

**Diplomarbeit**

**Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente in  
Autophagie-defizienten Mauskardiomyozyten**

eingereicht von

**Jan Christopher Esser**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin**

**Abteilung für Kardiologie**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Dr. Simon Sedej**

und

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Dr.scient.med. Peter Rainer**

Graz, den 29.04.2021

### *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, den 29.04.2021*

*Jan Christopher Esser eh*

## Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Simon Sedej für das Überlassen des Themas, die Beantwortung zahlreicher Fragen, die Einführung in die Forschung und seine Geduld bedanken.

Gleiches gilt auch für meinen Zweitbetreuer Peter Rainer, dem ich auch noch für die Zeit und Einführung am Ionoptix Setup danken möchte.

Außerdem bedanke ich mich beim Team der Abteilung für Kardiologie am ZMF für die Hilfe und die vielen Erklärungen. Dies gilt insbesondere Mahmoud Abdellatif, Viktoria Herbst, Natasa Djalinač, Lavinia Rech und Simon Kraller.

Ganz besonderer Dank gilt Martina und Christian Esser für ihre Hilfe und Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen.

Auch für die Unterstützung und den Beistand von Familie Kloesel, Haggemueller und Finkwitz möchte ich herzlich danken.

Zuletzt möchte ich mich bei all meinen guten Freunden bedanken, dass sie mein Leben bereichern und mir so häufig zur Seite stehen.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen.....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Glossar und Abkürzungen.....	v
Abbildungsverzeichnis .....	vi
Tabellenverzeichnis .....	vii
Zusammenfassung.....	viii
Abstract.....	ix
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Kontraktilität der Kardiomyozyten .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Elektromechanische Kopplung des Herzens.....	2
1.1.2 Kalziumsensitivität der kardialen Myofilamente.....	5
1.1.3 Regulation der Kontraktilität durch den beta-adrenergen Signalweg.....	6
<b>1.2 Autophagie in Kardiomyozyten .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Maus Modell .....	12
2.1.2 Langendorff Setup .....	12
<b>2.2 Isolation der Kardiomyozyten.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Maus-Heparinisierung.....	13
2.2.2 Isolation des Herzens .....	13
2.2.3 Herz-Kanülierung.....	14
2.2.4 Herz-Perfusion.....	14
2.2.5 Kalzium-Aufbau .....	15
2.2.6 Fura-2AM Beladung .....	16
2.2.7 IonOptix Setup.....	16
<b>2.3 Messungen am Ionoptix Setup .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Chemikalien und Lösungen .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Statistische Analyse .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>

3.1	Kalziumhomöostase und Kontraktilität in <i>Atg5</i> -defizienten Kardiomyozyten.....	23
3.2	Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente in <i>Atg5</i> <sup>-/-</sup> Kardiomyozyten .....	27
4	Diskussion .....	30
5	Literaturverzeichnis .....	32

