1994. **476**(2): p. 279-93.
74. Cheng, H., et al., *Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes*. The American journal of physiology, 1996. **270**(1 Pt 1): p. C148-59.
75. Balijepalli, R.C., et al., *Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure*. Cardiovascular research, 2003. **59**(1): p. 67-77.
76. Louch, W.E., et al., *Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules—a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes*. Cardiovascular research, 2004. **62**(1): p. 63-73.
77. Dally, S., et al., *Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **48**(4): p. 633-44.
78. Meissner, G., *Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles*. Biochimica et biophysica acta, 1975. **389**(1): p. 51-68.
79. Belke, D.D., et al., *Increased expression of SERCA in the hearts of transgenic mice results in increased oxidation of glucose*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2007. **292**(4): p. H1755-63.
80. Boncompagni, S., et al., *Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures*. Molecular biology of the cell, 2009. **20**(3): p. 1058-67.
81. Spat, A., et al., *High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling*. Cell calcium, 2008. **44**(1): p. 51-63.
82. Mackenzie, L., et al., *The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction*. Journal of cell science, 2004. **117**(Pt 26): p. 6327-37.
83. Berlin, J.R., J.W. Bassani, and D.M. Bers, *Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes*. Biophysical journal, 1994. **67**(4): p. 1775-87.
84. Diaz, M.E., A.W. Trafford, and D.A. Eisner, *The role of intracellular Ca buffers in determining the shape of the systolic Ca transient in cardiac ventricular myocytes*. Pflügers Archiv : European journal of physiology, 2001. **442**(1): p. 96-100.

