

**Diplomarbeit**

Zellkernmorphologie und Lokalisation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -  
Regulationsproteine in Kardiomyozyten mit Ryanodin-  
Rezeptor-Mutation

eingereicht von

**Martin Wernhart**

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Abteilung für Kardiologie  
Universitätsklinik für Innere Medizin**

unter der Anleitung von

Ass. Prof. Dr. Simon Sedej

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 26.07.2015*

*Martin Wernhart eh*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DEFINITION, ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER HERZINSUFFIZIENZ	1
1.2	DIE ROLLE VON KALZIUM IN VENTRIKULÄREN KARDIOMYOZYTEN	1
1.2.1	Die zelluläre Ca <sup>2+</sup> -Homöostase und die elektromechanische Koppelung	2
1.2.2	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Regulationsproteine	4
1.2.3	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Speicher: SR und Zellkernhülle	8
1.2.4	Die nukleäre Ca <sup>2+</sup> -Homöostase	10
1.3	PATHOPHYSIOLOGISCHES Ca <sup>2+</sup> -SIGNALING: DAS KARDIALE REMODELING	11
1.3.1	Morphologische Adaptation	11
1.3.2	Ca <sup>2+</sup> -abhängige molekulare Mechanismen der Hypertrophie	11
1.4	HAUPTFRAGESTELLUNGEN, HYPOTHESEN UND ZIELE	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	MAUSMODELL	16
2.1.1	Operative Interventionen	16
2.2	REAGENZIEN	17
2.3	LÖSUNGEN UND FLUORESCENZMARKER	18
2.3.1	Lösungen zur Myozytenisolation	18
2.3.2	Fluorophor und Antikörper	19
2.4	ISOLATION VENTRIKULÄRER HERZMUSKELZELLEN	20
2.5	ZELLKERNBELADUNG	21
2.6	IMMUNZYTOCHEMIE	22
2.7	KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE (LSM)	23
2.7.1	Messungsablauf	24
2.8	AUSWERTUNG	25
2.9	STATISTISCHE ANALYSE	25
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	RYR2-GENOTYPISIERUNG	27
3.2	ENTWICKLUNG KARDIALER HYPERTROPHIE DURCH DRUCKLASTERHÖHUNG	27
3.3	REMODELING DER ZELLKERNMEMBRAN DURCH DRUCKLASTERHÖHUNG	29
3.4	PERINUKLEÄRE LOKALISATION VON INTRAZELLULÄREN Ca <sup>2+</sup> -REGULATIONSPROTEINEN BEI KARDIALEM REMODELING	34
3.4.1	RyR2	34
3.4.2	InsP <sub>3</sub> R2	35
3.4.3	Doppelbeladung: RyR2 + InsP <sub>3</sub> R2	36
3.4.4	CASQ2	37
3.4.5	SERCA2a	38
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
4.1	QUANTIFIZIERUNG KARDIALER HYPERTROPHIE	40
4.2	SUBZELLULÄRES REMODELING IN VENTRIKULÄREN KARDIOMYOZYTEN DURCH DRUCKLASTERHÖHUNG	40
4.2.1	Morphologie der Zellkernhülle	40
4.2.2	Lokalisation der Ca <sup>2+</sup> -Regulationsproteine	42
4.3	LIMITATIONEN	44
4.4	KLINISCHER AUSBLICK	44
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>46</b>

## Glossar und Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AM	Acetoxymethyl
AT-II	Angiotensin-II
ATP	Adenosintrisphosphat
$[Ca^{2+}]_{cyto}$	Zytoplasmatische $Ca^{2+}$ -Konzentration
$[Ca^{2+}]_{nuc}$	Nukleäre $Ca^{2+}$ -Konzentration
$[Ca^{2+}]_{SR}$	$Ca^{2+}$ -Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum
CaM	Calmodulin
CaMKII	$Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CaN	Calcineurin
CASQ	Calsequestrin
CaTs	$Ca^{2+}$ -Transienten
CICR	$Ca^{2+}$ -induzierte $Ca^{2+}$ -Freisetzung (Engl. <i>Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release</i> )
CPVT	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (Engl. <i>catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia</i> )
DAD	Späte Nachdepolarisation (Engl. <i>delayed afterdepolarisation</i> )
DAG	Diacylglycerol
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ECC	elektromechanische Koppelung (Engl. <i>excitation-contraction coupling</i> )
ET-1	Endothelin-1
ETC	Elektrotranskriptionelle Koppelung (Engl. <i>excitation-transcription coupling</i> )
fSR	Freier Abschnitt des sarkoplasmatischen Retikulums
GATA4	GATA-Bindungsprotein 4 (Engl. <i>GATA binding protein 4</i> )
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (Engl. <i>G-protein coupled receptor</i> )
HDAC5	Histon-Deacetylase 5
HG/KG	Herzgewicht/Körpergewicht
HG/TL	Herzgewicht/Tibiallänge

HI	Herzinsuffizienz
INM	Innere Zellkernmembran (Engl. <i>inner nuclear membrane</i> )
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
InsP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
JCN	Junktin
jSR	Junktionaler Abschnitt des sarkoplasmatischen Retikulums
KHK	Koronare Herzkrankheit
MEF2	Engl. <i>myocyte enhancer factor 2</i>
miRNA	Mikro-RNA
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher (Engl. <i>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger</i> )
NFAT3	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen 3 (Engl. <i>nuclear factor of activated T-cells 3</i> )
NLS	Kernlokalisierungssignal (Engl. <i>nuclear localisation sequence</i> )
NPC	Zellkernporen (Engl. <i>nuclear pore complexes</i> )
NR	Nukleoplasmatisches Retikulum
ONM	Äußere Zellkernmembran (Engl. <i>outer nuclear membrane</i> )
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLN	Phospholamban
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Engl. <i>sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> )
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	Transaortale Konstriktion
Tn/Tm	Troponinkomplex/Tropomyosin
TRD	Triadin
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: ELEKTROMECHANISCHE KOPPELUNG (ECC)	4
ABBILDUNG 1.2: ZELLKERNHÜLLE	9
ABBILDUNG 1.3: SIGNALTRANSDUKTION BEI KARDIALER HYPERTROPHIE	13
ABBILDUNG 1.4: ARBEITSMODELL	15
ABBILDUNG 2.1: DIE EXPERIMENTELLE METHODIK	26
ABBILDUNG 3.1: IMMUNOBLOT ZUR RYR2-GENOTYPISIERUNG	27
ABBILDUNG 3.2: HERZGEWICHT-KÖRPERGEWICHT VERHÄLTNIS UND HERZGEWICHT-TIBIALÄNGE VERHÄLTNIS	28
ABBILDUNG 3.3: REMODELING DER ZELLKERNMEMBRAN BEI DRUCKLAST-INDUZIERTER HYPERTROPHIE	29
ABBILDUNG 3.4 BALKENDIAGRAMME ZUR ZELLKERNPARAMETER-ANALYSE	31
ABBILDUNG 3.5 KORRELATION ZWISCHEN ZELLKERNLÄNGE UND ZELLKERNUMFANG	32
ABBILDUNG 3.6 KORRELATION ZWISCHEN ZELLKERNBREITE UND ZELLKERNUMFANG	32
ABBILDUNG 3.7: BOXPLOT-DIAGRAMME ZUR ZELLKERNPARAMETER-ANALYSE	33
ABBILDUNG 3.8: ANORDNUNG VON RYR2 BEI KARDIALEM REMODELING DURCH DRUCK-INDUZIERTER ÜBERLAST	35
ABBILDUNG 3.9: ANORDNUNG VON INSP <sub>3</sub> R2 BEI KARDIALEM REMODELING DURCH DRUCK-INDUZIERTER ÜBERLAST	36
ABBILDUNG 3.10: CO-LOKALISIERUNG VON RYR2 UND INSP <sub>3</sub> R2 BEI KARDIALEM REMODELING DURCH DRUCK-INDUZIERTER ÜBERLAST	37
ABBILDUNG 3.11: ANORDNUNG VON CASQ2 BEI KARDIALEM REMODELING DURCH DRUCK-INDUZIERTER ÜBERLAST	38
ABBILDUNG 3.12: ANORDNUNG VON SERCA2A BEI KARDIALEM REMODELING DURCH DRUCK-INDUZIERTER ÜBERLAST	39

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1: BENÖTIGTE REAGENZIEN IN ALPHABETISCHER GLIEDERUNG	17
TABELLE 2.2: ANGESETZTE LÖSUNGEN ZUR MYOZYTENISOLATION	18
TABELLE 2.3: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER	20
TABELLE 2.4: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER	20
TABELLE 2.5: GEKOPPELTE PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTIKÖRPER	22
TABELLE 3.1: ZUSAMMENFASSUNG DER ZELLKERNPARAMETER	30

## Zusammenfassung

Der kardiale Ryanodin-Rezeptor (RyR2) ist ein intrazellulärer (zytosolisch und perinukleär)  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal, der eine zentrale Rolle in der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Kontraktion in kardialen Myozyten einnimmt.

Anomalitäten der RyR2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) fördern kontraktile Dysfunktion und  $\text{Ca}^{2+}$ -mediertes myokardiales Remodeling (z.B. Hypertrophie). Veränderungen der nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflussen die Transkription (Genexpression) und sind damit in Remodeling-Prozessen wie der Entwicklung von Hypertrophie und der Progression zur Herzinsuffizienz (HI) involviert.

Diese Studie hatte die Charakterisierung frühzeitiger Veränderungen der Zellkernmorphologie und der subzellulären Organisation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine in ventrikulären Kardiomyozyten mit kongenitaler RyR2-Dysfunktion bei artifizieller Drucküberlast zum Ziel.

Wildtyp (WT) und RyR2<sup>R4496C+/-</sup> Mäuse, eine heterozygote Gain-of-Function-Mutation (R4496C) des RyR2 tragend, wurden operativen Interventionen ohne (Sham=Kontrolle) oder mit transaortaler Konstriktion (TAC) zur Induktion von Drucküberlast (HI-Modell) unterzogen. Ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden 7 Tage nach dem Sham-/TAC-Eingriff isoliert und mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Mag-Fluo-4/AM oder mit Fluoreszenzmolekül-markierten Antikörpern (Immunzytochemie) konjugiert. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde die Zellkerngröße (Länge, Breite und Umfang), die Struktur der Zellkernhülle und die (peri)nukleäre Lokalisation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen visualisiert und nachfolgend analysiert.

Die Färbung der Zellkernmembran enthüllte ein Netzwerk tubulärer Strukturen, welches den Zellkern durchzieht. Im Basalzustand hatten R4496C-Sham-Kardiomyozyten eine signifikant verminderte Anzahl an tubulären Strukturen als WT-Sham-Herzmuskelzellen, während die anderen nukleären Parameter ähnlich waren. Im Stresszustand (induziert mittels TAC) wiesen die Zellkerne der WT- und R4496C-Gruppe Reduktionen der Invaginationsanzahl und der Invaginationen-zu-Umfang-Ratio sowie Erhöhungen der nukleären Breite und des Umfanges im Vergleich mit allen Sham-Nuklei auf (alle  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz zu WT-Zellen war die Zellkernlänge in R4496C-TAC-Kardiomyozyten in signifikantem Ausmaß erhöht. Die Untersuchung der (peri)nukleären Lokalisation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen zeigte auf, dass WT- und R4496C-TAC-Kardiomyozyten eine

Reduktion an RyR2, Calsequestrin 2 (CASQ2) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums 2a (SERCA2a), jedoch eine Zunahme der Fluoreszenzsignalintensität des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors Typ 2 (InsP<sub>3</sub>R2) aufweisen. Es wurden keine Veränderungen der Lokalisation der untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine gefunden. Frühzeitige Veränderungen der Zellkernmorphologie kardialer Myozyten mit RyR2 Gain-of-Function-Mutation könnten die nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik beeinflussen und zu verstärktem myokardialen Remodeling beitragen.

## Abstract

The cardiac ryanodine receptor (RyR2) is an intracellular (cytosolic and perinuclear)  $\text{Ca}^{2+}$  release channel that plays a central role in the regulation of contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cardiac myocytes. Abnormal RyR2-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (SR) promotes contractile dysfunction and  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated myocardial remodeling (e.g. hypertrophy). Changes of the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  concentration affect transcription (gene expression) and are, thus, involved in remodeling processes, such as development of hypertrophy and heart failure (HF). This study aimed to characterize early nuclear morphological changes and subcellular organisation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulatory proteins in ventricular cardiac myocytes with a congenital RyR2 dysfunction in response to pressure overload. Wild-type (WT) and RyR2<sup>R4496C+/-</sup> mice carrying a RyR2 gain-of-function mutation (R4496C) underwent surgery without (Sham=control) or with transverse aortic constriction (TAC) to induce pressure overload (HF model). Ventricular cardiac myocytes were isolated 7 days after Sham/TAC intervention and stained with  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Mag-Fluo-4/AM or fluorescent-labelled antibodies (immunocytochemistry). The nuclear size (length, width and circumference), the structure of the nuclear envelope and the (peri)nuclear localization of  $\text{Ca}^{2+}$  regulatory proteins were visualized using laser scanning confocal microscopy and subsequently analyzed. Staining of the nuclear envelope revealed a network of tubular structures traversing the nucleus. At baseline, R4496C-Sham cardiomyocytes had significantly less tubular structures than WT-Sham cells, whereas other nuclear parameters were similar. Under stress conditions (induced by TAC) the nuclei of the different genotype-groups (WT and R4496C) showed a reduced number of invaginations, a decreased invaginations-to-circumference ratio and an increase of the nuclear width and circumference as compared to Sham nuclei (all  $p < 0.05$ ). In contrast to WT cells, the nuclear length was significantly increased in R4496C-TAC cardiomyocytes. The analysis of the (peri)nuclear localization of  $\text{Ca}^{2+}$  regulatory proteins revealed that WT- and R4496C-TAC cardiomyocytes had lower abundance of RyR2, Calsequestrin 2 (CASQ2), sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a), but increased fluorescence signal intensity of inositol-1,4,5-trisphosphat receptor type 2 (InsP<sub>3</sub>R2). We found no changes in the localization of  $\text{Ca}^{2+}$  regulatory proteins. Early changes in the nuclear morphology of cardiac myocytes harboring RyR2 gain-of-function mutation may affect nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and  $\text{Ca}^{2+}$  kinetics and contribute to adverse myocardial remodeling.

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Kontraktionsstörungen des Arbeitsmyokards führen zur systolischen Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfsfraktion (Engl. *heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF). Hingegen zeigt die diastolische Herzinsuffizienz (Engl. *heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF) eine Verminderung der Dehnbarkeit (Compliance) und Relaxation des linken Ventrikels in der Diastole mit konsekutiver Reduktion des enddiastolischen Volumens und des Schlagvolumens (1).

Weltweit wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz auf 38 Millionen betroffene Patienten geschätzt (2). Durch die zunehmende Alterung der Bevölkerung und des gehäuftten Auftretens von Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Adipositas) ist in den kommenden Jahren ein Anstieg der Inzidenz zu erwarten (3,4). Weitere Risikofaktoren und Prämorbiditäten zur Entwicklung der Herzinsuffizienz sind die arterielle und pulmonale Hypertonie, Koronare Herzkrankheit (KHK), Kardiomyopathien, Myokarditis und Herzrhythmusstörungen (5).

Langfristige kardiale Belastungen (z.B. Druckbelastung, Volumenbelastung) haben (Mal)Adaptationsprozesse des Myokards zur Folge, welche durch veränderte Genexpression Umstrukturierungsprozesse (Remodeling) des Myokardiums bedingen können (1,6,7).

Anfangs verläuft das (mal)adaptive kardiale Remodeling asymptomatisch. Die Aktivierung herzspezifischer fetaler Gene führt zur Vergrößerung der Kardiomyozyten (Hypertrophie) und häufig zur interzellulären Bindegewebsvermehrung (Fibrose) (6). Das strukturelle und funktionelle myokardiale Remodeling beruht auf multiplen molekularen und zellulären Prozessen, welche die  $Ca^{2+}$ -abhängige Signaltransduktion (z.B. Gentranskription) verändern (7). Alterationen der Genexpression, Zellwachstum und Zelltod führen zu verminderter Kontraktilität der Kardiomyozyten (1,6,8).

## 1.2 Die Rolle von Kalzium in ventrikulären Kardiomyozyten

Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) nimmt als ubiquitär-vorkommender intrazellulärer sekundärer Botenstoff (Engl. *second messenger*) eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulärer Funktionen ein (z.B. Kontraktion, Zelltod und Genexpression) (9).

Die Grundfunktion der Herzmuskelzellen, die Kontraktion, wird im Zytoplasma über  $\text{Ca}^{2+}$ -medierte Signalübertragung verwirklicht.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stellen einerseits die Verbindung zwischen der elektrischen Erregung in Form eines Aktionspotentials und der mechanischen Kontraktionsarbeit (Erregungs-Kontraktions-Koppelung), andererseits vermitteln sie die Kontraktion selbst, indem sie die Myofilamente der kardialen Myozyten aktivieren (s. u.).  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen (in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, CaTs) können in Frequenz, Amplitude und Dauer abgestimmt werden (10).

$\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktionsprozesse kontrollieren neben der im Zytosol stattfindenden Kontraktion auch intranukleäre Vorgänge. Im Zellkern werden die DNA-Synthese, DNA-Reparaturmechanismen und die Genexpression (Erregungs-Transkriptions-Koppelung, ETC) moduliert (9).

Zumeist findet die Signaltransduktion (im Sinne intermolekularer Kommunikation) in lokalen und subzellulären Bereichen (Mikrodomänen) statt (beispielsweise im Zellkern), anstelle durch Veränderungen der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ ) initiiert zu werden. So können verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Prozesse einer Zelle gleichzeitig, jedoch räumlich getrennt, stattfinden (11).

### **1.2.1 Die zelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und die elektromechanische Koppelung**

Die elektromechanische Koppelung (Engl. *excitation-contraction coupling*, ECC) ist der grundlegende intrazelluläre Prozess der Herzmuskulatur, um Blut Schlag für Schlag in das arterielle Kreislaufsystem zu befördern (Abb. 1.1). Hierbei nehmen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Schlüsselrolle ein, sodass  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug zur Entkoppelung der elektrischen Erregung und Kontraktion der Kardiomyozyten führt.

Während des kardialen Aktionspotentials kommt es zur Depolarisation der myozytären Zellmembran (Plasmalemma). Dabei werden die membranständigen spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren, DHPR; Engl. *long-lasting voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*) geöffnet, wodurch ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $I_{\text{Ca}}$ ) ins Zytosol bedingt wird. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgt in einen begrenzten Bereich zwischen der Zellmembran (T-Tubuli und Zelloberfläche) und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), nämlich in die Junctionszone/Dyade (8,11,12).

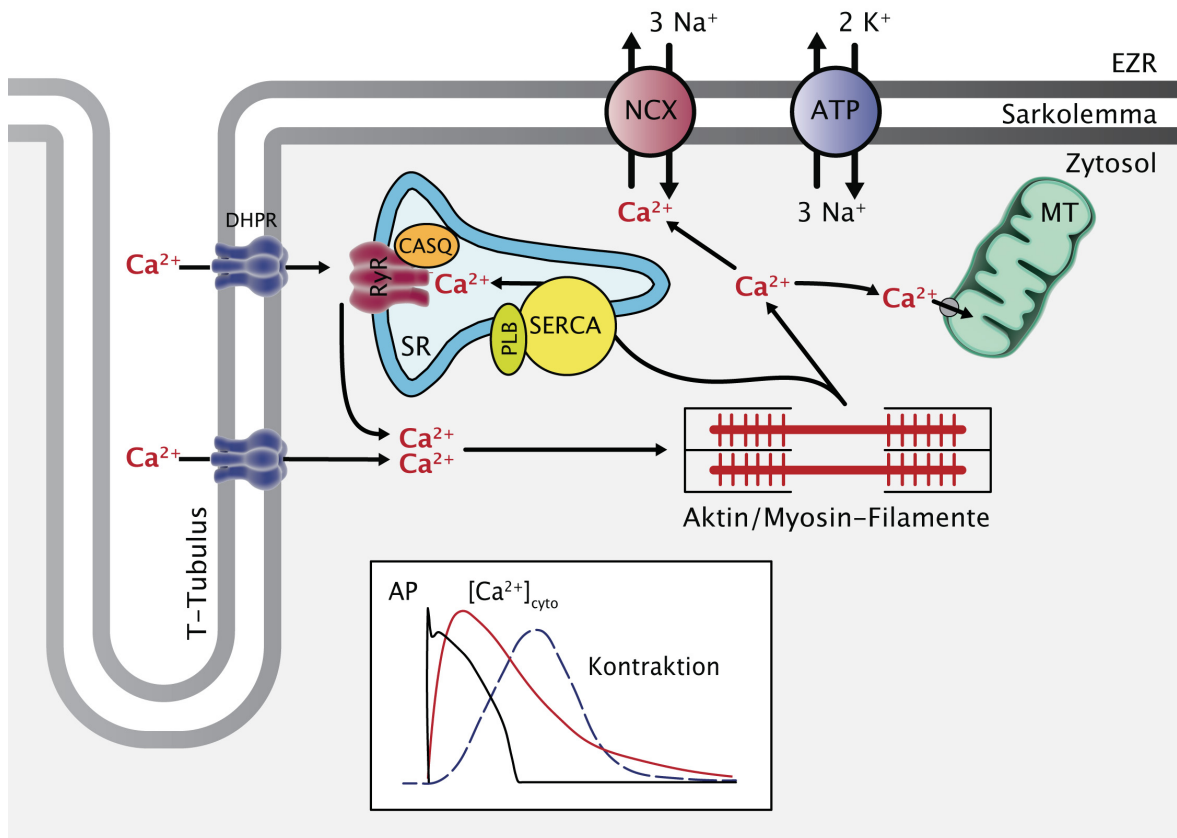
Durch den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  über die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) befindliche Typ 2 Ryanodin-Rezeptoren (RyR2, auch als SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle bezeichnet) aktiviert. Dabei kommt es zur Freisetzung großer Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, CICR). In der Junctionszone

kommt es während des Ablaufs des Aktionspotentials zu einer schnellen Erhöhung ( $<1$  ms) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von etwa 100 nM auf 10  $\mu\text{M}$  (8,11). In jeder dieser Mikrodomänen sind etwa 10-25 L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und 100-200 RyR in Clustern angeordnet – diese werden als  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierungskomplexe oder Couplons bezeichnet. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in den Couplons erfolgt in Form eines positiven Feedbacks. Die Sensitivität der RyR2 zu  $I_{\text{Ca}}$  steigt mit erhöhtem SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt (13). Die Sensitivitätserhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle zu  $I_{\text{Ca}}$  wird der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an dessen Regulationsprotein CASQ, welches mit Triadin (TRD), Junktin (JCN) und RyR2 im Lumen des SR interagiert, beigemessen (13).