## Glossar und Abkürzungen

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> .....	zytosolisches Kalzium
AP .....	Aktionspotential
Atg5.....	Autophagie-assoziiertes Gen 5
ATP .....	Adenosintriphosphat
β-AR.....	beta-adrenerge Rezeptoren
Ca <sup>2+</sup> .....	Kalziumionen
cAMP.....	cyclisches Adenosinmonophosphat
DHPR.....	Dihydropyridin-Rezeptor
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DT <sub>50</sub> .....	Halb-maximale Abfallzeit der Amplitude
ECC.....	Excitation-Contraction-Coupling (Elektromechanische Koppelung)
EC50 .....	hier: Fura-2AM Ratio bei 50 % Relaxation
NCX.....	Natrium-Kalzium-Austauscher
PKA .....	Proteinkinase A
PLB .....	Phospholamban
RyR2 .....	Ryanodin-Rezeptoren Typ 2
SERCA2a .....	sarko-/endoplasmatisches Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase 2a
SR .....	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tm .....	Tropomyosin
TnC .....	Troponin C
TnI .....	Troponin I
TnT.....	Troponin T
TTP .....	time to peak
WT.....	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kalziumzyklus in Kardiomyozyten .....	3
Abbildung 2: Querbrückenzyklus .....	5
Abbildung 3: Beta-adrenerger Signalweg .....	8
Abbildung 4: Entstehung eines Autophagosoms .....	9
Abbildung 5: Kanülierung der Aorta .....	14
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Langendorff Setups .....	15
Abbildung 7: Maus-Kardiomyozyten nach der Isolation .....	16
Abbildung 8: IonOptix Setup .....	17
Abbildung 9: Einstellung des Messfeldes .....	18
Abbildung 10: Messprotokoll für Kalziumtransienten und Sarkomer-Shortening in isolierten Maus-Kardiomyozyten .....	18
Abbildung 11: Auswertung der Messungen .....	19
Abbildung 12: Analyse der Kalziumtransienten in <i>Atg5<sup>+/+</sup></i> und <i>Atg5<sup>-/-</sup></i> Herzmuskelzellen .....	24
Abbildung 13: Relative Veränderung der Sarkomerlänge und der Kalziumtransienten .....	25
Abbildung 14: Verhältnis zwischen relativem Kalziumanstieg und der prozentuellen Sarkomerlängenveränderung .....	26
Abbildung 15: Repräsentative Originalaufnahmen in <i>Atg5<sup>+/+</sup></i> Kardiomyozyten .....	26
Abbildung 16: Repräsentative Originalaufnahmen in <i>Atg5<sup>-/-</sup></i> Kardiomyozyten .....	27
Abbildung 17 Das Verhältnis zwischen Sarkomerenlänge und Ca <sup>2+</sup> -Fluoreszenz	28
Abbildung 18: Verschiebung der EC50 .....	29

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Perfusionslösung .....	19
Tabelle 2: Normal-Tyrode Lösung .....	20
Tabelle 3: Kanülierungslösung .....	20
Tabelle 4: Verdauungslösung.....	20
Tabelle 5: Stopplösung 1 .....	21
Tabelle 6: Stopplösung 2 .....	21
Tabelle 7: Ca <sup>2+</sup> Verdünnungsreihen für den Ca <sup>2+</sup> -Aufbau .....	21

## Zusammenfassung

Sowohl eine intakte Kalziumhomöostase als auch Autophagie sind für die strukturelle und funktionelle Homöostase des Herzens essenziell. Ohne Autophagie können sich in Zellen beschädigte Proteine und Zellorganellen ansammeln und somit zu einer Dysfunktion und gestörter Kalziumhomöostase führen. Genetisch veränderte Mäuse mit einer herzspezifischen Inhibition der Autophagie (*Atg5<sup>-/-</sup>*) entwickeln eine linksventrikuläre Hypertrophie, welche mit einer dilatativen Kardiomyopathie mit systolischer Dysfunktion einhergeht und zu frühzeitigem Tod führt. Obwohl *Atg5<sup>-/-</sup>* Mäuse im jungen Alter (bis circa 15 Wochen) phänotypisch scheinbar gesund sind, zeigen sie, wenn sie vermehrt akutem beta-adrenergen Stress ausgesetzt sind, eine reduzierte Belastbarkeit und Kontraktilität des Herzens. Da die Kontraktionskraft des Herzens unter anderem stark von der Kalziumsensitivität der kardialen Myofilamente abhängt, wurde in dieser Arbeit getestet, ob sich die reduzierte Belastbarkeit bei akuter beta-adrenerger Stimulation in Autophagie-defizienten Mäusen durch eine Verminderung der Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente erklären lässt. Dafür wurden linksventrikuläre Kardiomyozyten von *Atg5*-defizienten Mäusen und einer Kontrollgruppe (Wildtyp) durch eine Enzym-basierte Isolation am Langendorff Setup gewonnen und mit dem ratiometrischen, kalziumsensitiven Farbstoff Fura-2AM beladen. Daraufhin wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie sowohl die Kalziumtransienten im Zytosol als auch, in Kombination mit Video-Edge-Detektion, die Sarkomerlänge gemessen. Die Zellen wurden unter basalen Bedingungen und nach Gabe des beta-Mimetikums Isoprenalin gemessen und daraufhin analysiert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz die Amplituden und die Kinetik der Kalziumtransienten und der Sarkomerlängen bei *Atg5<sup>-/-</sup>* Mäusen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Isoprenalingabe vergleichbar mit *Atg5<sup>+/+</sup>* Mäusen waren. Die Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente in der *Atg5<sup>-/-</sup>* Gruppe war im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass unter anderem Faktoren wie der Frank-Starling-Mechanismus in diesen *in vitro* Versuchen nicht mit einbezogen wurden und somit nicht in ausreichendem Maße die *in vivo* Bedingungen nachgestellt werden konnten.