85. Gomez, A.M., et al., *Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure*. Science, 1997. **276**(5313): p. 800-6.
86. Mercadier, J.J., et al., *Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure*. The Journal of clinical investigation, 1990. **85**(1): p. 305-9.
87. Kohlhaas, M., et al., *Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes*. Circulation, 2010. **121**(14): p. 1606-13.
88. Javadov, S. and M. Karmazyn, *Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection*. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2007. **20**(1-4): p. 1-22.
89. Michels, G., et al., *Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca²⁺ uptake by 2 different voltage-gated Ca²⁺ channels*. Circulation, 2009. **119**(18): p. 2435-43.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: MECHANISMEN DER KALZIUMHOMÖOSTASE	10
ABBILDUNG 2: ANTEIL DER EINZELNEN KOMPONENTEN AN DER ZYTOSOLISCHEN KALZIUMENTFERNUNG	11
ABBILDUNG 3: RELATIVER KALZIUMFLUSS IN DAS SR	11
ABBILDUNG 4: MECHANISMEN MITOCHONDRIALER KALZIUMHOMÖOSTASE	14
ABBILDUNG 5: MECHANISMEN MITOCHONDRIALER KALZIUMHOMÖOSTASE: HEMMMÖGLICHKEITEN	14
ABBILDUNG 6: T-TUBULI IN EINEM MAUS-KARDIOMYOZYTEN	16
ABBILDUNG 7: AUSSCHNITT AUS EINEM KARDIALEN MYOZYTEN	17
ABBILDUNG 8: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER HERZMUSKELZELLE	18
ABBILDUNG 9: IN VIVO MYOKARDFUNKTION IM ISCHÄMIE-MODELL	23
ABBILDUNG 10: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTRUM VON FLUO4-AM	25
ABBILDUNG 11: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTRUM VON DI8-ANEPPS	25
ABBILDUNG 12: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTRUM VON WGA-ALEXA	26
ABBILDUNG 13: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINES MAUSKARDIOMYOZYTEN	29
ABBILDUNG 14: STRUKTUR VON SEA-0400	30
ABBILDUNG 15: STRUKTUR VON CPA	30
ABBILDUNG 16: STRUKTUR VON FORSKOLIN	31
ABBILDUNG 17: EFFEKTE VON FORSKOLIN	31
ABBILDUNG 18: STRUKTUR VON RU360	32
ABBILDUNG 19: PROTOKOLL 2, 3, 4	32
ABBILDUNG 20: FLUO4-AM BELADENE BEISPIELZELLE	33
ABBILDUNG 21: PROTOKOLL 1	33
ABBILDUNG 22: KONFOKALE AUFNAHME EINER BEISPIELZELLE MIT MITOTRACKER RED FM UND FLUO4-AM DOPPELFÄRBUNG	34
ABBILDUNG 23: KONTROLLMAUSKARDIOMYOZYTEN IN T-TUBULI SPEZIFISCHER FLUORESCENZFÄRBUNG	34
ABBILDUNG 24: „STEADY-STATE“-LINESCAN	35
ABBILDUNG 25: DIAGRAMM EINES LOKALEN KALZIUMTRANSIENTEN	36
ABBILDUNG 26: GEMITTELTER KALZIUMTRANSIENT	36
ABBILDUNG 27: INHOMOGENITÄTEN IN DER KALZIUMENTFERNUNG BEI EINEM MAUS- KONTROLLKARDIOMYOZYTEN	38
ABBILDUNG 28: KORRELATION ZWISCHEN τ , RT50 UND RT90.	39
ABBILDUNG 29: UNTERSCHIED IN τ ZWISCHEN FASTCAR UND SLOWCAR	39
ABBILDUNG 30: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MITTLEREM τ UND MITTLERER STANDARDABWEICHUNG	39
ABBILDUNG 31: HISTOGRAMM-ANALYSE TF50 τ MAUS	40
ABBILDUNG 32: HISTOGRAMM-ANALYSE TF50 τ SCHWEIN	40
ABBILDUNG 33: KORRELATION ZWISCHEN LOKALEM F_{PEAK} UND LOKALEM τ	40
ABBILDUNG 34: DETUBULIERTE ZELLE, ZENTRALER UND PERIPHERER KALZIUMTRANSIENT	41
ABBILDUNG 35: DETUBULIERTE BEISPIELZELLE	41
ABBILDUNG 36: DYSSYNCHRONITÄT DER KALZIUM-ENTFERNUNG IN MAUS UND SCHWEIN	42
ABBILDUNG 37: SCHWEINE ZEIGEN EINE HÖHERE INHOMOGENITÄT IN DER KALZIUMWIEDERAUFNAHME ALS MÄUSE	42
ABBILDUNG 38: WIRKUNG VON SEA0400 ANHAND EINER REPRÄSENTATIVEN BEISPIELZELLE	43
ABBILDUNG 39: VERGLEICH DES EINFLUSSES VON SEA AUF REGIONEN SCHNELLER BZW. LANGSAMER KALZIUMENTFERNUNG	44
ABBILDUNG 40: NCX-KNOCKOUT MAUSMODELL	44
ABBILDUNG 41: WIRKUNG VON FORSKOLIN ANHAND EINER REPRÄSENTATIVEN BEISPIELZELLE	45
ABBILDUNG 42: WIRKUNG VON FORSKOLIN AUF BEREICHE SCHNELLERER BZW. LANGSAMERER KALZIUMENTFERNUNG, BEISPIELZELLEN	46