Das mittels CICR freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  diffundiert in das restliche Zytosol, um den Kontraktionszyklus der Myofilamente zu aktivieren. In Sarkomeren organisiert, sind diese funktionellen Kontraktionseinheiten aus Myosin- und Aktin-haltigen Filamenten und angelagerten Tn/Tm-Regulatoreinheiten zusammengesetzt.

Der Kontraktionszyklus ist durch die ATP-abhängige Aktin-Myosin-Interaktion charakterisiert (Querbrückenzyklus).  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt das Ineinander-Gleiten der Filamente mit konsekutiver Verkürzung der Sarkomere (Gleitfilamenttheorie) durch Konformationsänderung des hemmenden Troponin-/Tropomyosinkomplexes. Bei sinkender  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  wird die Kontraktion durch die Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beendet.

Die kardiomyozytäre Relaxation ist Folge der Verminderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ , welche überwiegend durch den plasmalemalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Engl.  *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger*, NCX) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) erfolgt (14). NCX unternimmt einen sekundär-aktiven elektrogenen Antiport-Mechanismus: 3  $\text{Na}^+$ -Ionen werden im Austausch von 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion in die Zelle geschleust. SERCA, das häufigste Protein in der Membran des SR, vermittelt die Adenosintrisphosphat (ATP)-abhängige Wiederaufnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins SR. SERCA2a (Haupttyp im Herzen) ist mit einem regulatorischen Protein assoziiert, nämlich Phospholamban (PLN). In dessen inaktiven, dephosphorylierten Zustand interagiert PLN mit SERCA2a, um damit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2a zu vermindern. Folglich wird der inhibitorische Effekt von PLN auf SERCA2a mittels Phosphorylierung (durch Proteinkinase A (PKA),  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), Proteinkinase C (PKC)) aufgehoben.



**Abbildung 1.1: Elektromechanische Koppelung (ECC).**

Darstellung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-abhängigen-Signalwege zur Vermittlung der myokardialen Kontraktion. Nach Depolarisation der Plasmalemma (Aktionspotential, AP) kommt es durch Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (DHPR) zum Ca<sup>2+</sup>-Influx in die Junctionszone. Die lokalisierte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub>-Erhöhung bedingt die Aktivierung von RyR mit nachfolgender Freisetzung großer Ca<sup>2+</sup>-Mengen aus dem SR. Ca<sup>2+</sup> mediiert den Kontraktionszyklus der Myofilamente und wird durch SERCA wieder in das SR aufgenommen, durch den NCX in den Extrazellulärraum (EZR) und durch den mitochondrialen (MT) Ca<sup>2+</sup>-Uniporter in Mitochondrien befördert. Es kommt zur Verminderung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> mit konsekutiver Kontraktionsbeendigung und Relaxation. Schema nach Vorlage: Bers DM, *Nature* (2002).

## 1.2.2 Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine

### 1.2.2.1 Ryanodin-Rezeptor (RyR)

Es sind drei Isoformen (RyR1, RyR2 und RyR3) des Ionenkanals bekannt, wobei RyR2 den häufigsten Subtypus in kardialen Muskelzellen darstellt (15).

RyR2 sind hauptsächlich am junctionalen SR-Abschnitt (jSR), das den plasmalemalen T-Tubuli gegenübersteht, lokalisiert. Die Anordnung der Rezeptoren zeigt somit diskrete Gruppierungen im Bereich der kardiomyozytären Junctionszonen, welche wiederum in enger Nachbarschaft mit der Kernmembran treten. Mittels immunzytochemischer RyR-Zellkern-Doppelmarkierung wurde zudem gezeigt, dass die RyR jedoch nicht in den elongierten zytosolischen Bereichen in Fortsetzung der Längsenden der Nuklei angeordnet sind – im perinukleären Zytosol sind bekannterweise die Golgi-Apparate

lokalisiert (16). RyR2 werden durch den (bereits erwähnten) CICR-Mechanismus und hohen  $[Ca^{2+}]_{SR}$  aktiviert und amplifizieren sodann die Amplitude des  $Ca^{2+}$ -Transienten im Zytosol. Interessanterweise werden RyRs durchaus durch niedrige  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  (1  $\mu$ M) aktiviert, jedoch durch hohe  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  (1 mM) deaktiviert (15). RyR2 bilden an ihrem luminalen Ende zusammen mit Proteinen (CASQ2, TRD, JCN)  $Ca^{2+}$ -Freisetzungskomplexe, welche essentiell für die Funktion der RyR2 sind (17).

ANOMALITÄTEN DER RYR2-FUNKTION: Hereditäre und erworbene RyR2-Dysfunktionen bedingen Anomalitäten der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Handhabung mit konsekutiver Entwicklung lebensbedrohlicher Erkrankungen verschiedener Organsysteme. Die pathophysiologische Hypersensitivität gegenüber  $[Ca^{2+}]_{SR}$  resultiert in funktioneller Hyperaktivität (Engl. *gain-of-function*) des Rezeptors. So kommt es zur erhöhten diastolischen SR  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, die mit Arrhythmien, Kontraktionsschwäche und Remodelingprozessen in kardialen Erkrankungen assoziiert ist (18,19). Charakteristischerweise entwickeln Patienten mit genetisch-bedingter RyR2-Dysfunktion schwerwiegende Herzrhythmusstörungen – so zum Beispiel eine Spezialform der ventrikulären Tachykardie (Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie, CPVT) (20,21). Erworbene Dysregulationen des Rezeptors treten im Verlauf kardialer Hypertrophie und Insuffizienz auf (1). So stellt sich die Frage, inwieweit Anomalitäten der RyR2-Funktion bei Veränderungen der molekularen Organisation kardialer Myozyten das maladaptive Remodeling und die Progression zur Herzinsuffizienz beschleunigen können.

#### 1.2.2.2 Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (InsP<sub>3</sub>R)

InsP<sub>3</sub>R sind wichtige  $Ca^{2+}$ -Freisetzungskanälen des SR mit bevorzugter Lokalisation in der Nähe der Junctionszonen. Zudem lassen sich diese  $Ca^{2+}$ -Kanäle in geringer Dichte in der Zellkernmembran (mit Präferenz der Inneren Zellkernmembran; Engl. *inner nuclear membrane*, INM) ventrikulärer Kardiomyozyten finden. Im Vergleich zu den RyR2 werden sie in ventrikulären Herzmuskelzellen in deutlich niedrigerer Anzahl exprimiert (RyRs:InsP<sub>3</sub>Rs = 100:1) (22). Ihre Lokalisation in den Membranen dieser wichtigen  $Ca^{2+}$ -Speicher befähigt die Rezeptoren dazu  $[Ca^{2+}]_{cyto/nuc}$  zu regulieren, womit sie essentielle intrazelluläre Signalisierungsprozesse beeinflussen können (16,23). Von den drei identifizierten Isoformen (InsP<sub>3</sub>R1, InsP<sub>3</sub>R2, InsP<sub>3</sub>R3) des Rezeptors stellt InsP<sub>3</sub>R2 den häufigsten Subtypus in ventrikulären Herzmuskelzellen dar. Die Rezeptoraktivierung erfolgt bei geringen  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  durch InsP<sub>3</sub>, einem ubiquitären intrazellulären Messenger-

Molekül. Die Phospholipase C (PLC) hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu InsP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (DAG).

Sarkoplasmatische InsP<sub>3</sub>R2 modulieren die ECC, indem sie naheliegende RyR2 sensitivieren. Durch Erhöhung der Amplitude der systolischen Ca<sup>2+</sup>-Transienten (CaTs) führen sie zur Verstärkung der Kontraktionskraft (positive Inotropie), jedoch auch zu arrhythmogenen Effekten (22,24). Weiters können InsP<sub>3</sub>R2 durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus der Zellkernhülle die nukleoplasmatischen CaTs mitregulieren und somit nukleäre Funktionen beeinflussen. Tatsächlich kann der InsP<sub>3</sub>R-medierte Ca<sup>2+</sup>-Ausstoß aus der Kernmembran [Ca<sup>2+</sup>]<sub>nuc</sub> unabhängig von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> erhöhen (25). So kommt es bei Inhibition des InsP<sub>3</sub>R2 durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) zur Verminderung der nukleoplasmatischen [Ca<sup>2+</sup>] bei annähernd unveränderter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyto</sub> (26). Durch die dementsprechende Einflussnahme auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>nuc</sub> nimmt der InsP<sub>3</sub>R-medierte Ca<sup>2+</sup>-Signalisierungsweg eine Schlüsselposition in der kardialen Exzitations-Transkriptions-Koppelung ein (8,22).

ANOMALITÄTEN DER INSP<sub>3</sub>R2-FUNKTION: In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das InsP<sub>3</sub>R-medierte Ca<sup>2+</sup>-Signaling bei adrenerger Stimulation Remodeling-Prozesse des Myokards initiieren und fördern kann (s. u.) (6,27). Vereinbar damit ist, dass Ljubojević et al. (2014) bei Kardiomyozyten insuffizienter Herzen eine signifikant erhöhte perinukleäre InsP<sub>3</sub>R2-Expression sowie höhere diastolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen im Nukleoplasma als im Zytoplasma finden konnten (23).

In atrialen Myozyten werden InsP<sub>3</sub>Rs in einer fünffach-höheren Dichte als in ventrikulären Herzmuskelzellen gefunden. Im Myokardium des Vorhofs kann eine Erhöhung der InsP<sub>3</sub>-Produktion (z. B. durch Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin-II (AT-II)) zur Auslösung und Progredienz von Arrhythmien (Vorhofflimmern) beitragen (22).

### 1.2.2.3 Calsequestrin (CASQ)

Der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt im SR ist ein bestimmender Faktor für die funktionelle Aktivität der RyR2 und damit der kardialen Kontraktilität. In Kardiomyozyten wird die Aktivität der SR Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungskanäle von folgenden Proteinen reguliert: Calsequestrin-2 (CASQ2), Triadin-1 (TRD) und Junktin (JCN). Im jSR bilden diese Proteine einen makromolekularen Komplex, der durch Interaktion mit RyR2 als intraluminaler Ca<sup>2+</sup>-Sensor fungiert (28). CASQ2 ist ein hoch-kapazitives, niedrig-affines Ca<sup>2+</sup>-Bindungsprotein, das pro Molekül etwa 40 Ca<sup>2+</sup>-Ionen bindet und neben der Ca<sup>2+</sup>-Sensor-Funktion als Ca<sup>2+</sup>-Speicherprotein und Ca<sup>2+</sup>-Puffer dient. Die RyR2-Modulation hängt nicht nur von der zytosolischen, sondern auch von der luminalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ab. Bei niedriger [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SR</sub> (z. B.

während der Systole) wird die RyR2-Aktivität durch CASQ2 inhibiert. Bei hoher  $[Ca^{2+}]_{SR}$  (z.B. während der Diastole) kommt es zur Aufhebung der hemmenden Wirkung von CASQ2 auf die RyR2-Kanalaktivität (13,29). Somit determiniert CASQ2 nicht nur die  $Ca^{2+}$ -Speicherkapazität des SR, sondern auch die freigesetzte Menge an  $Ca^{2+}$  im Rahmen der ECC.

ANOMALITÄTEN DER CASQ2-FUNKTION: Mutationen des CASQ2-Gens sind mit kardialen Arrhythmien (CPVT) und plötzlichem Herztod assoziiert – hervorgerufen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation (30). Vergleichende Studien zwischen WT-Mäusen und CASQ2-Knockout-Mäusen zeigten, dass CASQ2-defiziente Kardiomyozyten reduzierte sarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Bindungskapazitäten mit kompensatorischer Erhöhung des SR-Volumens zur Aufrechterhaltung des  $Ca^{2+}$ -Gehalts aufwiesen (31,32). Der Mangel an CASQ2 bedingte weiters eine erhöhte Suszeptibilität der RyR2 zu vorzeitiger Aktivierung und verspäteter Deaktivierung. Dies führt zur Reduktion der basalen  $[Ca^{2+}]_{SR}$  und annähernd vollständiger Depletion des SR  $Ca^{2+}$ -Gehalts mit Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyto}$ . Diese subzellulären Veränderungen bedingen bedeutende klinische Konsequenzen: Im Tierversuchsmodell junger CASQ2-Knockout-Mäuse (mit strukturell unauffälligen Herzen) konnte katecholaminerger Stress ventrikuläre Arrhythmien auslösen. Während dem Alterungsprozess kam es schließlich zur kardialen Hypertrophie und zur Reduktion der myokardialen Kontraktilität (32).

#### 1.2.2.4 $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)

SERCA ist eine  $Ca^{2+}$ -Wiederaufnahmepumpe des SR und der Zellkernhülle, die für ihre Funktion ATP zur Energiegewinnung hydrolysiert. Im SR sind sie im Gegensatz zu den  $Ca^{2+}$ -Freisetzungskanälen in einer von der Junktionszone entfernten Region lokalisiert – nämlich im freien SR-Abschnitt (fSR). In der Zellkernhülle und dessen Invaginationen werden SERCA-Pumpen hauptsächlich in der äußeren Membran (Engl. *outer nuclear membrane*, ONM) exprimiert (23). Durch ihre spezifische Lokalisierung nimmt SERCA Einfluss auf zytosolische und nukleoplasmatische CaTs. In ventrikulären Herzmuskelzellen stellt SERCA2a den häufigsten Typus der drei identifizierten Isoformen (SERCA1, SERCA2, SERCA3) dar. Wie bereits erwähnt, wird die Aktivität von SERCA2a durch Phospholamban (PLN) reguliert. Unphosphoryliertes PLN interagiert mit SERCA2a und inhibiert somit die enzymatische Aktivität; die Phosphorylierung von PLN (durch PKA und/oder CaMKII) beugt dessen Interaktion mit SERCA2a vor, wodurch es zur Enthemmung von SERCA2a kommt (8). Mittels der  $Ca^{2+}$ -Wiederaufnahme ins SR

kommt es zur Senkung von  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  und damit zur Relaxation der Herzmuskelzelle.

ANOMALITÄTEN DER SERCA2A-FUNKTION. In insuffizienten Kardiomyozyten kommt es zur signifikanten Reduktion der Expression und Funktion von SERCA2a, was zur Erhöhung der diastolischen  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  und  $[Ca^{2+}]_{nuc}$ , Verminderung des SR  $Ca^{2+}$ -Gehalts und Verlängerung der myofilamentären Relaxation führt. Zusätzlich wird dadurch eine Depletion der freien  $Ca^{2+}$ -Ionen im SR bedingt (33). Durch die Reduktion des SR  $Ca^{2+}$ -Gehalts können Verlangsamungen des Aufstiegs und Verminderungen der Amplitude der intrazellulären CaTs resultieren. Diese Veränderungen können wiederum Störungen des Kontraktionsvorgangs durch verminderte Kraftentwicklung (negative Inotropie) begünstigen. Die funktionellen Aberrationen der Herzmuskelzellen durch die subzellulären Umstrukturierungen werden zusätzlich durch einen Verlust der Invaginationen des nukleoplasmatischen Retikulums aggraviert. Reduktionen der Tubulusanzahl führen zur weiteren quantitativen Abnahme von SERCA-Pumpen und damit zu pathophysiologischen Effekten auf die nukleäre  $Ca^{2+}$ -Homöostase. Vor allem bei adrenerger Stimulation resultieren Verlangsamungen der nukleären CaTs und Erhöhungen der diastolischen  $[Ca^{2+}]_{nuc}$ . Folglich kommt es zur verstärkten Anregung der CaMKII mit konsekutiver Aktivierung des Hypertrophie-Programms (23).

Da progrediente kardiale Funktionsstörungen während chronischer Herzinsuffizienz maßgeblich durch Expressionsminderung und/oder Dysfunktionen von SERCA2a mitverursacht werden, kam es zur Entwicklung Virus-mediierter (Adeno-assoziierte Viren, AAV) SERCA2a-Genherapie. Laboruntersuchungen und erste klinische Studien (in Phase 2) zeigen, dass der SERCA2a-Getransfer (zur Wiederherstellung der intrazellulären SERCA2a-Menge) die Myokardfunktion günstig (positiv inotrop, positiv lusitrop, anti-arrhythmisch) beeinflussen kann (34).

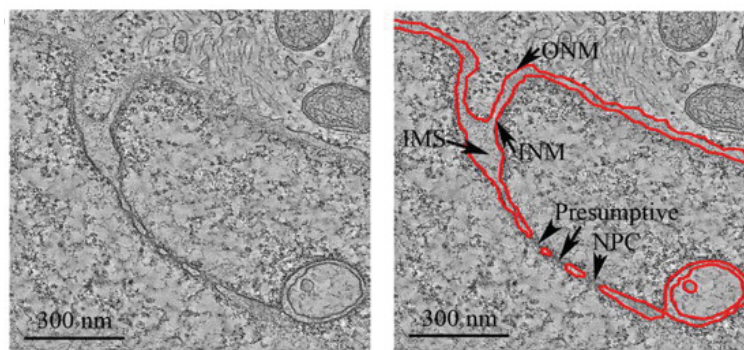
### 1.2.3 Intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Speicher: SR und Zellkernhülle

Das SR und die Zellkernhülle (Engl. *nuclear envelope*, NE) bilden die wichtigsten intrazellulären Speicherorte von  $Ca^{2+}$ . In diesen Kompartimenten kann die Konzentration von freiem  $Ca^{2+}$  circa 1 mM betragen, was in etwa der Kalzium-Konzentration im Extrazellulärraum entspricht (35).

Das SR ist ein membranumschlossenes Netzwerk, das funktionsabhängig in einen junktionalen (jSR) und einen freien Anteil (fSR) untergliedert werden kann. Im jSR befinden sich RyR2, während das fSR SERCA2a enthält (36). Die Distanz zwischen dem

jSR und den plasmalemmalen T-Tubuli beträgt etwa 12 nm (37). Diese geringe Entfernung ermöglicht eine effektive  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle durch den mittels der Zellmembran-ständigen DHPRs bewirkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx.

Die Zellkernmembran umhüllt den Zellkern und besteht aus je einer inneren (INM) und äußeren (ONM) Phospholipiddoppelschicht-Lamelle mit einem dazwischen liegenden Spaltraum (Abb. 1.2) (38,39). Während die INM in direkten Kontakt mit der nukleären Matrix tritt, ist die ONM mit dem SR verbunden (40).



**Abbildung 1.2: Zellkernhülle.** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zellkernmembran-Einstülpung in das Nukleoplasma. Die äußere (ONM) und die innere Membranlamelle (INM) umschließen einen Zwischenspalt (IMS). Unterbrechung der Kernhülle durch nukleäre Poren (NPC).  
Abbildung entnommen aus: Goulbourne et al., *J Cell Sci* (2011)

Die Zellkernhülle fungiert nicht nur als physikalische Barriere zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma, sondern nimmt als funktioneller  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und Sitz essentieller  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine (InsP<sub>3</sub>R2, SERCA2a) Anteil an Signalisierungsprozessen (z.B. Genregulation via Erregungs-Transkriptions-Koppelung). Zudem sorgt sie für die strukturelle Integrität des Zellkerns.