ABBILDUNG 43: VERGLEICH DES EINFLUSSES VON FORSKOLIN AUF REGIONEN SCHNELLER BZW. LANGSAMER KALZIUMENTFERNUNG	46
ABBILDUNG 44: WIRKUNG VON CPA ANHAND EINER REPRÄSENTATIVEN BEISPIELZELLE	47
ABBILDUNG 45: VERGLEICH DES EINFLUSSES VON CPA AUF REGIONEN SCHNELLER BZW. LANGSAMER KALZIUMENTFERNUNG	48
ABBILDUNG 46: MITOTRACKER RED FM BEISPIELZELLE	49
ABBILDUNG 47: VERGLEICH DES EINFLUSSES VON RU360 AUF REGIONEN SCHNELLER BZW. LANGSAMER KALZIUMENTFERNUNG.	50
ABBILDUNG 48: INHOMOGENITÄTEN DER KALZIUMENTFERNUNG IM MI-SCHWEIN	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca²⁺]	Kalziumkonzentration	MCU	Mitochondrialer Kalziumuniporter
[Ca²⁺]_o,	Extrazelluläre bzw. intrazelluläre	M.W.	Molekulargewicht
[Ca²⁺]_i	Kalziumkonzentration	Mean Tau	Mittleres Tau eines Gesamtkalziumtransienten
[Ca²⁺]_m	Mitochondriale Kalziumkonzentration	mg	Milligramm
[Na⁺]_o	Extrazelluläre Natriumkonzentration	MI	Herzinfarkt
μl	Mikroliter	min	Minute
μm	Mikrometer	mm	Millimeter
AM	Azetoxymethylester	mM	Millimolar
ANEPPS	Amino-naphthyl-ethylen-pyridinium-propyl-sulfonat	mNCX	mitochondrialer Natrium Kalzium Austauschere
AP	Aktionspotential	mol/l	Konzentration (Molarität pro Liter)
AU	Arbitrary unit	MTR	Mitotracker
BDM	Butanedione-Monoxime	n	Zahl
Ca²⁺	Kalzium	Na⁺	Natrium
CaMKII	Calmodulin abhängige Proteinkinase 2	NaCl	Natriumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
CICR	Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung	NaOH	Natronlauge
CPA		NCX	Natrium Kalzium Austauschere
CTRL	Kontrolltier	NCX^{+/-}	NCX-Knock-Out-Mausmodell
CV tau	Variationskoeffizient von Tau	nm	Nanometer
DHPR	Dihydropyrimidinrezeptor	NT	Tyrode-Lösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	p	Signifikanzwert
F	Intensität der Fluoreszenz	pH	Dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen-Konzentration
F/F₀	Bzgl. diastolischer Werte (F ₀) normalisierte Fluoreszenz	R²	Linearer Korrelationskoeffizient
FastCaR	Region (1 μm) schneller Kalziumentfernung	RT50	Zeit bis zum halbmaximalen Abfall des Kalziumtransienten
F_o	Diastolische Fluoreszenz	RT90	Zeit bis zu 90% Abfall des Kalziumtransienten
Forsk	Forskolin	RYR	Ryanodinrezeptor
F_{peak}	Maximale Fluoreszenz während eines Kalziumtransienten	SEM	Standard Fehler des Mittelwerts
FVBN/WT	Mauslinie	SERCA	SR Ca ATPase
HF	Herzinsuffizienz	SlowCaR	Region (1 μm) langsamer
Hz	Herz (Frequenz)		

K⁺	Kalium	SR	Kalziumentfernung Sarkoplasmatisches Retikulum
KCl	Kaliumchlorid	Tau	Zeitkonstante; Zeitraum eines exponentiell absinkenden Prozesses auf 1/e des Ausgangswertes
kg	Kilogramm	TF50	Zeit bis zur halbmaximalen Fluoreszenz
LiCl	Lithiumchlorid		

DANKSAGUNG

Der größte Dank gebührt Frank Heinzl, der mich während der über zweijährigen Forschungsarbeiten auf einmalige Weise unterstützt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Dank seiner hervorragenden Betreuung, seinen Ideen und seinem unermüdlichen Einsatz, wurde diese Arbeit erst möglich.

Ich bedanke mich außerdem bei Simon Sedej, Michael Sacherer und Niall MacQuaide. Ihnen verdanke ich die Einführung in die experimentellen Methoden und Hilfestellungen bei den kleinen und großen Problemen in der Durchführung der Experimente.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Karin Sipido (Leuven) und Herrn Professor Burkert Pieske (Graz), die als Leiter ihrer jeweiligen Abteilung für Kardiologie, die Rahmenbedingungen für experimentelle Forschungsarbeiten wie diese schaffen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name:	Felix Hohendanner
Geburtsdatum:	14.02.1986
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Studium und Schulausbildung:

Studium:	Humanmedizin Medizinische Universität Graz 2005 – 2011 Universität Leuven, Belgien 2010
Abitur:	Gisela-Gymnasium München 2005

Pflichtpraktika während des Studiums:

Famulatur	Abt. für Kardiologie Klinikum München Bogenhausen 2007
Famulatur	Abt. für Kardiologie LKH Graz West 2008
Famulatur	Abt. für Gastroenterologie Klinikum München Pasing 2009
Famulatur	Institut für Klinische Radiologie Klinikum der Universität München 2009
Famulatur	Abt. für Neurologie Klinikum München Pasing 2010
6. Studienjahr	Klinische Abteilung für Allgemeine Pädiatrie LKH Universitätsklinikum Graz 2011
6. Studienjahr	Pflichtpraktikum Allgemeinmedizin 2011
6. Studienjahr	Klinik für Anästhesiologie m. S. op. Intensivmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin 2011
6. Studienjahr	Deutsches Herzzentrum München Klinik an der Technischen Universität München 2011