Von besonderer Bedeutung ist, dass von der Zellkernhülle ausgehend, ein Netzwerk tubulärer Strukturen (nukleoplasmatisches Retikulum, NR) in das Nukleoplasma ragt (23,38). Diese Invaginationen können wie folgt eingeteilt werden: Lediglich die innere Membranschichte (Typ I) stülpt sich in das Zellkerninnere vor oder beider Membranlamellen (Typ II) bilden fingerförmige Ausstülpungen (38). Die Existenz eines NR zieht eine Vielzahl an funktionellen Konsequenzen nach sich. Als Beispiel bedingen die Oberflächenvergrößerung und die Durchsetzung des Nukleoplasmas mit Strukturen der Kernmembran Vereinfachungen der intranukleären Ionenregulation (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase) sowie einen effizienteren nukleo-zytoplasmatischen Molekültransport (z.B. Transkriptionsfaktoren, s. u.).

Zellkernporen (Engl. *nuclear pore complexes*, NPC) durchsetzen in Abstandsintervallen die Kernmembran und deren Invaginationen. Durch Vorhandensein der NPC (Durchmesser  $\sim 8$  nm) werden effektive bidirektionale Ionentransporte und die Beförderung makromolekularer Substanzen ermöglicht (41).

Die Zellkernhülle und das SR stellen keine eigenständigen Organellen dar, die unabhängig voneinander in Kardiomyozyten koexistieren. Im Gegenteil dazu sind sie in höchstem Ausmaß miteinander verbunden und bilden somit einen großen kontinuierlichen funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (40).

Zusätzlich zu den bereits genannten intrazellulären Speicherkompartimenten nehmen Mitochondrien Einfluss auf zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierungsprozesse. Als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer vermögen sie die Dynamik des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$  mitzugestalten, indem sie die Amplitude und Dauer von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen verändern (42). Häufig zeigen Mitochondrien enge örtliche Beziehungen zum perinukleären Bereich des SR. So können sie von  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  schnellstens aufnehmen und damit die Auswirkung der  $\text{InsP}_3$ -medierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierung abmindern (43).

#### **1.2.4 Die nukleäre $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase**

Als zentrales Kompartiment nimmt der Zellkern eine wichtige Stellung in nicht-kontraktile  $\text{Ca}^{2+}$ -medierten Signalisierungsprozessen (z.B. Genexpression, Zelltod) von Kardiomyozyten ein. Wie bereits erwähnt, ist der Nukleus trotz Umhüllung und subnukleäre Kompartimentierung durch die Zellkernmembran (und dem NR) in direkter Kommunikation mit dem umgebenden Zytoplasma. NPC durchsetzen die Kernhülle und stellen somit funktionelle nukleo-zytoplasmatische Verbindungsporen für den bidirektionalen Ionen- und Molekül-Transport dar. Folglich vermögen zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nukleoplasmatische CaTs auszulösen, wodurch (zumeist RyR-medierte) Erhöhungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  entlang des Konzentrationsgradienten auch zu Steigerungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$  führen (44). Zudem weisen rezente Untersuchungen darauf hin, dass das nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$  auch unabhängig vom zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert wird (40,44). Die aktive Regulation der nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase kann der Zellkernhülle und dem perinukleären SR zugeschrieben werden. So beherbergen diese funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungs- und Speicherorganellen eine Vielzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen wie RyR,  $\text{InsP}_3\text{R}$ , CASQ und SERCA.

## 1.3 Pathophysiologisches $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling: Das kardiale Remodeling

### 1.3.1 Morphologische Adaptation

Als Antwort auf chronisch-belastenden Wandstress kommt es zur hypertrophischen Vergrößerung des Herzens, um den kardialen Auswurf und damit das Herzzeitvolumen aufrechtzuerhalten. Dieser Adaptationsprozess ist durch strukturelle Veränderungen der Kardiomyozyten charakterisiert, da das Myokardium pathophysiologischen Stimuli nur in geringem Maße durch Zellvermehrung entgegen kann – dies ist dem Verlust der Mitosefähigkeit terminal differenzierter Zellen geschuldet (7,45). Die zelluläre Massezunahme ist durch die Neogenese von Sarkomeren bedingt, welche entweder seriell (exzentrische Hypertrophie) oder parallel (konzentrische Hypertrophie) addiert werden (46).

### 1.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige molekulare Mechanismen der Hypertrophie

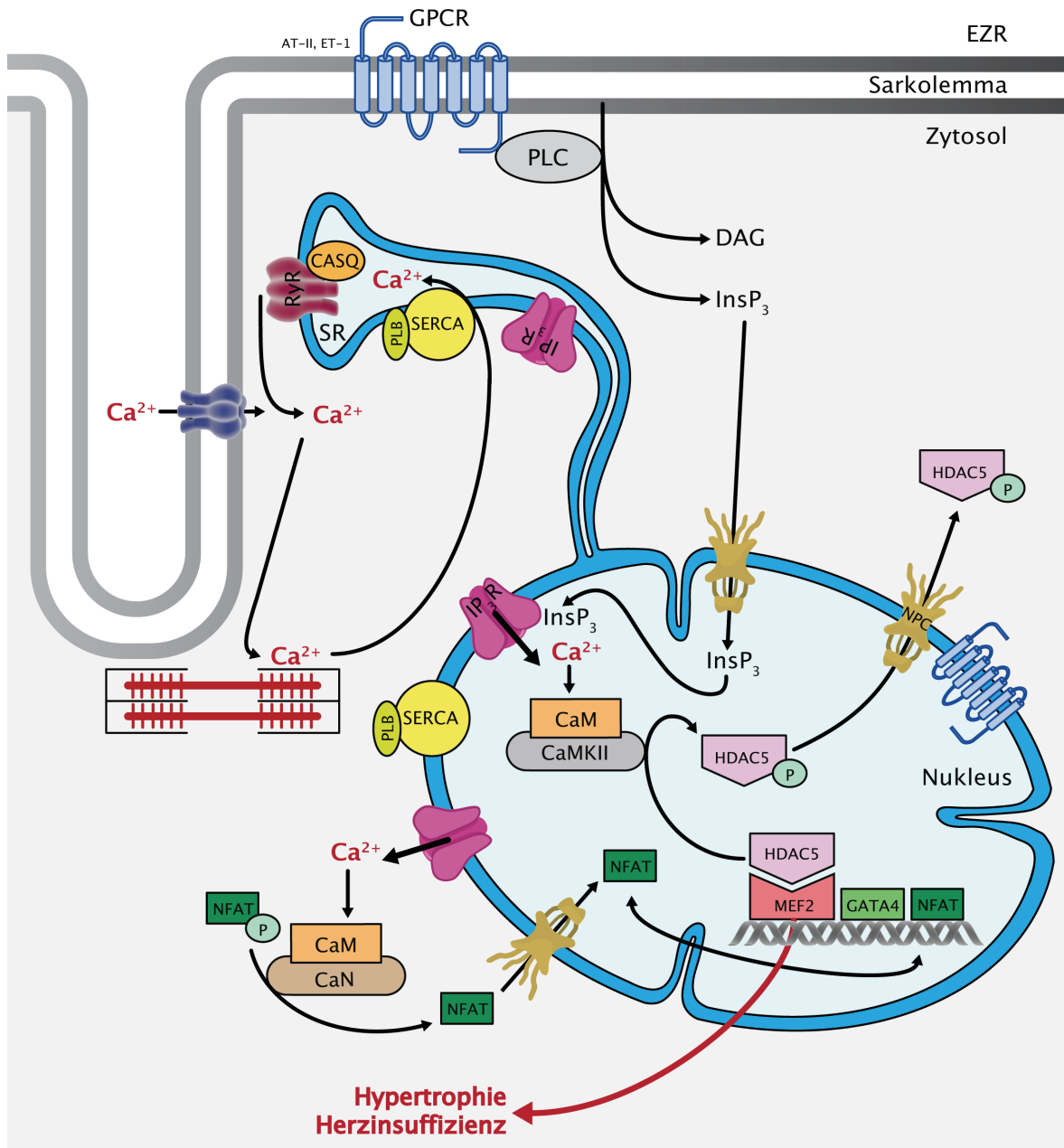
Durch Regulation der Genexpression im Zellkern vermitteln  $[\text{Ca}^{2+}]$ -abhängige Signalwege die adaptive Zellvergrößerung (Hypertrophie) (7,47,48). Die beiden bekanntesten Signalwege sind in detaillierter Form beschrieben (Abb. 1.3).

DER  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM-CAMKII-HDAC5-SIGNALWEG. Calmodulin (Engl. *calcium modulated protein*, CaM) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, welches nach Formation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Komplexes mit Zielproteinen interagiert und pro-hypertrophische Signalkaskaden in Gang setzt. Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Überstimulation von CaM Myozytenhypertrophie bewirken und dass die Blockade von CaM die Genese der Zellvergrößerung unterbinden kann (49).

Chronische pathologische Stimuli (z.B. arterielle Hypertonie, Stress, etc.) induzieren die Freisetzung verschiedener parakriner und autokriner Faktoren (Katecholamine, AT-II, ET-1), die G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Engl. *G-protein coupled receptors*, GPCR) aktivieren und damit die elektro-transkriptionelle Kopplung (ETC) beeinflussen (27,47). GPCR befinden sich auf der Zellkernhülle und den T-Tubuli der Zellmembran. GPCR-Signaling führt zur Aktivierung von PLC, welches das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) hydrolysiert.  $\text{InsP}_3$  diffundiert durch die NPC in das Nukleoplasma und führt über Bindung an  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren der Zellkernhülle zum lokalen, perinukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoß.

Regionale  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhungen aktivieren unter Vermittlung des  $Ca^{2+}$ -CaM-Komplexes die CaMKII, welche die intranukleäre Typ II Histon-Deacetylase HDAC5 phosphoryliert (HDAC5-P) und damit den Export von HDAC5-P aus dem Nukleus bedingt (27). Durch die Translokation von HDAC5 dissoziiert diese vom Transkriptionsfaktor MEF2 (Engl. *myocyte enhancer factor 2*), der wiederum mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Interaktion tritt (GATA, NFAT) (6,50,51). Die Dissoziation von HDAC5-P bewirkt die Enthemmung von MEF2, wodurch der Transkriptionsfaktor nachgeschaltete Zielgene des fetalen Genprogramms aktiviert. Somit wird die Genexpression einer Vielzahl kardialer Struktur- und Kontraktionsproteinen beeinflusst und damit das Hypertrophie-Signaling aktiviert (Abb. 1.3).

DER  $Ca^{2+}$ /CAM-CAN-NFAT-SIGNALWEG. Bei langfristigen  $[Ca^{2+}]_{cyto}$ -Erhöhungen (z. B. durch AT-II) induziert die Phosphatase Calcineurin (CaN) die Hypertrophie-Antwort der Kardiomyozyten (6,52). Durch Bindung des  $Ca^{2+}$ -CaM-Komplex an CaN wird die CaN-medierte Dephosphorylierung von NFAT3-P (Engl. *nuclear factor of activated T-cells*) und damit die Exposition eines Kernlokalisierungssignals (Engl. *nuclear localization sequence, NLS*) vermittelt. Folglich kommt es zur Translokation von NFAT3 in den Nukleus. Im Zellkern interagiert NFAT3 sodann mit GATA4 und MEF2, um synergistisch die hypertrophische Gentranskription zu induzieren (6,50) (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Signaltransduktion bei kardialer Hypertrophie.**

Zytosolische und nukleoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -medierte Signalwege der Erregungs-Transkriptions-Koppelung (ETC). GPCR-Signaling bedingt die Bildung von  $\text{InsP}_3$ , welches via NPC in das Nucleoplasma transferiert wird und nachfolgend  $\text{InsP}_3\text{R}$  aktiviert. Der  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor unternimmt die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zellkernhülle, welches unter Vermittlung von Signalwegen ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM/CaMKII-HDAC5,  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM/CaN-NFAT) die Hypertrophie-Kaskade der Herzmuskelzelle reguliert.

Schema nach Vorlage: Wu X et al., *J Clin Invest* (2006); Hohendanner et al., *Front Pharmacol* (2014).

## 1.4 Hauptfragestellungen, Hypothesen und Ziele

Der Einfluss der subzellulären Veränderungen auf die zytoplasmatische und nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist in Wildtyp-Kardiomyozyten bekannt (23).

Es wurde auch gezeigt, dass mutationsbedingte RyR2-Fehlfunktion in Mäusen unter Drucküberlast langfristige Remodeling-Prozesse (Hypertrophie und Fibrose) in den Herzmuskelzellen und damit funktionelle (Verschlechterung der Pumpfunktion) und strukturelle Veränderungen des Herzens in beschleunigtem Ausmaß hervorruft. Diese Prozesse führen zu vorzeitiger Herzinsuffizienz und erhöhter Mortalität (18). Zudem lassen sich bereits in der Frühphase der Herzinsuffizienz morphologische und funktionelle Veränderungen der Zellkernhülle von Herzmuskelzellen finden (23). Die pathophysiologische Umgestaltung dieses funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers bedingt Störung des intrazellulären und intranukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts. Ob strukturelle und funktionelle Alterationen der Zellkernhülle in Herzmuskelzellen mit Gain-of-Function-Mutation des RyR2 bereits in der Frühphase der Herzinsuffizienz auftreten, bleibt jedoch unklar. Außerdem besteht noch wenig Information zum Einfluss von RyR2-Dysregulationen auf die subzelluläre Morphologie ventrikulärer Kardiomyozyten – im speziellen im perinukleären Zytosol und im Zellkern. Da sich die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle in unmittelbarer Nähe zum Zellkern befinden, können sie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im (peri)nukleären Bereich verändern und damit die Entstehung von Hypertrophie (Gen-Transkription via ETC) mitverursachen und die Progression zur Herzinsuffizienz beschleunigen. Wie genau  $\text{Ca}^{2+}$  im Zellkern reguliert wird, ist bis heute weitgehend unbekannt.

Diese Arbeit hat die Erforschung der Lokalisation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine (RyR2,  $\text{InsP}_3\text{R}_2$ , SERCA2a, CASQ2) und der Strukturveränderung der Zellkernhülle (Remodeling) in  $\text{RyR2}^{\text{R4496C}+/}$ -Kardiomyozyten nach Druck-induzierter Überlast zum Ziel.

Zwei Hypothesen wurden getestet:

1. In  $\text{RyR2}^{\text{R4496C}+/}$ -Kardiomyozyten kommt es im Vergleich mit WT-Herzmuskelzellen nach Druck-induzierter Überlast (Aortenkonstriktion) zur Vergrößerung der Zellkerne und Verminderung der Invaginationen des NR.

2. WT- und RyR2<sup>R4496C+/-</sup>-Kardiomyozyten zeigen nach Aortenkonstriktion qualitative Unterschiede in der Lokalisation intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine: RyR2, InsP<sub>3</sub>R2, CASQ2, SERCA2a.

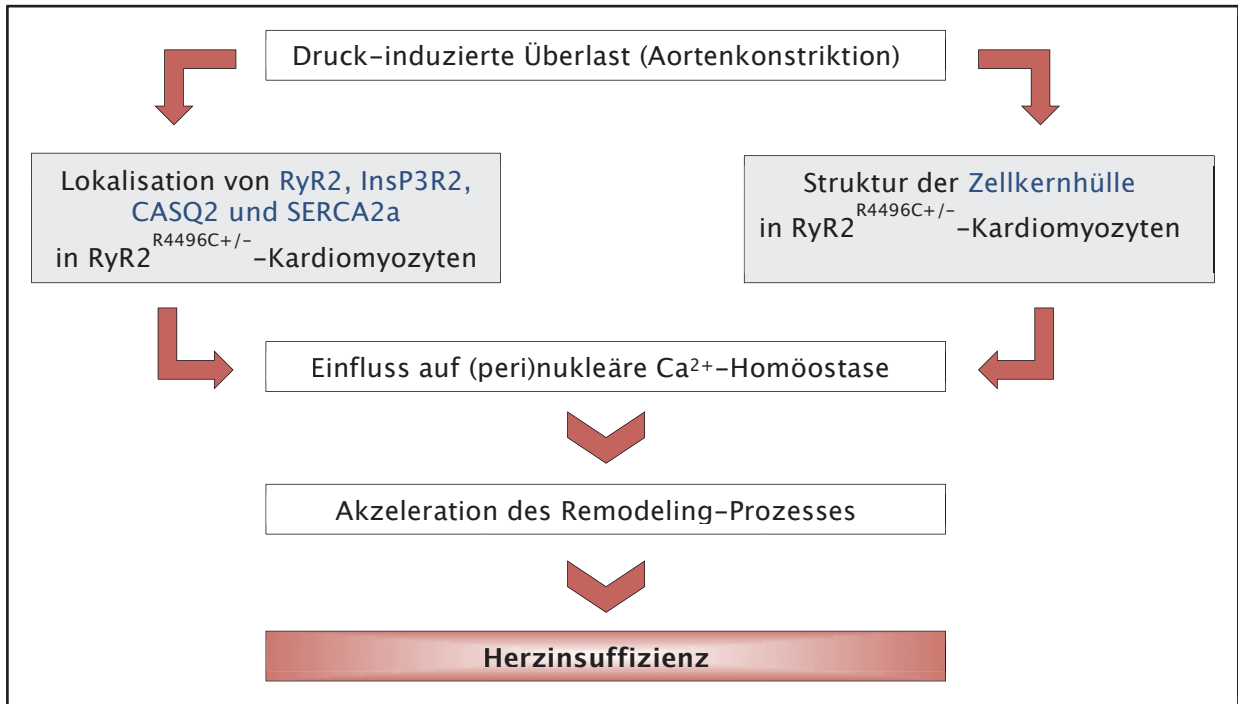


Abbildung 1.4: Arbeitsmodell

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mausmodell

Die Tierversuche wurden vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (BMWFW) genehmigt (BMWFW-66.010/0075-WF/II/36/14).

In dieser Arbeit wurden transgene Mäuse mit heterozygotem Gen-Knock-in einer humanen RyR2-Mutation (RyR2<sup>R4496C+/-</sup>; N=11) und deren Wildtyp-Wurfgeschwister (WT; N=10) des Mausstamms C57BL/6 im Alter von 9 bis 15 Wochen verwendet. Die Gain-of-Function-Mutation des RyR2-Gens steht mit erhöhtem diastolischen Ca<sup>2+</sup>-Leck sowie mit der humanen katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT) im Zusammenhang (21). Unter basalen Konditionen weisen RyR2-mutierte Mäuse Erhöhungen der Aktivität, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SR</sub>-Sensitivität und Öffnungswahrscheinlichkeit der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungskanäle auf. Bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation kommt es zur zusätzlichen Häufung spontaner diastolischer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungswellen mit resultierendem Erreichen der Schwelle für getriggerte Aktivität – durch den sekundär erhöhten NCX-abhängigen Na<sup>+</sup>-Einstrom sind späte Nachdepolarisationen (Engl. *delayed afterdepolarisations*, DADs) mit der Gefahr von ventrikulären Tachykardien (VT) die Folge (32,53,54).

Alle Versuchstiere wurden zuerst genotypisiert und anhand deren Genotyps und deren Intervention in vier Gruppen eingeteilt: WT-Sham, WT-TAC, RyR2<sup>R4496C+/-</sup>-Sham, RyR2<sup>R4496C+/-</sup>-TAC.

#### 2.1.1 Operative Interventionen

Die operativen Eingriffe wurden 7 Tage vor der Zellisolation von Dr. Simon Sedej (Abteilung für Kardiologie) durchgeführt. Die Mäuse wurden Operationen ohne (Sham) oder mit transaortaler Konstriktion (TAC) unterzogen und nachfolgend analgetisch therapiert (Metamizol) (55). Männliche Tiere (N=10) hatten zum Zeitpunkt der Intervention ein durchschnittliches Körpergewicht von 25,1±1,53 g, weibliche Tiere (N=11) von 21,7±1,45 g.

**Minimalinvasive transaortale Konstriktion (TAC).** Mittels TAC kann ein experimentelles Modell für linksventrikuläre Hypertrophie und konsekutiver Herzinsuffizienz generiert werden (55,56). Nach Narkoseeinleitung (Ketamin/Xylazin-Gemisch) wurde die Maus in dorsal-liegender Position auf einem Heizkissen (Aufrechterhaltung von 37°C) gelagert. Es folgten die Enthaarung im Brustbeinbereich,

Desinfektion und horizontale Inzision der Haut über der *Fossa jugularis sterni* zur Darstellung des transversalen Aortenabschnittes. Im Bereich zwischen den Abgängen der *Arteria brachiocephalica* und der *Arteria carotis communis sinistra* wurde der Aortenbogen mit einem chirurgischen Faden (Stärke: 5-0) umschlungen. Anschließend wurde dem Gefäß eine gebogene stumpfe 27-Gauge-Nadel parallel angelagert und der Faden um Aorta und Nadel verknotet. Schließlich wurde die Nadel entfernt und die Haut verschlossen (57).

**Scheinoperation (Sham).** Im Rahmen der Sham-Interventionen wurde die Hauptschlagader lediglich exponiert, jedoch nicht ligiert.

## 2.2 Reagenzien

**Tabelle 2.1: Benötigte Reagenzien in alphabetischer Gliederung**

Chemikalie/Substanz	Chemische Formel; Molekulargewicht (MW) oder Konzentration (c)	Hersteller; Produktnummer; Charge
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	$C_4H_7NO_2$ ; MW=101,1 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; B0753; 040M0206
D(+)-Glukose	$C_6H_{12}O_6$ ; MW=180,16 $g\ mol^{-1}$	Merck; 346351; K44709637 347
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$(CH_3)_2SO$ ; MW=78,13 $g\ mol^{-1}$ ; c $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; D4540; BCBL2874V
Fluoroshield <sup>TM</sup> with DAPI (4',6-Diamidin-2- phenylindol)	$C_{16}H_{15}N_5$ ; MW: 277,32 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; F6057; SLBJ1548V
Formaldehyd-Lösung (16%)	$CH_2O$ , MW=30,031 $g\ mol^{-1}$	Thermo Scientific Fisher; 28906; OJ188311
HEPES (4-(2- Hydroxyethyl)piperazin-1- ethansulfosäure)	$C_8H_{18}N_2O_4S$ ; MW=238,3 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; H3375; SLBH9885V
Kaliumchlorid	KCl; MW=74,55 $g\ mol^{-1}$	Merck; 104936; K37108236 718
Kaliumphosphat monobasisch	$KH_2O_4P$ ; MW=136,09 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; P5655; 080M0045V
Kalziumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; MW=147,02 $g\ mol^{-1}$	Merck; 102382; A835282 725
Kalziumchlorid-Lösung	$CaCl_2$ ; MW=110,98 $g\ mol^{-1}$ ; c: 1 M in $H_2O$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; 21115; BCBM0468V
Laminin der murinen Engelbreth-Holm-Swarm- Sarkom-Basalmembran	1 $mg\ mL^{-1}$ in TRIS-gepuffertem NaCl	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; L2020; 024M4107V
Magnesiumchlorid- Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; MW=203,3 $g\ mol^{-1}$	Merck; 137008; A800733 709
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; MW=246,48 $g\ mol^{-1}$	Merck; 105882; A892986 734
Natriumchlorid	NaCl; MW=58,44 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; 71380; SZBE0090V
Natriumphosphat- Heptahydrat dibasisch	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ; MW=141,96 $g\ mol^{-1}$	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; S9390
Natrium-Heparin	c: 5000 I.E. $mL^{-1}$	Gilvasan; 4E645A
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Auflösung von 1 Tablette in 200 $mL$ entionisiertem Wasser ergibt (in	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; 79382; BCBB8774

	mmol <sup>-1</sup> ): NaCl 137; KCl 2,7; Phosphatpuffer 10	
Pluronic <sup>®</sup> F-127	MW=12,5 kDa	Invitrogen Molecular Probes <sup>®</sup> ; P3000MP
Rinderkalbserum (BCS)	260-330 mOsm/kg H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; 12133C
Taurin (2-Aminoethansulfonsäure)	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S; MW=125,15 g mol <sup>-1</sup>	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; T0625; BCBJ5897V
Triton <sup>™</sup> X-100	(4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol; <i>t</i> -Oct-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> OH)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> ; T8787; 107H2523

Hersteller:

- Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
- Gilvasan Pharma GmbH, 1190 Wien, Österreich
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemie GmbH/Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Co. Deutschland und USA
- Invitrogen Molecular Probes<sup>®</sup>/Life Technologies by Thermo Fisher Scientific: Rockford, USA

## 2.3 Lösungen und Fluoreszenzmarker

### 2.3.1 Lösungen zur Myozytenisolation

Um einzelne Herzmuskelzellen aus dem Myokard zu isolieren, wurden verschiedene Lösungen angesetzt und verwendet. Einige benötigte Mixturen sind bei entsprechender Erwähnung im Text genannt und deren Zusammensetzung in Klammern beigefügt. Restliche, nicht im Textteil erwähnte, Lösungen sind in Tab. 2.2 angeführt.

**Tabelle 2.2: Angesetzte Lösungen zur Myozytenisolation**

Lösung	Zusammensetzung	Indikation; Lagerung
Perfusionslösung	(in mmol.L <sup>-1</sup> ) NaCl 135; Taurin 30; HEPES 10; KCl 4,7; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 0,6	Null-Kalzium-Lösung als Grundlage der weiteren hergestellten Lösungen; Lagerung im Kühlschrank bei 4°C; Verwendungsdauer: 7 Tage
Kanülierungslösung	150 mL Perfusionspuffer-Lösung; 150 µL von 1 M CaCl <sub>2</sub>	Retrograde Durchspülung der Koronararterien zur Blutentfernung; Lagerung auf Eis nach dem Ansetzen
Myozyten-Stopp-Lösung 2 (MS2)	19 mL Perfusionspuffer-Lösung; 0,095 mgmL <sup>-1</sup> BCS (5%); 12,5 µmol CaCl <sub>2</sub>	Grundlage für die Lösungen der Kalzium-Aufbaureihe
Normal-Tyrode-Lösung (NT)	(in mmol.L <sup>-1</sup> ) NaCl 140; HEPES 10; D-Glucose 5; KCl 4; CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 2; MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 1	Glukose-haltige Lösung mit physiologischer Ca <sup>2+</sup> -Konzentration zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Zellen nach erfolgter Isolation; Titrierung des pH-Werts mittels 2 M NaOH auf 7,4; Lagerung im Kühlschrank bei 4°C; Verwendungsdauer: 7 Tage

## 2.3.2 Fluorophor und Antikörper

### 2.3.2.1 Mag-Fluo-4/AM

Dieser zelldurchgängige Fluoreszenzfarbstoff dient der Indikation von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Aufgrund der Kopplung der COOH-Gruppen (Carbonsäure-Gruppen) des Fluorophors mit Acetoxymethyl-Estern (AM) verliert dieses seine negative Ladung und wird in einen lipophilen, ungeladenen Zustand überführt. Somit kann der Farbstoff Zellmembranen durchdringen und in Zellen diffundieren. Nach Ankunft des Indikators in der Zelle wird AM durch unspezifische intrazelluläre Esterasen vom Farbstoffmolekül abgespalten, wodurch der Farbstoff die Ziel-Ionen binden und nicht mehr aus der Zelle austreten kann.

Mag-Fluo-4/AM wurde verwendet, da es sich besonders gut zur Darstellung der Zellkernhülle und des nukleoplasmatischen Retikulums (NR) eignet (58). Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) beträgt für  $\text{Ca}^{2+}$  22  $\mu\text{M}$  und für  $\text{Mg}^{2+}$  4,7 mM. Die Anregungswellenlänge beträgt 490 nm, die Emissionswellenlänge 517 nm.

Der Farbstoff wurde von Life Technologies by Thermo Scientific, Rockford, USA erworben (Katalognummer: M-14206).

Mag-Fluo-4/AM (50  $\mu\text{g}/\text{vial}$ ) wurde mit 12  $\mu\text{L}$  Dimethylsulfoxid (DMSO) auf eine Konzentration von 5  $\text{mmolL}^{-1}$  verdünnt und aliquotiert (2  $\mu\text{L}$  pro Aliquot).

Die Aliquots wurden unter Lichtverschluss bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2.2 Antikörper

Zur Markierung und Visualisierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine von ventrikulären Herzmuskelzellen wurden mono- sowie polyklonale Primär- und fluoreszierende Sekundärantikörper verwendet (Tab. 2.3, 2.4).

Die intrazelluläre Lokalisation folgender Rezeptoren wurde untersucht:

- 1,4,5-Inositoltrisphosphat-Rezeptor (Typ 2;  $\text{InsP}_3\text{R}2$ )
- Ryanodin-Rezeptor (Typ 2;  $\text{RyR}2$ )
- Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (Typ 2a; englische Abkürzung: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA2a)
- Calsequestrin (Typ 2;  $\text{CASQ}2$ )

**Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper**

Primärantikörper	Klonalität	Wirt/Isotyp	Hersteller; Katalognummer
anti-RyR2	monoklonal	Maus/IgG1	Thermo Fisher Scientific, USA; MA3-925
anti-SERCA2a	monoklonal	Maus/IgG2a	Thermo Fisher Scientific, USA; MA3-916
anti-InsP <sub>3</sub> R2	polyklonal	Ziege	Novus Biologicals, USA; NB100-2466
anti-CASQ2	polyklonal	Kaninchen/IgG	Thermo Fisher Scientific, USA; PA1-913

**Tabelle 2.4: Verwendete Sekundärantikörper**

Sekundärantikörper	Markermolekül	Reaktivität/Isotyp	Anregung/ Emission (nm)	Katalognr.
Goat anti-Mouse	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Maus/IgG	488/519	A-11029
Goat anti-Mouse	Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	Maus/IgG	590/617	A-11032
Goat anti-Rabbit	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Kaninchen/IgG	488/519	A-11034
Donkey anti-Goat	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege/IgG	495/519	A-11055

Hersteller: Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

## 2.4 Isolation ventrikulärer Herzmuskelzellen

Die Kardiomyozyten wurden 7 Tage postoperativ entsprechend eines etablierten Protokolls isoliert (59).

**Herzentnahme.** Die Mäuse wurden mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran narkotisiert und gewogen. Anschließend erfolgte die Antikoagulation durch intraperitoneale Applikation von 50 I.E. Heparin-Natrium. Nach 10-minütiger Wirkungsentfaltung des Heparins wurden die Mäuse wiederum mit Isofluran anästhesiert, durch Genickbruch euthanisiert und an der Unterlage fixiert. Das Fell und die Haut über dem *Processus xiphoideus sterni* wurden mit einer Schere entfernt und in diesem Bereich die Abdominalhöhle eröffnet. Nach Lösung des Zwerchfells vom Brustkorb konnten die thorakalen Organe erblickt werden. Nun wurden die Rippen mit der Schere durchtrennt und der Thorax nach kranial geklappt und befestigt. Nachfolgend konnten die großen Herzgefäße identifiziert und das Herz von diesen abgetrennt werden. Nun erfolgte die Entnahme, Gewichtsbestimmung und Platzierung des Herzens in einer mit eisgekühlter Kanülierungslösung befüllten Petrischale. Anschließend wurde der Aortenstumpf unter 120-facher stereomikroskopischer Vergrößerung auf die Kanüle gestülpt und mit zwei Knoten befestigt. Hierbei war es wichtig, dass das Kanülenende proximal der Aortenklappe sowie distal des Abganges der Koronararterien zu liegen kam. Danach wurden die Koronararterien mit der eisgekühlten Kanülierungslösung (circa 1 mL) retrograd durchspült, um den Großteil des intrakardialen Blutes auszuspülen. Es war wichtig, embolische Gefäßobstruktionen (Thrombembolie, Luftembolie) zu vermeiden, um gute Perfusionsbedingungen für die Koronararterien zu gewährleisten.

**Herzperfusion.** Die Kanüle wurde vom Spritzenende gelöst und am Schlauch des Langendorff-Setups angebracht. Dann erfolgte die vierminütige Perfusion der Herzkranzgefäße und des Herzparenchyms mittels Perfusionspuffer-Lösung (333 mL Null-Kalzium-Lösung mit Zusätzen (in mmolL<sup>-1</sup>): 10 D-Glukose, 10 2,3-Butandionmonoxim; pH-Wert: 7,46) um myokardiale Kontraktionen zu unterbinden und restliches Blut auszuspülen. Darauffolgend wurden diese sieben Minuten lang mit der Enzym-haltigen Verdauungslösung (25 mL Perfusionspuffer-Lösung mit Zusätzen: 0,075 mgmL<sup>-1</sup> Liberase, 0,056 mgmL<sup>-1</sup> Trypsin, 12,5 µM CaCl<sub>2</sub>) durchspült, sodass die Extrazellulärmatrix enzymatisch gespalten und angedaut werden konnte. Die Perfusionslösungen wurden auf 37°C erwärmt und mit 100% O<sub>2</sub> begast. Die Perfusions-Durchflussrate betrug 3 mLmin<sup>-1</sup>.

**Myozytendissoziation.** Nach der Herzperfusion konnten die Herzvorhöfe von den Herzventrikeln abgetrennt und die Herzkammern in die Myozyten-Stopp-Lösung 1 (2,25 mL Perfusionspuffer-Lösung mit Zusätzen: 0,25 mgmL<sup>-1</sup> BCS (10%), 12,5 µM CaCl<sub>2</sub>) gelegt werden. Das Herzgewebe wurde mittels Pasteur-Pipetten wiederholt auf- und abgesaugt, um die Kardiomyozyten vom Zellverband (Synzytium) zu lösen und einzelne Zellen zu erhalten. Danach erfolgte die Filtration der Suspension durch ein 300 µm Filtermaschenwerk, sodass ungenügend verdautes Gewebe von den dissoziierten Zellen getrennt werden konnte.

**Aufsteigende Kalzium-Reihe (Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung).** Dieser Schritt diente der Wiederherstellung der physiologischen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit unterschiedlichen Kalzium-Lösungen (= MS2 + Ca<sup>2+</sup>).

Bei Raumtemperatur ließ man die Zellen 10 Minuten lang in der Suspension sedimentieren, sodass sich ein Pellet bildete. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abpipettiert und die erste Kalzium-Lösung (125 µM Ca<sup>2+</sup>) hinzugefügt. Diese wurde zehn Minuten lang belassen und die Schritte zwei weitere Male mit MS2-Lösungen aufsteigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (250 µM und 500 µM) wiederholt. Schließlich erfolgte die Hinzugabe der NT-Lösung (mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Die Zellen konnten sodann für die experimentelle Bearbeitung verwendet werden.

## 2.5 Zellkernbeladung

Zur Visualisierung der zellulären Kernmembran und deren Invaginationen wurden Herzmuskelzellen mit dem Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Farbstoff Mag-Fluo-4/AM beladen. Dazu wurden zu 2 µL des Farbstoff-DMSO-Gemisches (Farbstoffkonzentration: 5 mmolL<sup>-1</sup>) 1

$\mu\text{L}$  Pluronic F-127 hinzugefügt und gut durchmischt. Dies wurde wiederum mit 900  $\mu\text{L}$  NT-Lösung (mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gut vermengt und 100  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension hinzugefügt (Endkonzentration des Farbstoffes: 10  $\mu\text{molL}^{-1}$ ). Die Zell-Farbstoff-Suspension wurde auf den Laminin-beschichteten Petrischalen ausplattiert und für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtverschluss belassen. Nach der Farbstoffbeladung der Zellen wurde das verbliebene Gemisch zweimalig mit jeweils 2 mL NT ausgewaschen und schließlich mit 2 mL NT 15 Minuten lang deesterifiziert.

## 2.6 Immunzytochemie

Myokardiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine wurden mittels indirekter immunzytochemischer Methodik markiert. Hierzu wurden Primärantikörper, die mit dem gesuchten Antigen (intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine) eine Antigen-Antikörper-Kopplung eingehen, sowie Sekundärantikörper, die das Fluoreszenzfarbstoffmolekül tragen und an den Primärantikörper binden, verwendet (Tab. 2.5).

**Tabelle 2.5: Gekoppelte Primär- und Sekundärantikörper**

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Anregung/Emission (nm)
anti-RyR2, anti-SERCA2a	Goat anti-Mouse 488	488/519
anti-RyR2, anti-SERCA2a	Goat anti-Mouse 594	590/617
anti-CASQ2	Goat anti-Rabbit 488	488/519
anti-InsP <sub>3</sub> R2	Donkey anti-Goat 488	495/519

Die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten wurden auf den Laminin-beschichteten Petrischalen ausplattiert und etwa 45 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden nichthaftende Zellen mit NT ausgewaschen und die verbleibenden Zellen mittels 4% Formaldehyd (gelöst in PBS [in  $\text{mmolL}^{-1}$ ]: 137 NaCl, 2,7 KCl, 10  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH=7,4) bei 4°C fixiert. Nach dem Auswaschen der Rückstände der Fixierungslösung mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert. Die Permeabilisierungslösung (0,5% Triton X100 in PBS) wurde für eine Dauer von 15 Minuten appliziert. Schließlich wurde diese ausgewaschen und 60 Minuten lang mittels Albumin-angereicherter PBS-Lösung blockiert (5% BSA in PBS: lyophilisiertes, pulverisiertes Serumalbumin des Rinds; Molekülmasse ~ 66 kDa).

Zur Markierung der Herzmuskelzellen wurden diese jeweils mit den ausgewählten Primärantikörpern 180 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (RyR2 1:150; InsP<sub>3</sub>R2/CASQ2/SERCA2a 1:300) in 5%

BSA/PBS-Lösung verdünnt. Nachfolgend wurden diese mit PBS ausgewaschen und die Zellen mit den Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (60 Minuten bei 4°C unter Lichtverschluss, 5% BSA in PBS). Danach erfolgte das Auswaschen nicht-gekoppelter

Sekundärantikörper mit PBS.

Um die Co-Lokalisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine darstellen zu können, wurden die Zellen mit je zwei Primärantikörpern (anti-InsP<sub>3</sub>R2 + anti-RyR2) und je zwei Sekundärantikörpern (Donkey anti-Goat 488 + Goat anti-Mouse 594) inkubiert.

Schließlich wurde direkt vor der mikroskopischen Untersuchung 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) hinzugefügt, um die Zellkerne darstellen zu können. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an AT-reichen Regionen der dsDNA bindet. Die Anregung des DAPI-DNA-Komplexes mit ultraviolettem Licht (364 nm) resultiert in einer Emission eines Fluoreszenzsignals mit einer Wellenlänge von 454 nm (60).

## **2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)**

Für die Aufnahmen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen sowie von Zellkernen der Herzmuskelzellen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta; Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Damit können Objekte sequenziell durchrastert und zweidimensionale Objektinformationen in der Fokusebene zur Darstellung gebracht werden. Dazu wird Laserstrahlung, die von unterschiedlichen Gas- sowie Dioden-Lasern emittiert wird, benötigt. Die Bildauflösung ist durch die Wellenlänge des Laserlichtes bestimmt. Das Laserlicht trifft auf den eingestellten, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Objektbereich, wodurch von diesem Fluoreszenzlicht höherer Wellenlänge emittiert wird. Der darzustellende Wellenlängenbereich des Fluoreszenzsignal-Spektrums wird über einen Emissionsfilter selektiert, durch einem Photomultiplier pixelweise detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt (digitalisiert). Vor dem Detektor ist eine Lochblende (Engl. *pinhole*) in einer zur Objektebene konjugierten Position angeordnet. Der Grad der Konfokalität ist durch die variable Einstellung des im Idealfall unendlich kleinen Pinhole-Durchmessers bestimmt. Es kann nur das Fluoreszenzlicht detektiert werden, das die konfokale Blende passiert. Emittiertes Signal von Objektpunkten außerhalb der individuell verstellbaren Fokusebene wird ausgeblendet. Durch die massive Reduktion von Streulicht können Bilder mit einer sehr guten Auflösung (auch in der Z-Achse) in konfokal-optischer Schicht aufgenommen

werden, was eine deutliche Verbesserung der Abbildungsqualität im Vergleich zu konventionellen Lichtmikroskopen ermöglicht.

Für sämtliche Aufnahmen wurde der Lochblendendurchmesser auf eine Beugungseinheit (Engl. *airy unit*) eingestellt, da hiermit ein guter Kompromiss zwischen erhaltener Signalintensität und Bildauflösung bestand.

Zur Zellkernuntersuchung (Beladung mit Mag-Fluo-4/AM) kam ein Argon-Ionen-Laser mit monochromatischem Licht (488 nm) zur Anwendung. Etwa 3-5% Laseranregung (Engl. *laser excitation*) der voreingestellten Laserleistung (30 mW, 25%) waren zur suffizienten Bestrahlung notwendig. Die Dicke der optischen Schichte betrug 0,9 µm.

Um die immunzytochemisch bearbeiteten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde zusätzlich zum Argon-Ionen-Laser (488 nm) eine Laserdiode mit ultraviolettem Licht (405 nm) und ein Helium-Neon-Laser (HeNe, 543 nm) genützt.

Die 405 nm-Laserdiode kam zur Visualisierung des Zellkerns und der HeNe-Laser zur Darstellung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen (RyR2) im Rahmen der Co-Lokalisierungs-Untersuchungen zum Einsatz.

Mittels Öl-Immersionsobjektiven wurden die Zellen vergrößert dargestellt. So konnten die Zellkerne der Fluorophor-konjugierten Myozyten mit einem 63x-Objektiv (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine der Herzmuskelzellen mittels 40-facher Vergrößerung (Zeiss Plan-Apochromat 40x/1,0 Öl) gut untersucht werden.

### **2.7.1 Messungsablauf**

Alle Messungen wurden bei abgedunkeltem Licht und Raumtemperatur durchgeführt. Mittels Computersoftware (Zeiss LSM 510 Image Examiner, Zeiss ZEN 2009) konnte das Mikroskop computergestützt bedient werden. Vorbereitend wurde das bevorzugte Objektiv eingestellt, ein Tropfen Immersionsöl aufgebracht und die Petrischale aufgesetzt. Nachfolgend wurden geeignete Zellen aufgesucht. Folgende Merkmale waren Ausschlusskriterien: Vakuolisierung, Filamentkontraktionen, Schädigung sowie ungenügende Farbstoffbeladung.

Im Rahmen der Zellkernuntersuchungen wurde die Zelle mittels Laserlicht sequenziell durchrastert, um die Zellkerne zu finden. Bei guter Farbstoffbeladung (Signal/Rausch-Verhältnis) der Zellkernmembran und des nukleoplasmatischen Retikulums wurden die Zellkerne in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Fokusebene wurde auf die größte Ausdehnung des Zellkerns eingestellt, der Bildausschnitt auf den Zellkern zugeschnitten und eine Aufnahme (Auflösung: 2048x2048 Pixel; Signalmittelung: 4-fach) gemacht.

Zur Erforschung der immunzytochemisch beladenen Zellen konnte analog vorgegangen werden. Geeignete Zellen wurden sequenziell durchrastert, um die Fokusebene der größten Ausdehnung des Zellkerns zu finden. Nachfolgend wurde in der entsprechenden Ebene eine Aufnahme (Auflösung: 2048x2048 Pixel; Signalmittelung: 4-, 8-, 16-fach) der gesamten Zelle gemacht. Entsprechend der verwendeten Sekundärantikörper (und deren angekoppelten Fluorophoren) wurden unterschiedliche Laser verwendet.

## **2.8 Auswertung**

Um den Effekt der Intervention auf das Versuchstier zu messen wurde das Körpergewicht sowohl vor dem Sham-/TAC-Eingriff als auch 7 Tage postoperativ bestimmt und die Gewichtsveränderung berechnet. Zusätzlich wurde das Herzgewicht (nach der Ektomie) ermittelt und in Relation zum postoperativen Körpergewicht und der Tibia-Länge gesetzt. Mit diesen Indices konnte der Einfluss der artifiziellen/induzierten Aortenstenose (TAC) auf ein pathophysiologisches myokardiales Remodeling (Herzhypertrophie) festgestellt werden.

Die konfokalen Aufnahmen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bildgebung wurden unter Verwendung einer Analysesoftware (Zeiss LSM 510 Image Browser, v4.2) untersucht.

Die Bilder der mittels Mag-Fluo-4/AM darstellbaren Zellkerne wurden verblindet ausgewertet. Zur quantitativen Bestimmung der nukleären Parameter wurden die Länge, Breite, Umfang und Tubulusanzahl ermittelt. Die tubulären Strukturen wurden entlang jener Hälfte der Zellkernmembran, die mehr Invaginationen zeigte, gezählt. Weiters wurde die absolute Anzahl der Tubuli auf den Umfang normiert ( $\mu\text{m}^{-1}$ ).

Die immunzytochemisch bearbeiteten Herzmuskelzellen wurden vergleichend analysiert. Hierbei wurde das Verteilungsmuster der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine in Bezug auf die Zellmembran, das Zytoplasma und den Zellkern zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Das Hauptaugenmerk (ROI) lag auf dem Nukleus und dem perinukleären Zytosol.

## **2.9 Statistische Analyse**

Die Analyse der quantitativ erhobenen Zellkernparameter erfolgte mittels Statistiksoftware (IBM SPSS Statistics, v22; GraphPad PRISM, v6.0f).

Mittels explorativer Datenanalyse konnte die Häufigkeitsverteilung der erhobenen Daten sowie deren Distributionsmuster bestimmt werden (Histogramme, Boxplots). Weiters

wurden die Messwerte auf Normalverteilung untersucht (Histogramme, Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest).

Anhand der Ergebnisse der Datenexploration und der Testung auf Normalverteilung wurde das entsprechende statistische Testverfahren ausgewählt und die erhobenen Werte statistisch analysiert.

Zunächst wurde eine Varianzanalyse unter Benützung eines Omnibus-Testverfahrens durchgeführt und die statistische Signifikanz ermittelt. Da die Daten keiner Normalverteilung folgten, kam ein nicht-parametrisches Testverfahren nach Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis-H-Test) zur Anwendung. Konnte die Nullhypothese verworfen werden, wurden paarweise Gruppenvergleiche mittels Post-Hoc-Tests durchgeführt (61). Um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden, erfolgte eine Korrektur der statistischen  $p$ -Werte entsprechend der Bonferroni-Methode. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  angenommen. Sämtliche Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

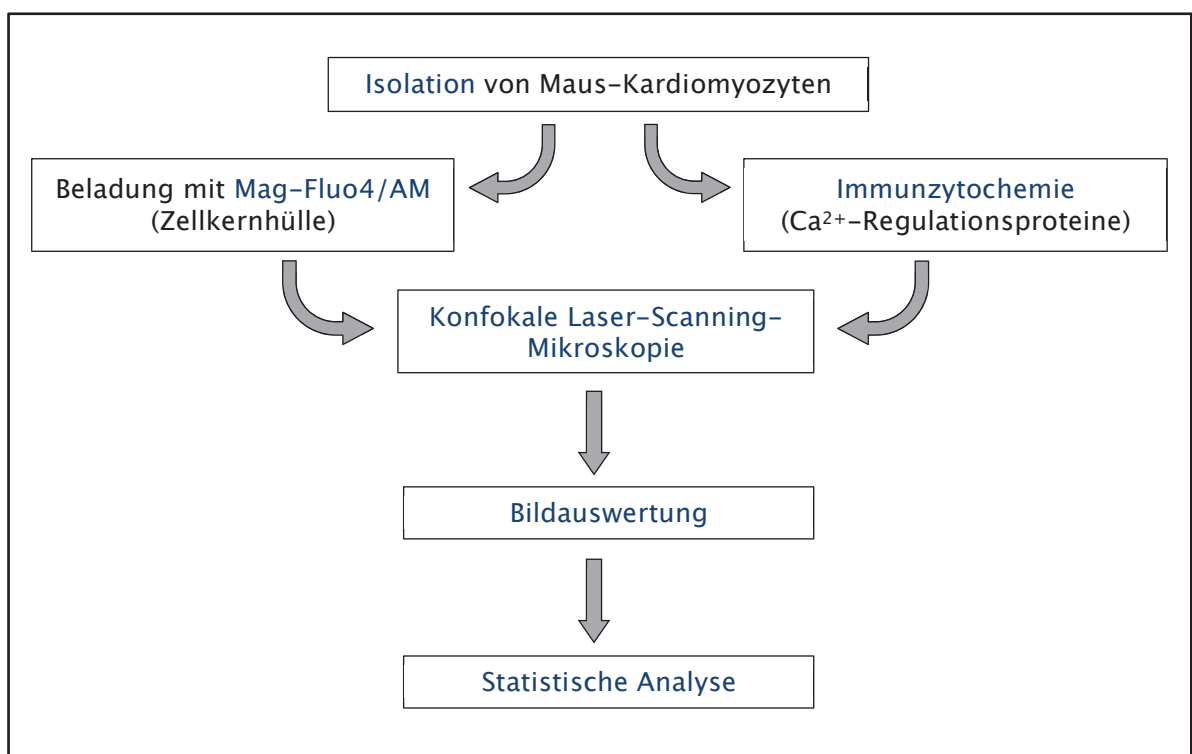
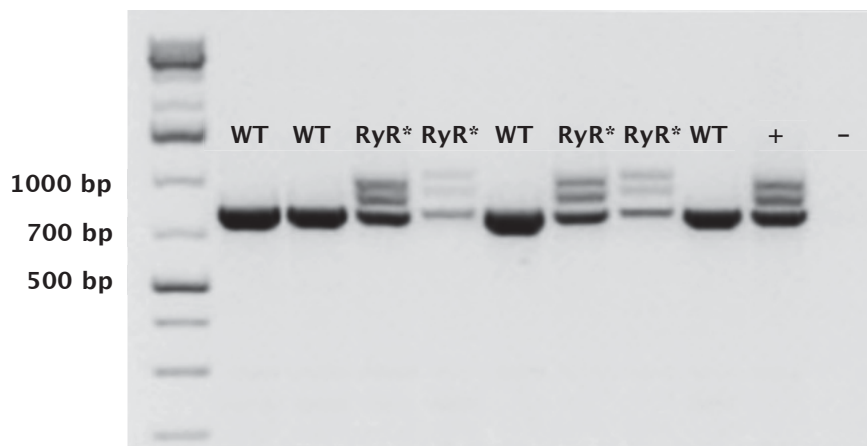


Abbildung 2.1: Die experimentelle Methodik

## 3 Ergebnisse

### 3.1 RyR2-Genotypisierung

Der Genotyp der Mäuse wurde mittels Immunoblot-Verfahren bestimmt (WT oder RyR2<sup>R4496C<sup>+/-</sup></sup>). Hierzu wurden die DNA-Fragmente auf Agarose-Gel (1,5%) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht.



**Abbildung 3.1: Immunoblot zur RyR2-Genotypisierung.** Abkürzungen: bp: Basenpaare, WT: Wildtyp, RyR\*: R4496C<sup>+/-</sup>; Positivkontrolle (+), Negativkontrolle (-)

### 3.2 Entwicklung kardialer Hypertrophie durch Drucklastserhöhung

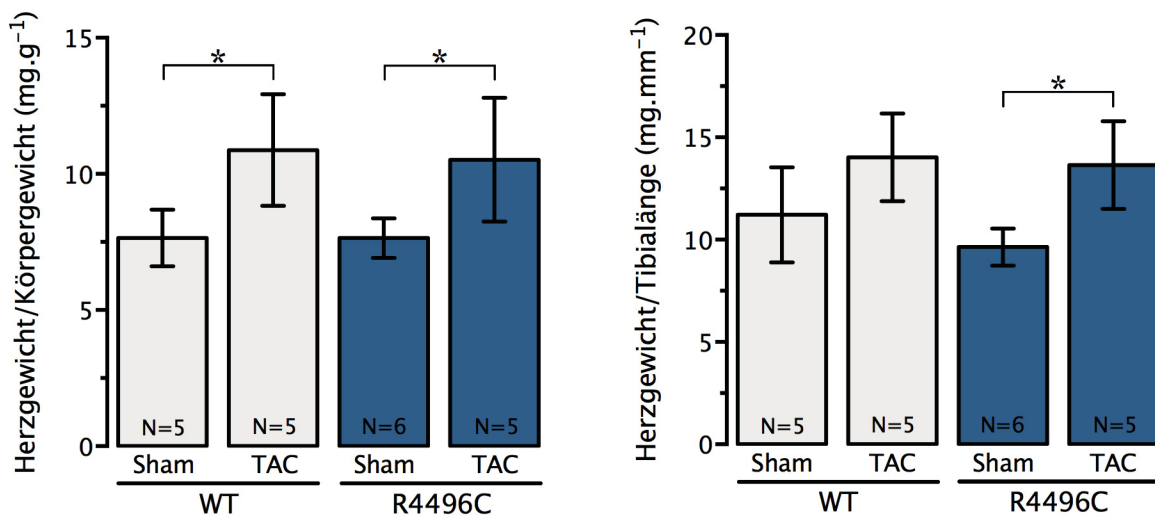
Das Körpergewicht der Mäuse wurde direkt vor der Intervention und 7 Tage post-OP (direkt vor der Zellisolation) bestimmt, um den Einfluss der operativen Interventionen in Abhängigkeit vom Genotyp der Mäuse festzustellen. Hierbei ergab sich bei den Wildtyp-Mäusen nach Sham-Intervention eine Gewichtszunahme von  $0,32 \pm 0,56$  g (N=5) während es nach TAC-Operation zu einer Gewichtsabnahme von  $2,49 \pm 2,41$  g (N=5) kam. Transgene Sham-operierte Mäuse (R4496C-Sham) zeigten eine Gewichtserhöhung von  $0,06 \pm 0,83$  g (N=6); nach transaortaler Konstriktion erlebten die mutierten Mäuse einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von  $1,97 \pm 1,87$  g (N=5).

Zusätzlich wurde das Herzgewicht (HG) in Bezug zum Körpergewicht (KG) (HG/KG-Quotient;  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) und der Länge der linken Tibia (TL) (HG/TL-Quotient;  $\text{mg} \cdot \text{mm}^{-1}$ ) gesetzt, um die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie zu bestimmen. Sham-operierte Mäuse zeigten ähnliche Herzgewicht/Körpergewicht (HG/KG) Indices sowie Herzgewicht/Tibia (HG/TL) Indices (Abb. 3.2). Zwischen den TAC-operierten Mäusen

ergab sich kein signifikanter Unterschied der Messwerte.

Der HG/KG-Quotient betrug bei WT-TAC  $10,87 \pm 2,05 \text{ mg.g}^{-1}$  und bei R4496C-TAC  $10,52 \pm 2,28 \text{ mg.g}^{-1}$ . Der HG/TL-Index belief sich bei WT-TAC auf  $14,02 \pm 2,15 \text{ mg.mm}^{-1}$ , bei R4496C-TAC auf  $13,65 \pm 2,14 \text{ mg.mm}^{-1}$  (Abb. 3.2). In Abhängigkeit von der operativen Maßnahme erwiesen sich bei HG/KG signifikante Unterschiede innerhalb der Genotyp-Gruppen:  $\chi^2(3)=13,96$ ;  $p<0,05$ . Die Medianwerte differierten signifikant zwischen WT-Sham und WT-TAC ( $p<0,05$ ) sowie zwischen R4496C-Sham und R4496C-TAC ( $p<0,05$ ). Auch bei HW/TL konnte folgender signifikanter Unterschied ermittelt werden:  $\chi^2(3)=10,646$ ;  $p<0,05$ . Nach TAC-Intervention kam es innerhalb der R4496C-Gruppe (R4496C-TAC versus R4496C-Sham) zu einer Zunahme des HG/TL-Index ( $p<0,05$ ). Innerhalb der Wildtyp-Gruppe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In Gesamtbetrachtung sämtlicher Messwerte wurde der Einfluss der Interventionen und der Genotypen auf den Remodeling-Prozess unabhängig voneinander ermittelt. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Interventionseffekt (HG/KG:  $p<0,05$ ; HG/TL:  $p<0,05$ ), jedoch kein Einfluss durch die genetischen Unterschiede gefunden werden.



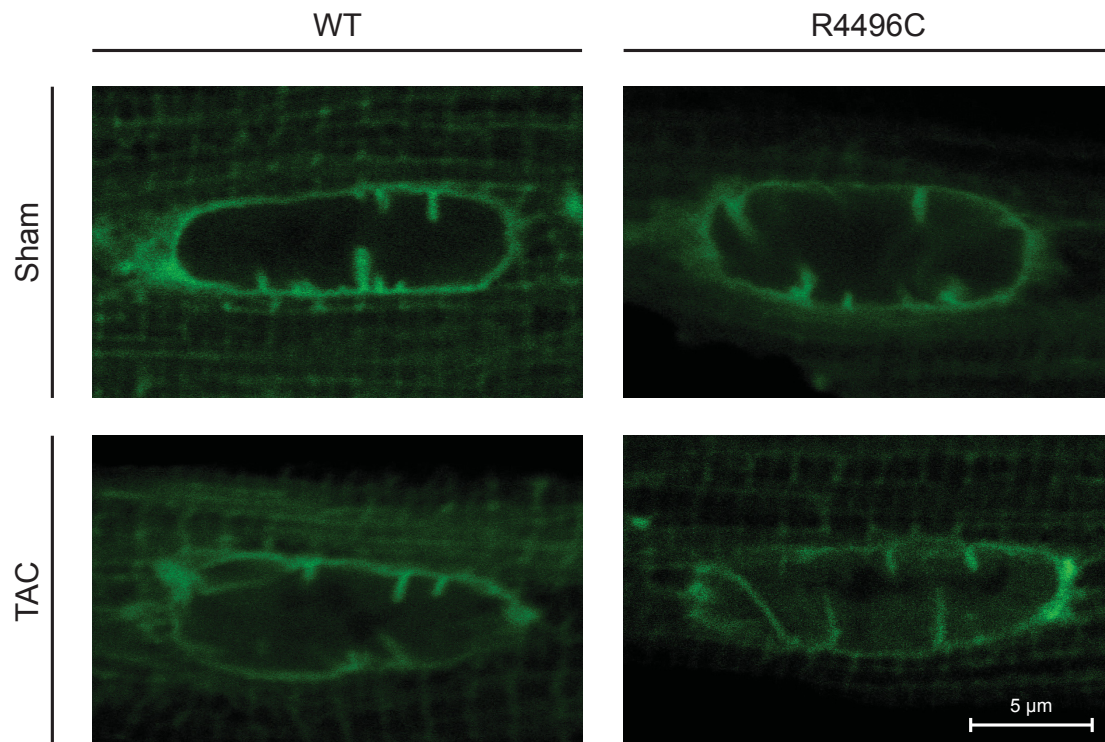
**Abbildung 3.2: Herzgewicht-Körpergewicht Verhältnis und Herzgewicht-Tibialänge Verhältnis.**

N=Anzahl der Herzen/Gruppe.

Angabe der Daten in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Testung mittels Kruskal-Wallis-H-Test und anschließender Post-Hoc-Analyse;  $p$ -Werte nach Bonferroni-Methode korrigiert (\*  $p<0,05$  vs. Sham).

### 3.3 Remodeling der Zellkernmembran durch Drucklasterhöhung

Zur Ermittlung des Einflusses der Druck-induzierten Überlast auf die Zellkernmorphologie wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten mit Mag-Fluo-4/AM beladen und deren Zellkernhülle und Invaginationen in das Zellkernlumen visualisiert (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3: Remodeling der Zellkernmembran bei Drucklast-induzierter Hypertrophie.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen der Nuklei von Sham- und TAC-operierten Mäusen (WT und R4496C<sup>+/-</sup>) 7 Tage *post interventionem*. Beladung und Visualisierung der Zellkernmembran mit dem fluoreszierenden Farbstoff Mag-Fluo-4/AM und nachfolgender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Verwendung eines Argon-Ionen-Lasers (Wellenlänge: 488 nm). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 5 μm.

Transgene TAC-Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren scheinoperierten Wurfgeschwistern eine signifikante Längenzunahme des Zellkernes; Herzmuskelzellen von WT-Mäusen hatten vergleichbare Zellkernlängen (Tab. 3.1, Abb. 3.4, Abb. 3.7).

Eine wesentliche Zellkernverbreiterung konnte sowohl bei Wildtyp-Genom als auch bei RyR2-mutierten Mäusen (innerhalb derer Genotypen) nach artifizieller Aortenstenosierung beobachtet werden (Tab. 3.1, Abb. 3.4, Abb. 3.7).

Auch der Zellkernumfang vergrößerte sich bei den TAC-operierten Mäusen (WT und R4496C) in signifikantem Ausmaß: Die Überdruck-belasteten Mäuse zeigten sowohl im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren desgleichen Genotyps als auch zwischen WT

und R4496C eine signifikante Größenzunahme des Zellkernumfanges (Tab. 3.1, Abb. 3.4, Abb. 3.7).

Nach TAC-Intervention verminderte sich die Anzahl der Einstülpungen des nukleoplasmatischen Retikulums innerhalb beider Genotyp-Gruppen, überdies kam es zwischen WT-Sham und R4496C-Sham zu einer Tubulusreduktion (Tab. 3.1, Abb. 3.4, Abb. 3.7).

Weiters wurde die Anzahl der tubulären Membraneinstülpungen auf den Zellkernumfang normiert, um deren relative Anzahl beurteilen zu können. Im Vergleich zu den Veränderungen der absoluten Tubulusanzahl zeigte sich keine signifikante Reduktion zwischen den Sham-operierten Mäusen, jedoch zwischen WT-TAC und R4496C-TAC (Tab. 3.1, Abb. 3.4, Abb. 3.7).

Schließlich wurden die Zusammenhänge der Zellkernlänge und der Zellkernbreite mit dem Zellkernumfang untersucht, indem die Verteilung ebendieser Parameter in Streudiagrammen graphisch dargestellt wurde (Abb. 3.5, 3.6).

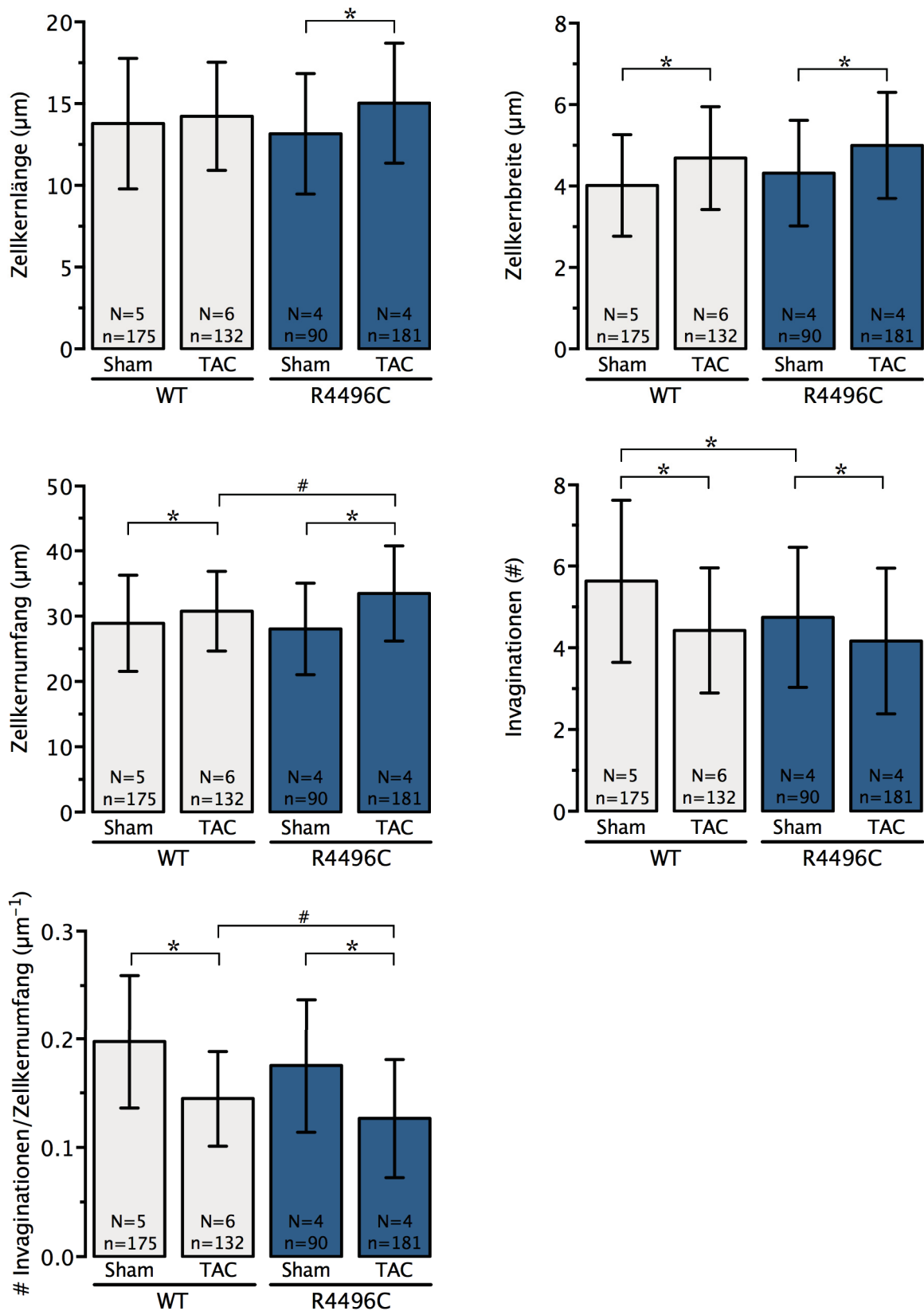
Die erhobenen Daten der Zellkernuntersuchungsreihe sind in Tab. 3.1 zusammenfassend veranschaulicht.

**Tabelle 3.1: Tabellarische Zusammenfassung der Zellkernparameter**

Zellkernparameter	WT-Sham	WT-TAC	R4496C-Sham	R4496C-TAC
<b>Länge (µm)</b>	13,78±3,99	14,23±3,31	13,16±3,69	15,04±3,67 <sup>*</sup>
<b>Breite (µm)</b>	4,01±1,25	4,69±1,26 <sup>*</sup>	4,32±1,30	5,00±1,30 <sup>*</sup>
<b>Umfang (µm)</b>	28,93±7,37	30,77±6,12 <sup>*</sup>	28,05±7,00	33,50±7,29 <sup>*,#</sup>
<b># Invaginationen</b>	5,63±2,00	4,42±1,53 <sup>*</sup>	4,74±1,71 <sup>*</sup>	4,17±1,78 <sup>*</sup>
<b># Inv./Umfang (µm<sup>-1</sup>)</b>	0,19±0,06	0,15±0,04 <sup>*</sup>	0,18±0,06	0,13±0,05 <sup>*,#</sup>

Präsentation der Daten in Mittelwert ± Standardabweichung.

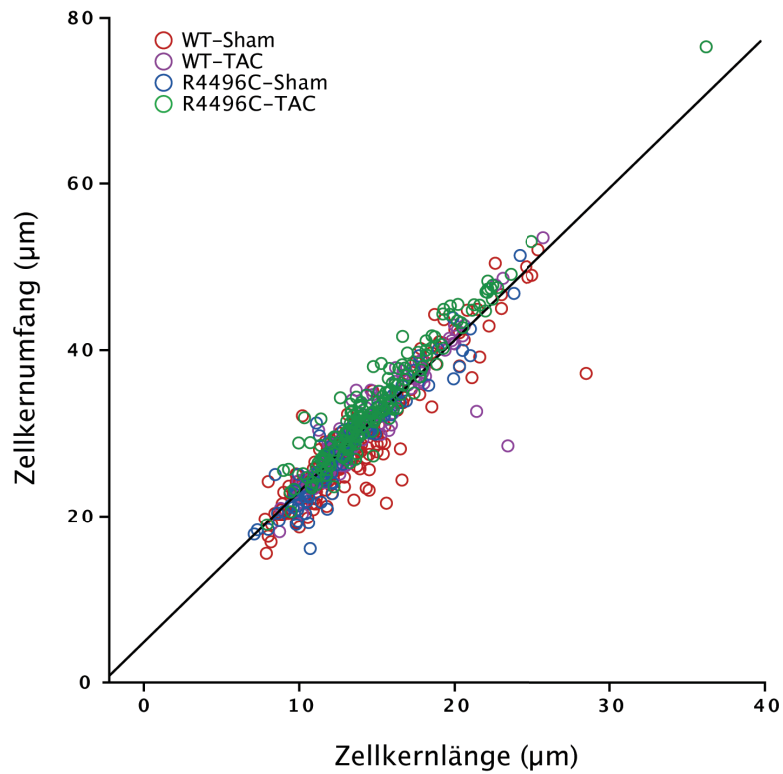
Statistische Testung mittels Kruskal-Wallis-H-Test und anschließender Post-Hoc-Analyse; *p*-Werte nach Bonferroni-Methode korrigiert (<sup>\*</sup>*p*<0,05 vs. Sham; <sup>#</sup>*p*<0,05 vs. TAC)



**Abbildung 3.4 Balkendiagramme zur Zellkernparameter-Analyse.**

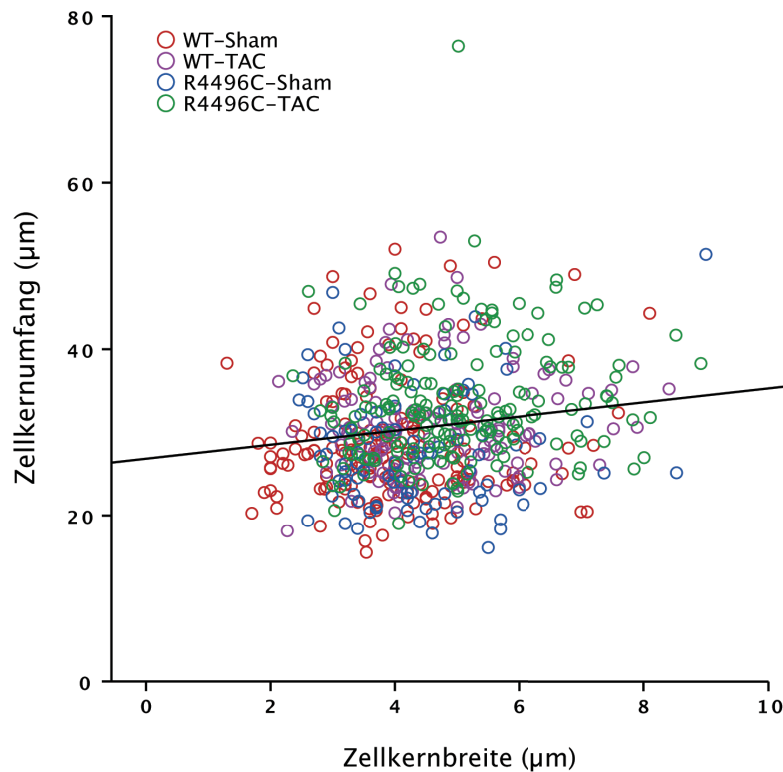
N=Anzahl der Herzen pro Gruppe; n=Anzahl der untersuchten Nuklei.

Angabe der Daten in Mittelwert ± Standardabweichung. Statistische Testung mittels Kruskal-Wallis-H-Test und anschließender Post-Hoc-Analyse; *p*-Werte nach Bonferroni-Methode korrigiert (\**p*<0,05 vs. Sham; #*p*<0,05 vs. TAC).



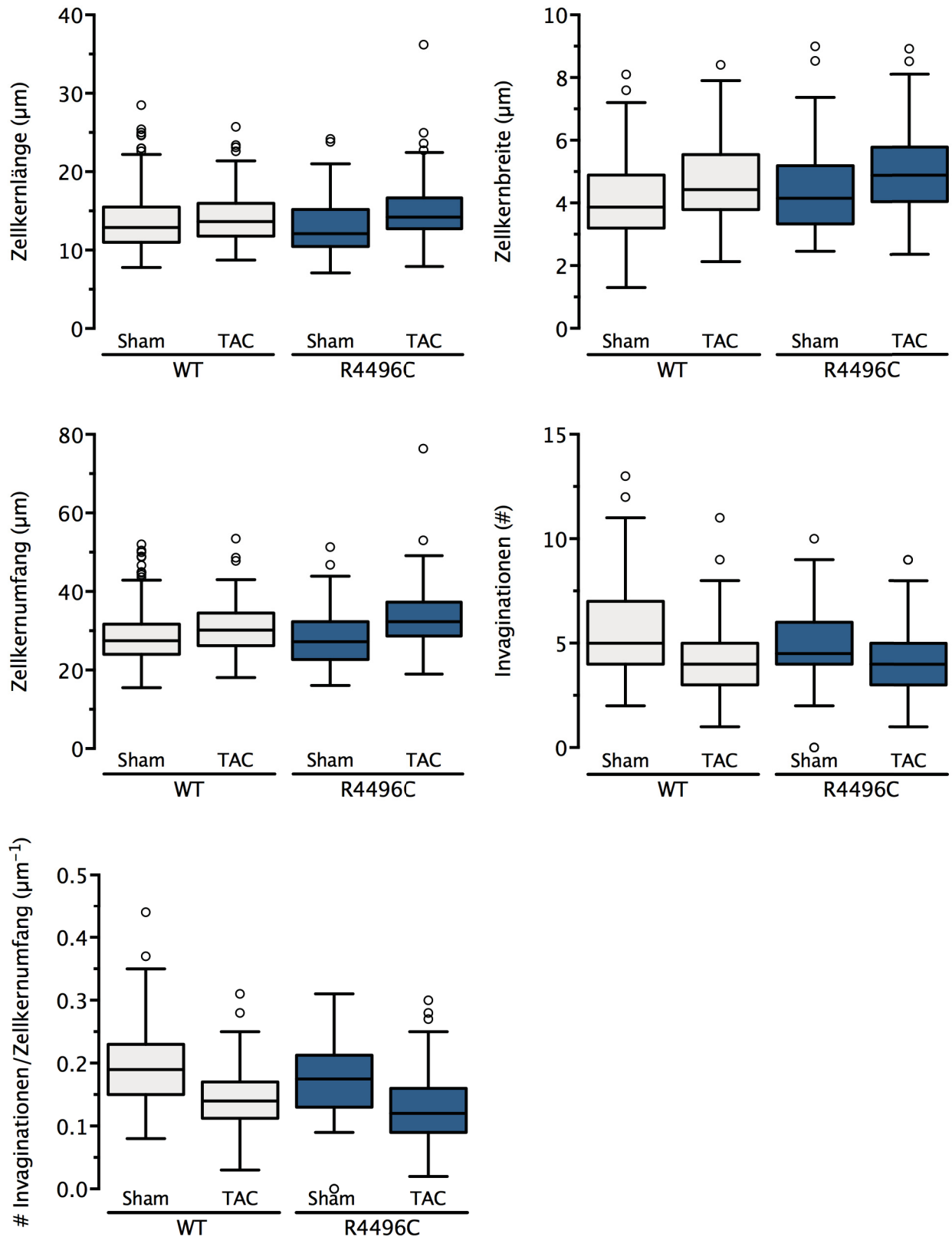
**Abbildung 3.5 Korrelation von Zellkernlänge und Zellkernumfang.**

Aus der Anpassungslinie der Gesamtsumme ergibt sich folgende Geradengleichung:  $y=4,84+1,82 \cdot x$ .  
 Kreisförmige Messwerte: WT-Sham (rot), WT-TAC (violett), R4496C-Sham (blau) und R4496C-TAC (grün)



**Abbildung 3.6 Korrelation von Zellkernbreite und Zellkernumfang.**

Aus der Anpassungslinie der Gesamtsumme ergibt sich folgende Geradengleichung:  $y=26,84+0,84 \cdot x$ .  
 Kreisförmige Messwerte: WT-Sham (rot), WT-TAC (violett), R4496C-Sham (blau) und R4496C-TAC (grün)



**Abbildung 3.7: Boxplot-Diagramme zur Zellkernparameter-Analyse.**

Die maximale Länge der Whisker ist auf den 1,5-fachen Faktor des Interquartilabstandes beschränkt (Methode nach John W. Tukey). Ausreißer sind kreisförmig gezeigt.

### **3.4 Perinukleäre Lokalisation von intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteinen bei kardialem Remodeling**

$\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine (RyR2, InsP<sub>3</sub>R2, CASQ2, SERCA2a) des SR und NR wurden mittels indirekter Immunzytochemie-Methodik mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend mikroskopisch visualisiert. Damit wurde die (peri)nukleäre Lokalisierung der Regulationsproteine unter Einfluss der Drucküberlast untersucht.

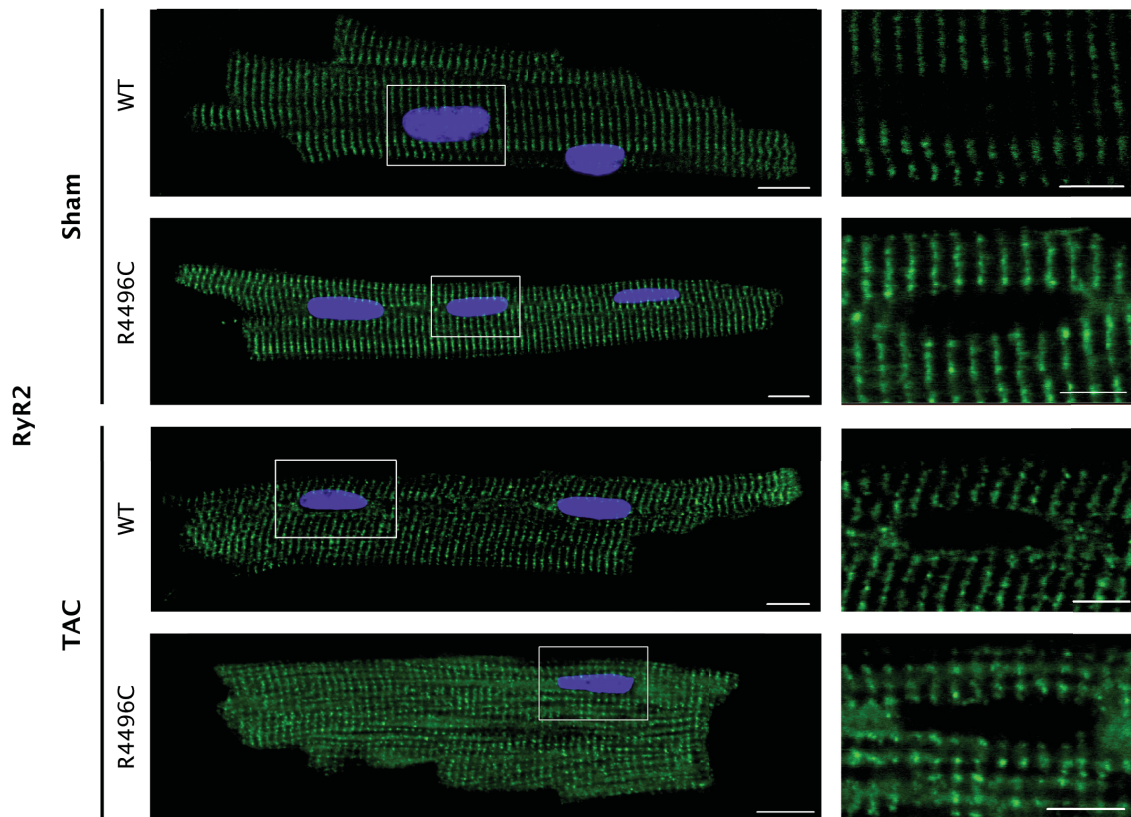
#### **3.4.1 RyR2**

**WT-Sham.** WT-Sham-Kardiomyozyten zeigten im Intrazellularraum ein gleich- und regelmäßiges gestreiftes Anordnungsmuster des RyR2. Das betont punktierte Fluoreszenzsignal, welches die histologische Organisation des SR und der T-Tubuli widerspiegelte, war im gesamten Zytosol vorhanden. In der perinukleären Region (der erweiterten Längsachse des Zellkerns) fand sich eine diskrete Signalminderung. Es zeigte sich zudem, dass RyR2 das Nukleoplasma nicht durchsetzt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle „umschlossen“ den Zellkern mit einem durchschnittlichen Abstand von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$ .

**R4496C-Sham.** Vergleichend mit WT-Sham konnte bei R4496C-Sham-Herzmuskelzellen kein deutlicher Lokalisierungsunterschied von RyR2 festgestellt werden. Perinukleär zeigte sich lediglich eine etwas „unordentlichere“ Anordnung der Rezeptoren.

**WT-TAC.** Nach einwöchiger Aortenkonstriktion hatten Wildtyp-Kardiomyozyten ein verstärkt vermindertes Fluoreszenzsignal in der perinukleären Längsachse des Zellkernes. Weiters wirkte die Anordnung der Rezeptoren im umliegenden Bereiche des Zellkernes verwaschen und weniger gerichtet als im restlichen Zytosol. Im Vergleich mit den Herzmuskelzellen der scheinoperierten Mäuse war diese Intensitätsminderung über einen weiteren Abstand vom Zellkern gekennzeichnet.

**R4496C-TAC.** R4496C-TAC-Herzmuskelzellen zeigten ähnliche RyR2-Lokalisierungsveränderungen wie WT-TAC-Kardiomyozyten.



**Abbildung 3.8: Anordnung von RyR2 bei kardialen Remodeling durch Druck-induzierte Überlast.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen von ventrikulären Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten WT- und R4496C-Mäusen 7 Tage *post interventionem*. Immunocytochemische Beladung von RyR2 (grün) und Zellkernen (violett). Links: Ventrikuläre Herzmuskelzellen, Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der (peri)nukleären Region, Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$

### 3.4.2 InsP<sub>3</sub>R2

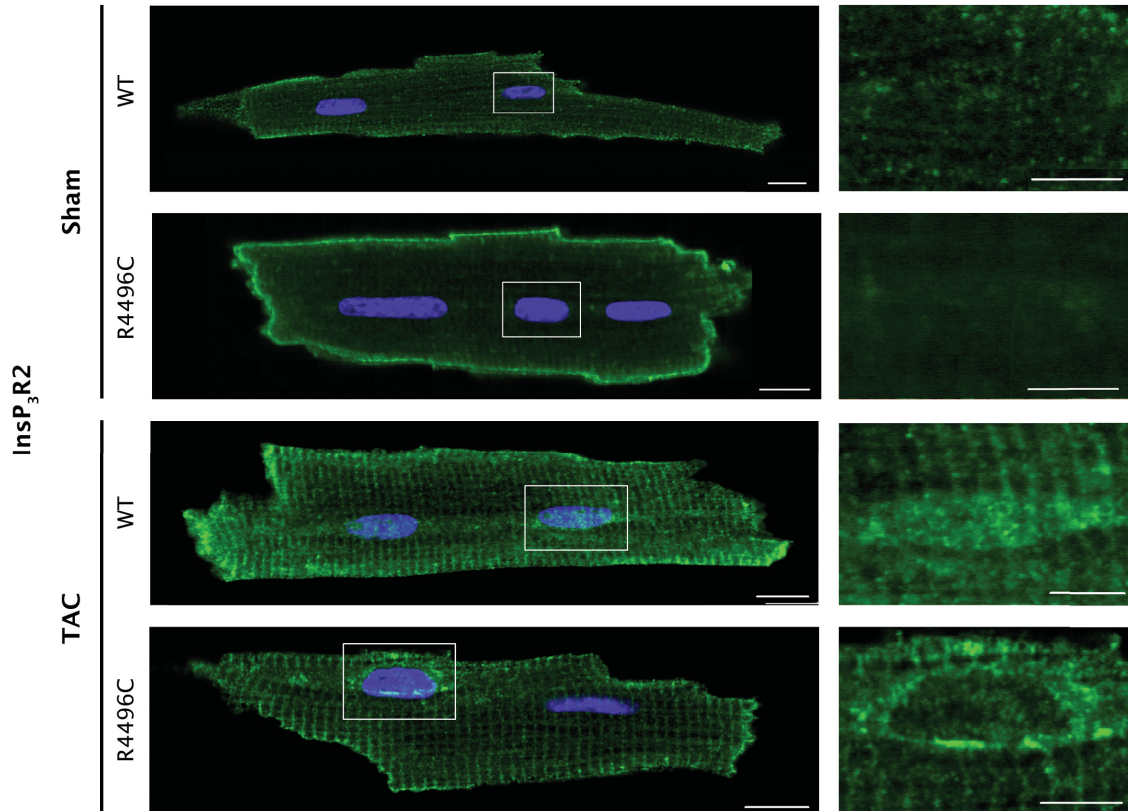
**WT-Sham.** Im Zytoplasma zeigte InsP<sub>3</sub>R2 eine gleichmäßig gestreifte, orthogonal zur zellulären Längsachse ausgerichtete Anordnung mit deutlichster Expression im umliegenden Bereich des Sarkolemma. Weiters war an der Zellkernhülle und im perinukleären Zytoplasma ein etwas verstärktes Fluoreszenzsignal festzustellen. Das Signal im perinukleären Bereich war hauptsächlich verwaschen und in Längsachse des Nukleus vorhanden.

**R4496C-Sham.** Das Verteilungsmuster der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in transgenen Sham-Myozyten war mit der Rezeptoranordnung in WT-Sham-Myozyten vergleichbar. An der Zellmembran, der perinukleären und nukleären Region zeigte sich ein stärkeres Fluoreszenzsignal.

**WT-TAC.** InsP<sub>3</sub>R2 war im Vergleich mit den Herzmuskelzellen der Sham-Mäuse in verminderter Intensität im Bereich des Plasmalemmas exprimiert, obwohl das Fluoreszenzsignal an der Zellmembran verhältnismäßig gut ausgeprägt war. Es war

auffallend, dass sich im perinukleären Zytosol und an der Zellkernhülle eine deutlich verstärkte Intensität des Fluoreszenzsignals zeigte.

**R4496C-TAC.** Zwischen WT-TAC und R4496C-TAC konnte kein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität und Anordnung ermittelt werden.



**Abbildung 3.9: Anordnung von InsP<sub>3</sub>R2 bei kardialen Remodeling durch Druck-induzierte Überlast.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen von ventrikulären Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten WT- und R4496C-Mäusen 7 Tage *post interventionem*. Immunzytochemische Beladung von InsP<sub>3</sub>R2 (grün) und Zellkernen (violett). Links: Ventrikuläre Herzmuskelzellen, Maßstabsbalken: 10 µm; Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der (peri)nukleären Region, Maßstabsbalken: 5 µm

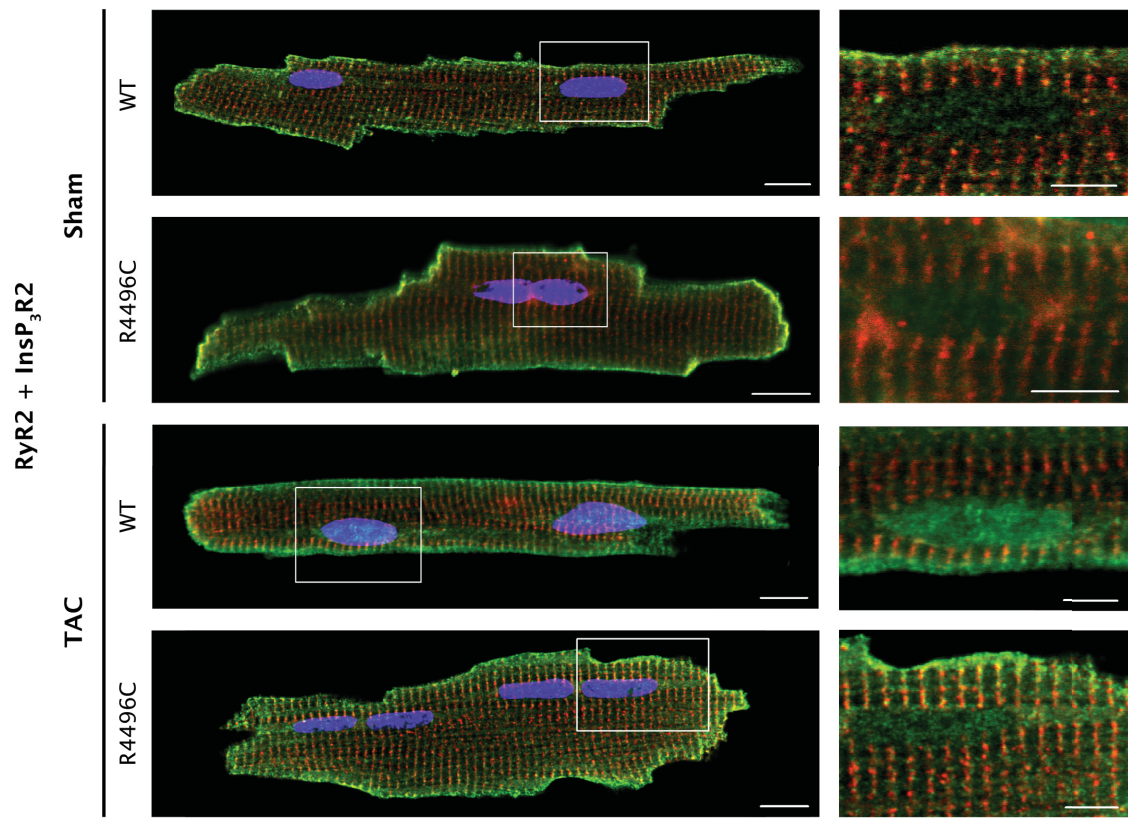
### 3.4.3 Doppelbeladung: RyR2 + InsP3R2

Die Co-Lokalisierungsuntersuchungen konnten die Veränderungen der Anordnung der Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine in Relation zueinander aufzeigen.

In Herzmuskelzellen Sham-operierter Mäuse (WT und R4496C) co-lokalisierte RyR2 mit InsP<sub>3</sub>R2 (Zellkernhülle). So wies RyR2 in der perinukleären Längserweiterung des Zellkerns ein gleichmäßig gestreiftes Anordnungsmuster auf.

1 Woche nach TAC-Intervention zeigten die ventrikulären Kardiomyozyten (WT und R4496C) Veränderungen der RyR2- und InsP<sub>3</sub>R2-Expression: Es kam zur deutlichen Zunahme des Fluoreszenzsignals des InsP<sub>3</sub>-Rezeptors im Zellkern und perinukleären

Zytosol. Zugleich kam es zur perinukleären Signalintensitätsabnahme des RyR2 durch Diskontinuität der Rezeptorexpression in der Längserweiterung des Zellkernes.



**Abbildung 3.10: Co-Lokalisierung von RyR2 und InsP<sub>3</sub>R2 bei kardialen Remodeling durch Druck-induzierte Überlast.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen von ventrikulären Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten WT- und R4496C-Mäusen 7 Tage *post interventionem*. Immunzytochemische Beladung von RyR2 (rot), InsP<sub>3</sub>R2 (grün) und Zellkernen (violett). Links: Ventrikuläre Herzmuskelzellen, Maßstabsbalken: 10 µm; Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der (peri)nukleären Region, Maßstabsbalken: 5 µm

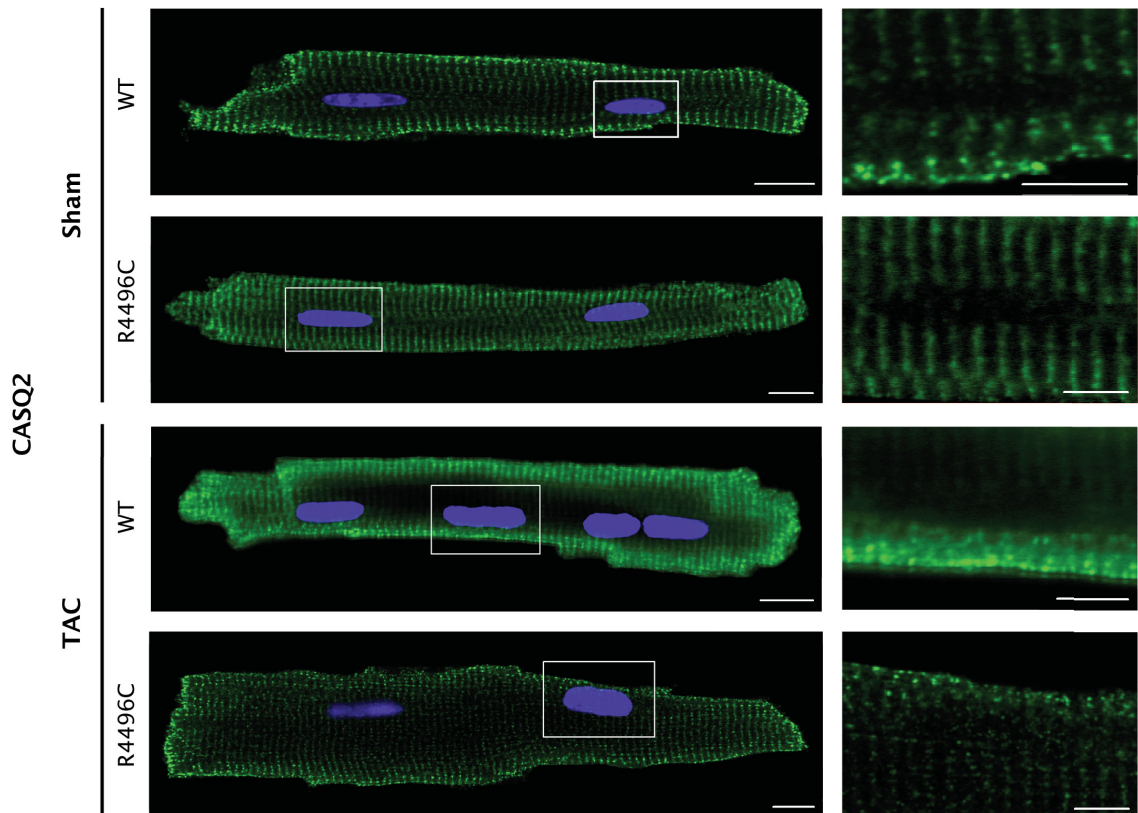
### 3.4.4 CASQ2

**WT-Sham.** Im Zytoplasma der WT-Sham-Zellen zeigte CASQ2 ein punktiertes Expressionsmuster mit regelmäßig streifiger Gliederung. Die streifige Anordnung des Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteins war orthogonal zur Längsachse der Kardiomyozyten. Bemerkenswert war die homogene Signalintensität nahe der Zellmembran. Diese selbst zeigte kein Fluoreszenzsignal. Im perinukleären Zytosol konnte eine verminderte Signalintensität festgestellt werden. So war das SR in der perinukleären Fortsetzung der Zellkernlänge nur mehr verwaschen erkennbar. Der Umriss der Zellkernmembran konnte aufgrund schwacher Farbstoffmarkierung erahnt werden.

**R4496C-Sham.** Die CASQ2-Rezeptorexpression war in scheinoperierten RyR2-mutierten Mäusen dem Expressionsmuster in WT-Sham-Herzmuskelzellen ähnlich.

**WT-TAC.** Nach TAC-Eingriff kam es sowohl im Zytoplasma als auch im Bereich des perinukleären Zytosol zu einer Signalintensitätsabnahme. Die Rezeptoranordnung zeigte auch hier ein streifiges, geregeltes Muster.

**R4496C-TAC.** Insgesamt konnte im Vergleich zu den scheinoperierten R4496C-Kardiomyozyten ein geringer Ordnungsverlust des Expressionsmusters von CASQ2 festgestellt werden. Die Signalintensitätsabnahme im Zentrum der Zelle und in der perinukleären Region war vergleichbar mit den WT-TAC-Kardiomyozyten.



**Abbildung 3.11: Anordnung von CASQ2 bei kardialem Remodeling durch Druck-induzierte Überlast.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen von ventrikulären Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten WT- und R4496C-Mäusen 6 bis 8 Tage *post interventionem*. Immunocytochemische Beladung von CASQ2 (grün) und Zellkernen (violett). Links: Ventrikuläre Herzmuskelzellen, Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der (peri)nukleären Region, Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$

### 3.4.5 SERCA2a

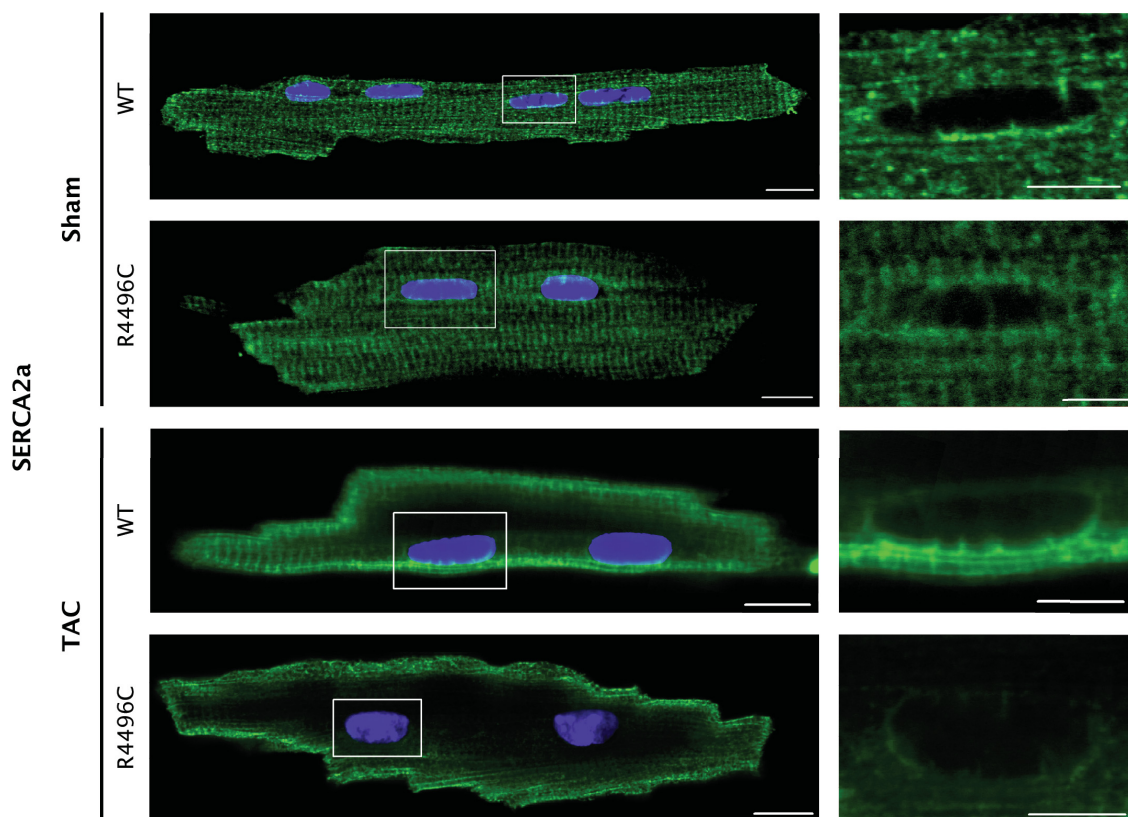
**WT-Sham.** SERCA2a zeigte im Zytoplasma von WT-Sham-Herzmuskelzellen ein gleichmäßig punktiert bis netzwerk- und gitterartiges Anordnungsmuster. Zudem war die Signalintensität im gesamten Zytosol äußerst gleichmäßig ausgeprägt. Zum Teil waren diffuse Signalerhöhungen im Zytoplasma, die jedoch keine Regelmäßigkeiten zeigten, erkennbar. Auffällig war die ausgeprägte Fluoreszenzsignalintensität Zellkernmembran mit hervorragend ersichtlichen Invaginationen des NR. In Gesamtbetrachtung der Zelle waren

die Kernmembran und das NR signalintensiver als die zytoplasmatischen Strukturen. Das Zellkernlumen und das Sarkolemma selbst zeigten kein Fluoreszenzsignal.

**R4496C-Sham.** SERCA2a zeigte im Vergleich mit WT-Sham ein vergleichbares Verteilungsmuster mit ähnlichen Signalintensitäten.

**WT-TAC.** Nach einwöchiger Drucklasterrhöhung zeigten WT-Kardiomyozyten größtenteils einen deutlichen Signalverlust im Zytoplasol. Die Zellkernmembran der WT-TAC-Myozyten wies, vergleichend mit den scheinoperierten WT-Herzmuskelzellen, eine signifikante Signalintensitätsminderung mit schlechterer Nachvollziehbarkeit des NR auf.

**R4496C-TAC.** Kardiomyozyten der transgenen Mäuse unterlagen nach transaortaler Konstriktion ähnlichen Veränderungen wie WT-TAC-Herzmuskelzellen.



**Abbildung 3.12: Anordnung von SERCA2a bei kardialem Remodeling durch Druck-induzierte Überlast.** Originale konfokale 2D-Aufnahmen von ventrikulären Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten WT- und R4496C-Mäusen 7 Tage *post interventionem*. immunzytochemische Beladung von SERCA2a (grün) und Zellkernen (violett). Links: Ventrikuläre Herzmuskelzellen, Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der (peri)nukleären Region, Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Gain-of-Function-Mutation des RyR2-Gens (R4496C<sup>+/-</sup>) auf die subzelluläre Morphologie ventrikulärer Kardiomyozyten bei Druck-induzierter Überlast (TAC) untersucht. RyR2-Dysregulationen bedingen Störungen des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signaling und bergen damit das Risiko für das Auftreten schwerwiegender ventrikulärer Tachykardien und des plötzlichen Herztodes (18,20,21,53,54,62). Beobachtete Veränderungen (i) des Zellkerns und der Zellkernhüllen-Morphologie sowie (ii) der perinukleären Anordnung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine ließen auf das Ausmaß kardialen Remodelings in der Frühphase der Herzinsuffizienz schließen. Dazu wurden Herzmuskelzellen des ventrikulären Myokards von Mäusen mit heterozygoter RyR2-Mutation und Kontroll-Mäusen (WT) isoliert, mit Fluoreszenzmolekülen konjugiert (Mag-Fluo-4/AM oder Immunzytochemie) und lichtmikroskopisch (LSM) dargestellt. 7 Tage vor den experimentellen Untersuchungen erfolgten operative Eingriffe (Sham/TAC).

### 4.1 Quantifizierung kardialer Hypertrophie

Die erhobenen Daten (HG/KG und HG/TL) bestätigen, dass die transaortale Konstriktion (TAC) durch Drucklasterrhöhung die Entstehung von Hypertrophie begünstigt (Abb. 3.2). Eine Testung des unabhängigen Einflusses entweder durch den Genotyp oder durch die Intervention zeigte, dass es in Abhängigkeit vom operativen Eingriff (jedoch unabhängig vom Genom) zu signifikant unterschiedlichem hypertrophischem Remodeling kam ( $p < 0,05$ ). Die genetische Disposition bedingte (unabhängig vom Eingriff) keine statistisch-signifikanten Umstrukturierungen des Herzens.

### 4.2 Subzelluläres Remodeling in ventrikulären Kardiomyozyten durch Drucklasterrhöhung

#### 4.2.1 Morphologie des Zellkerns und der Zellkernhülle

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass R4496C-Herzen bei kardialem Remodeling unterschiedliche morphologische Veränderungen der Zellkernhülle aufweisen als WT-Herzen (Tab. 3.1, Abb. 3.3, Abb. 3.4): Nach TAC entwickelten R4496C-Kardiomyozyten eine signifikante Zunahme des Kernumfangs und Abnahme der normalisierten Invaginationsanzahl (Anzahl der Invaginationen pro  $\mu\text{m}$  Zellkernumfang).

Die Zellkerne von R4496C-Sham-Herzmuskelzellen zeigten im Vergleich mit WT-Sham-Myozyten eine signifikante Reduktion der Einstülpungen des NR. Dies könnte dadurch begründet sein, dass es in Kardiomyozyten mit kongenitaler RyR2-Dysfunktion bereits unter basalen Konditionen zu initialen Remodeling-Prozessen kommt.

Zudem kam es innerhalb derselben Genotyp-Gruppen nach TAC zu Veränderungen der Zellkernstruktur: In R4496C-Herzen vergrößerte sich die Länge, Breite und der Umfang des Zellkerns. Zudem verminderte sich die absolute und normalisierte Invaginationsanzahl. WT-Herzen zeigten selbige Umstrukturierungen, jedoch mit der Ausnahme, dass die Zellkernlänge unverändert blieb.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Umfang mit der Länge des Zellkerns korreliert (Abb. 3.5). Bei Umfang und Breite der Kernhülle, konnte eine schwächere Wechselbeziehung gefunden werden (Abb. 3.6).

Die erhobenen Messwerte lassen auf folgende Remodeling-Einflüsse schließen: (i) Der TAC-Eingriff induziert unabhängig vom Genotyp morphologische Veränderungen der Zellkernhülle; (ii) In Bezug auf Zellkernumfang und der normalisierten Invaginationsanzahl zeigen R4496C-TAC-Mäuse im Vergleich zu ihren WT-TAC-Wurfgeschwistern verstärktes maladaptives Remodeling; (iii) Die Mutation des RyR2-Gens führt auch nach Scheinoperation zu alteriertem Remodeling; (iiii) Die stark-positive Korrelation des Kernumfanges mit der Kernlänge (jedoch schwach-positiv mit der Kernbreite) deutet darauf hin, dass Zellkernvergrößerungen eher durch Längenwachstum als durch Breitenwachstum bedingt sind.

Die Umstrukturierungen der Zellkernhülle könnten zu Veränderungen der nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führen: (i) Eine allgemeine Vergrößerung der Zellkerne und (ii) eine Verminderung an Invaginationen erhöhen die Diffusionsstrecke von  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb des Nukleoplasmas. Dies kann wiederum Veränderungen der nukleären CaTs bewirken und somit nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierungsprozesse wie die Genexpression (ETC) beeinflussen. Ljubojević et al. (2014) zeigten, dass Kardiomyozyten von WT-TAC-Mäusen und dekompensierten menschlichen Herzen Verlangsamungen des Aufstrichs und der Abnahme von nukleären CaTs aufweisen. Bemerkenswert ist, dass die nukleären CaTs zu einem früheren Krankheitsstadium Veränderungen zeigten als die zytoplasmatischen CaTs (23). Diese Erkenntnis wies erstmals darauf hin, dass die molekularen Prozesse des Remodelings im Zellkern ihren Ausgang nehmen.

Experimentelle Untersuchungen des funktionellen Remodelings in R4496C-Herzen (Diplomarbeit von Clemens Reiter) führten zu dem Ergebnis, dass die Amplituden der

zytoplasmatischen, perinukleären und nukleoplasmatischen CaTs nach TAC signifikant vermindert sind und die Ca<sup>2+</sup>-Entfernung aus diesen Kompartimenten verlängert ist. Zudem zeigte sich eine Zeitverzögerung im Aufstrich der nukleären CaTs in R4496C-TAC-Kardiomyozyten. Ebendiese funktionellen Veränderungen könnten durch die in dieser Arbeit ermittelte strukturelle Reorganisation der Zellkerne von R4496C-TAC-Herzmuskelzellen mitverursacht werden.

#### **4.2.2 Lokalisation der Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine**

Die Vorgänge der Speicherung, Freisetzung und Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> aus dem SR und dem NR werden hauptsächlich von folgenden Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteinen vermittelt: (1) Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungskanäle (RyR2 und InsP<sub>3</sub>R2), (2) SR-luminale Ca<sup>2+</sup>-Bindungsproteine (CASQ2) und (3) Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahmepumpen (SERCA2a).

Die Expression und Verteilung der Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine determinieren die Kinetik und Amplitude der nukleären und zytosolischen CaTs (10,23,42). Nukleoplasmatisches und zytoplasmatisches Ca<sup>2+</sup>-Signaling mediiert essentielle zelluläre Prozesse wie die ETC und ECC, wodurch die Genese kardialer Hypertrophie und Insuffizienz beeinflusst wird (27). Somit nimmt die Anordnung der Ca<sup>2+</sup>-Regulationsproteine eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz ein (23).

Zudem stellt eine erhöhte diastolische SR Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung einen kausalen pathogenetischen Faktor dar, welche durch Dysregulationen des RyR2 hervorgerufen wird (18). Hierdurch kommt es zu Anomalien des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signaling mit konsekutiven maladaptiven Dysfunktionen des Myokardiums (18).

Neben funktionellen Veränderungen treten bei der Herzinsuffizienz morphologische Umstrukturierungen auf: So kommt es bekannterweise im perinukleären Zytosol zu Verminderungen der RyR2-Expression (23). In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Veränderungen der Rezeptor-Expression ermittelt werden. Herzmuskelzellen von WT-TAC und R4496C-TAC Herzen wiesen eine RyR2-Reduktion in der perinukleären Erweiterung der Längsachse des Nukleus auf. Wie bereits berichtet, zeigte sich, dass RyR2 das Nukleoplasma nicht penetriert sondern eine Art „Käfig“ um dieses bildet (16,23). Zudem war die Anordnung der Rezeptoren im umliegenden Bereiche des Zellkernes weniger gerichtet als im restlichen Zytosol. Dies lässt eine Hypertrophie-bedingte Reduktion und Reorganisation des sarkolemmalen T-Tubulus-Systems vermuten. He et al. (2001) zeigten, dass Kardiomyozyten insuffizienter Herzen Verminderungen der T-Tubulus-Dichte aufweisen (63). Im Jahr 2006 ermittelte die selbe Arbeitsgruppe, dass bei

Herzinsuffizienz zugleich Verluste transverser und Gewinne longitudinaler T-Tubulus-Elemente auftreten – dies führte zu einem chaotischen Erscheinungsbild des T-Tubulus-Systems (64).

Der  $\text{InsP}_3\text{R}2$  nimmt eine Schlüsselrolle in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Hypertrophie-Signalwegen ein. In aktuellen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die perinukleäre  $\text{InsP}_3\text{R}2$ -Expression in den Kardiomyozyten insuffizienter Herzen (Maus und Mensch) erhöht ist (23). Mittels der experimentellen Analysen dieser Arbeit konnte im perinukleären Zytosol und an der Zellkernhülle von Kardiomyozyten TAC-operierter Herzen (WT und R4496C) eine deutliche Intensitätserhöhung des Fluoreszenzsignals gefunden werden. Dies lässt auf eine  $\text{InsP}_3\text{R}2$ -Dichteerhöhung schließen. Zusätzlich war eine Signalabnahme im Bereich der Zellmembran feststellbar.

Die CASQ2-Aktivität beeinflusst die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch Regulation des RyR2. Mutationsbedingte CASQ2-Dysfunktionen können schwerwiegende Erkrankungen der Herzmuskulatur und des Reizleitungssystems bedingen (z.B. CPVT2). Nach TAC-Intervention verminderte sich die perinukleäre und zentral-zytosolische Dichte von CASQ2 sowohl bei WT- als auch R4496C-Herzen.

Bei Herzinsuffizienz kommt es zur Funktionsminderung von SERCA2a: Die chronische Hypophosphorylierung von PLN resultiert in einer Erhöhung des PLN:SERCA2a-Verhältnisses mit konsekutiver Reduktion der SERCA2a-Aktivität (1).

Zudem ist bekannt, dass kardial dekompenzierte WT-Mäuse Expressionsminderungen von SERCA2a aufweisen (23). In den Experimenten dieser Arbeit zeigten TAC-Herzmuskelzellen (WT und R4496C) vergleichbare Veränderungen der SERCA2a-Distribution: Im perinukleären Zytosol und an der Zellkernmembran kam es unabhängig vom Genotyp zu deutlichen Ausprägungsminderungen. Zwischen WT- und R4496C-Sham konnten Unterschiede geringen Ausmaß ermittelt werden.

Das Verteilungsmuster der untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsproteine zeigt, dass bei Remodeling organisatorische Veränderungen dieser Proteine auftreten, welche hauptsächlich von dem individuellen Interventionsmechanismus bestimmt sind.

Bei Herzinsuffizienz scheint (i) das perinukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling zulasten der lokalen RyR2-Expression in verstärktem Ausmaß durch  $\text{InsP}_3\text{R}2$  mediiert zu werden, was durch (ii) die Dichteminderung von SERCA2a und CASQ2 zusätzlich aggraviert wird. Die

SERCA2a-Distribution ist durch zwei Vorgänge verändert: (i) Die verminderte Expression (65,66) und (ii) die Abnahme an Invaginationen des NR führen zur erheblichen Reduktion an SERCA-Pumpen in der perinukleären Region und an der Kernhülle. Folge dieser subzellulären Umstrukturierungen sind Alterationen der nukleären CaTs und der  $[Ca^{2+}]_{nuc}$  mit potentiell verstärkter Progression des hypertrophischen Remodelings.

### **4.3 Limitationen**

Der experimentelle Vergleich von WT-TAC- und R4496C-TAC-Herzen hat nur geringe Differenzen im Ausprägungsmuster intrazellulären Remodelings aufgezeigt: (i) Das kam sowohl in der Erforschung des perinukleären Verteilungsmusters von  $Ca^{2+}$ -Regulationsproteinen, (ii) als auch im Rahmen der Untersuchung des nukleären Remodelings zum Ausdruck.

Dies könnte dadurch begründet sein, dass sämtliche Herzmuskelzellen bereits am 7. postoperativen Tag isoliert wurden. Eventuell können R4496C-Herzen kurzfristige Belastungen (mittels TAC) in der frühen Phase der Herzinsuffizienz in ähnlichem Ausmaß kompensieren wie WT-Herzen.

Indes beobachteten Sedej et al. (2014) nach 3-wöchiger Aortenkonstriktion, dass R4496C-TAC-Kardiomyozyten deutlich schwerwiegendere myokardiale Remodeling-Prozesse durchlebten und eine erhöhte Mortalitätsrate als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister aufwiesen (18). Außerdem kommt es mit länger andauernder TAC (1 Woche vs. 7 Wochen) in WT-Kardiomyozyten zur Verstärkung des nukleären Remodelings (23).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass frühzeitiges Remodeling in größerem Ausmaß durch funktionelle Veränderungen als durch morphologische Reorganisationen bedingt ist.

Um weitere Information zu gewinnen, empfehle ich einerseits die Durchführung selbiger Experimente nach einem längeren postoperativen Zeitraum sowie die Untersuchung der kardiomyozytären Funktion und Struktur bei pharmakologischer Stabilisierung des RyR2 in R4496C-Mäusen.

### **4.4 Klinischer Ausblick**

Die Entstehung von Hypertrophie und die Progression zur Herzinsuffizienz sind durch Dysfunktionen intrazellulärer molekularer Signalwege charakterisiert. Störungen der strikt regulierten  $Ca^{2+}$ -Homöostase können zu schwerwiegenden klinischen Konsequenzen (Kontraktionsschwäche, Arrhythmien, Remodeling) führen. Eine Vielzahl an

Risikofaktoren bedingt Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling in Kardiomyozyten: Etwa die chronische arterielle Hypertonie (konzentrische Hypertrophie des Myokards durch Nachlasterrhöhung) und RyR2-Dysregulationen (Akzeleration des Remodelings, schwerwiegende Herzrhythmusstörungen [bidirektionale VT und Kammerflimmern] und Pumpschwäche mit erhöhter und vorzeitiger Mortalität) (18). Aktuelle pharmakologische Therapiekonzepte haben hauptsächlich die Symptomlinderung sowie den Erhalt der Organfunktion zum Ziel. Trotz der maßgeblichen wissenschaftlichen und therapeutischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte, kann die Progression schwerer Herzerkrankungen selten angehalten werden. Umso wichtiger ist es, dass neuartige Behandlungskonzepte bereits in der Frühphase der Herzinsuffizienz ansetzen, um das Entstehen von Sekundärschäden bei langjähriger Erkrankung verhindern oder mindern zu können. Möglicherweise könnte die translationale Modulation des zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling maladaptives kardiales Remodeling und die Progression zur Herzinsuffizienz verhindern. Tatsächlich konnten Sedej et. al (2010, 2014) beweisen, dass mutagene Dysbalancen der RyR2-Aktivität ( $\text{R4496C}^{+/-}$ ) mittels pharmakologischen Therapiekonzepten (JTV-519/K201 und Dantrolen) stabilisiert werden können – mit dem Resultat, dass das maladaptive Remodeling im Mausmodell deutlich vermindert wurde (22,54,61).

Nach ersten erfolgversprechenden Ergebnissen bleibt abzuwarten, ob sich die AAV-SERCA2a-Gentherapie in klinischen Studien beim Menschen auch langfristig als wirksam erweist (34). Die Modulation nicht-kodierender mikro-RNA (miRNA), welche durch Regulation von Genexpression, Zellwachstum, Überleben und Funktion Remodeling-Prozesse und Herzinsuffizienz mitverursachen kann, könnte in Zukunft Element neuartiger therapeutischer Möglichkeiten werden (67). Zudem bringen regenerative Therapieansätze (Zell-basiert und pharmakoregenerativ) vielversprechende Aussichten mit sich: Mittels Stammzelltherapie und Zell-Reprogrammierungen (Rückdifferenzierung zu pluripotenten Stammzellen oder Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten) könnten Zellverluste – zum Beispiel aufgrund eines Myokardinfarktes – kompensiert werden (45).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zum Forschungsfeld der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalisierungsmechanismen. Bis die therapeutische Steuerung dieser Mechanismen tatsächlich klinische Anwendung finden kann, ist noch weiterführende Forschungsarbeit vonnöten.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14(4):213–24.
2. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet.* Elsevier; 2015 Jul 26;385(9970):812–24.
3. Bauters C, Lamblin N, Mc Fadden EP, Van Belle E, Millaire A, de Groote P. Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome. *Cardiovasc Diabetol.* 2003;2:1.
4. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347(5):305–13.
5. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(1):30–41.
6. Molkenin JD, Lu J-R, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A Calcineurin Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell.* 1998;93:215–28.
7. Burchfield JS, Xie M, Hill J a. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388–400.
8. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. 2011; Available from: <http://oro.open.ac.uk/34834/>
9. Marius P, Guerra MT, Nathanson MH, Ehrlich BE, Leite MF. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 2006;39(1):65–73.
10. Uhlén P, Fritz N. Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(1):28–32.
11. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23–49.
12. Bers DM. Coupling. 2002;415(January).
13. Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J.* 2004;86(4):2121–8.
14. Andersson KB, Birkeland JAK, Finsen AV, Louch WE, Sjaastad I, Wang Y, et al. Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *Serca2* gene. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(2):180–7.

15. Van Petegem F. Ryanodine Receptors: Allosteric Ion Channel Giants. *J Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2015;427(1):31–53.
16. Escobar M, Cardenas C, Colavita K, Petrenko NB, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for perinuclear calcium microdomains in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2011;50(3):451–9.
17. Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):245–55.
18. Sedej S, Schmidt A, Denegri M, Walther S, Matovina M, Arnstein G, et al. Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(15):1569–79.
19. S. S, A. S, S. W, M. D, E. B, F.R. H, et al. Gain-of-function defect in the RyR2 promotes myocardial remodeling and heart failure in murine hearts under pressure-induced overload. *European Heart Journal.* 2011. p. 663.
20. Cerrone M, Colombi B, Santoro M, di Barletta MR, Scelsi M, Villani L, et al. Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2005;96(10):e77–82.
21. Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2011;108(7):871–83.
22. Kockskämper J, Zima A V., Roderick HL, Pieske B, Blatter L a., Bootman MD. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(2):128–47.
23. Ljubojevic S, Radulovic S, Leitinger G, Sedej S, Sacherer M, Holzer M, et al. Early remodeling of perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation.* 2014;130(3):244–55.
24. Zima A V, Blatter LA. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *J Physiol.* 2004;555(Pt 3):607–15.
25. Zima A V, Bare DJ, Mignery G a, Blatter L a. IP3-dependent nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in the mammalian heart. *J Physiol.* 2007;584(Pt 2):601–11.
26. Ljubojević S, Walther S, Asgarzoei M, Sedej S, Pieske B, Kockskämper J. In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in adult cardiomyocytes. *Biophys J.* 2011;100(10):2356–66.
27. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 2006;116(3):675–82.

28. Györke S, Györke I, Lukyanenko V, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Wiesner TF. Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by luminal calcium in cardiac muscle. *Front Biosci.* 2002;7:d1454–63.
29. Györke S, Stevens SCW, Terentyev D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol.* 2009;587(Pt 13):3091–4.
30. Postma A V, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff J-M, Da Costa A, Sebillon P, et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 2002;91(8):e21–6.
31. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2510–20.
32. Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, et al. Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1814–23.
33. Roderick HL, Higazi DR, Smyrnias I, Fearnley C, Harzheim D, Bootman MD. Calcium in the heart: when it's good, it's very very good, but when it's bad, it's horrid. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):957–61.
34. Lyon AR, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehrpour AH, Dubb SS, et al. SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2011;4(3):362–72.
35. Shannon TR, Guo T, Bers DM. Ca<sup>2+</sup> scraps local depletions of free [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca<sup>2+</sup> reserve. *Circ Res.* 2003;93(1):40–5.
36. Franzini-Armstrong C. Structure of sarcoplasmic reticulum. *Fed Proc.* 1980;39(7):2403–9.
37. Lukyanenko V, Ziman A, Lukyanenko A, Salnikov V, Lederer WJ. Functional groups of ryanodine receptors in rat ventricular cells. *J Physiol.* 2007;583(Pt 1):251–69.
38. Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ. The nucleoplasmic reticulum: Form and function. *Trends in Cell Biology.* 2011. p. 362–73.
39. Goulbourne CN, Malhas AN, Vaux DJ. The induction of a nucleoplasmic reticulum by prelamin A accumulation requires CTP:phosphocholine cytidylyltransferase- . *Journal of Cell Science.* 2011. p. 4253–66.

40. Wu X, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca<sup>2+</sup> store throughout cardiac myocyte. *Circ Res.* 2006;99(3):283–91.
41. Keminer O, Peters R. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J.* 1999;77(1):217–28.
42. Ibarra C, Vicencio JM, Varas-Godoy M, Jaimovich E, Rothermel B a., Uhlén P, et al. An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2014;75:40–8.
43. Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell.* 2000;11(5):1845–58.
44. Kockskämper J, Seidlmayer L, Walther S, Hellenkamp K, Maier LS, Pieske B. Endothelin-1 enhances nuclear Ca<sup>2+</sup> transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 2):186–95.
45. Steinhauser ML, Lee RT. Regeneration of the heart. *EMBO Mol Med.* 2011;3(12):701–12.
46. Grossman W, Paulus WJ. Myocardial stress and hypertrophy: A complex interface between biophysics and cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3701–3.
47. Harvey P a., Leinwand L a. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol.* 2011;194(3):355–65.
48. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(8):589–600.
49. Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR. Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology.* 1993;133(1):376–88.
50. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: Development redux in disease. *Genes Dev.* 2003;17(16):1937–56.
51. Zhang CL, Mckinsey T a, Chang S, Antos CL, Hill J a, Olson EN. Class II Histone Deacetylases Act as Signal- Responsive Repressors of Cardiac Hypertrophy. 2002;110:479–88.
52. Wang Y, Tandan S HJ. Calcineurin-dependent ion channel regulation in heart. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24(1):14–22.
53. Sedej S, Heinzl FR, Walther S, Dybkova N, Wakula P, Groborz J, et al. Na<sup>+</sup>-dependent SR Ca<sup>2+</sup> overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation. *Cardiovasc Res.* 2010;87(1):50–9.

54. Fernández-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, et al. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2009;104(2):201–9.
55. Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2003;285(3):1261–9.
56. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Vis Exp*. 2010;(38).
57. Mühlfeld C, Schipke J, Schmidt A, Post H, Pieske B, Sedej S. Hypoinnervation is an early event in experimental myocardial remodelling induced by pressure overload. *J Anat*. 2013;222(6):634–44.
58. Mittler T, PD Dr. Kockskämper J. Die Struktur der Kernhülle von Herzmuskelzellen. Abteilung für Kardiologie. [Graz]: Medizinische Universität Graz; 2009.
59. O’Connell TD, Ni YG, Lin K-M, Han H, Yan Z. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes for signaling studies. *AfCS Res Reports*. 2003;1.
60. Sigma-Aldrich Co. 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride - PRODUCT INFORMATION SHEET. United Kingdom Home [Internet]. 2013;3–4. Available from: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/d8417pis.Par.0001.File.tmp/d8417pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d8417pis.Par.0001.File.tmp/d8417pis.pdf)
61. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*. 1964;6(3):241–52.
62. Leenhardt A, Denjoy I, Guicheney P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2012;5(5):1044–52.
63. He JQ, Conklin MW, Foell JD, Wolff MR, Haworth RA, Coronado R, et al. Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca<sup>2+</sup> channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*. 2001;49(2):298–307.
64. Song L-S, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4305–10.
65. Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, et al. Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*. 1990;85(1):305–9.
66. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995;92(4):778–84.

67. Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2013;113(6):676–89.