## Abstract

Calcium homeostasis, as well as autophagy, are essential for the structural and functional homeostasis of the heart. In the absence of cardiac autophagy, damaged and/or dysfunctional proteins and cellular organelles can progressively accumulate, leading to cardiac impairment. Transgenic mice deprived of cardiac-specific autophagy early in cardiogenesis (*Atg5<sup>-/-</sup>*) are known to develop cardiac hypertrophy, leading to left ventricular dilatation and contractile dysfunction, resulting in premature death. Although *Atg5<sup>-/-</sup>* mice appear to be phenotypically normal at young age (up to 15 weeks), they show reduced contractility and resilience in response to beta-adrenergic activation. The force of contraction in the heart also strongly depends on the calcium-sensitivity of the myofilaments.

In this thesis, we opted to elucidate whether reduced workload is related to a reduced myofilament calcium-sensitivity in autophagy-deficient mice subjected to acute beta-adrenergic stress. To this end, left ventricular cardiomyocytes were isolated from *Atg5*-deficient mice with an enzyme-based isolation using Langendorff setup, and then loaded with the ratiometric calcium-sensitive dye, Fura-2AM. Global calcium transients in the cytosol were measured with fluorescent microscopy and sarcomere lengthening/shortening was simultaneously measured with a video-edge system. Cells were stimulated at 0.5 Hz under baseline conditions as well as after the administration of the beta-adrenergic agonist, isoprenaline, and subsequently analyzed.

We found that both *Atg5<sup>-/-</sup>* and *Atg5<sup>+/+</sup>* cardiomyocytes had similar amplitudes and kinetics of contraction as well as calcium transients under baseline conditions and in response to isoprenaline. Indirect measurement of myofilament calcium sensitivity revealed no changes between *Atg5<sup>-/-</sup>* and *Atg5<sup>+/+</sup>* cardiomyocytes. One possible explanation for this finding is that under *in vitro* conditions we could not take into account, amongst others, the Frank-Starling mechanism, which hindered to fully mimic *in vivo* effects.

# 1 Einleitung

Herzinsuffizienz ist eine der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität in Industrienationen (Oka et al., 2012). Besonders im Alter spielen kardiovaskuläre Erkrankungen eine große Rolle und zählen zu den Haupttodesursachen (Roth et al., 2017) – ein Umstand, welcher in einer immer älter werdenden Gesellschaft zu einem immer größeren Problem wird. Charakteristisch für die Herzinsuffizienz ist, dass es zu Umbauprozessen, dem sogenannten kardialen Remodelling kommt, welches morphologisch betrachtet zunächst oft mit einer Hypertrophie beginnt (Tham et al., 2015).

Das Remodelling wird durch Signalwege reguliert, bei denen Kalzium eine zentrale Rolle einnimmt, weshalb eine Störung der Kalziumhomöostase zur Entstehung der Herzinsuffizienz beiträgt (Berridge et al., 2003; Ljubojevic et al., 2014; Sedej et al., 2014). Es ist deshalb wichtig frühe Störungen des Kalziumhaushaltes auf zellulärer Ebene zu erforschen, um somit zum Verständnis der pathologischen Prozesse beizutragen und mögliche Therapieansätze zu schaffen.

Neben dem Kalziumhaushalt stellt auch die Autophagie einen essenziellen Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar. Im alternden Herzen kommt es typischerweise zur Zunahme von Veränderungen wie Hypertrophie und Fibrosierung sowie zur Ansammlung von geschädigten Proteinen und Mitochondrien. Wie später genauer erläutert, sind diese Veränderungen auf die im Alter abnehmende Aktivität der Autophagie zurückzuführen (Shirakabe et al., 2016). Es bleibt jedoch unklar, ob und inwiefern eine reduzierte Autophagie die Kalziumhomöostase beeinflusst. Diese Grundlagenforschungsarbeit liefert einen Beitrag, um diesen Zusammenhang aufzuklären.

## 1.1 Kontraktilität der Kardiomyozyten

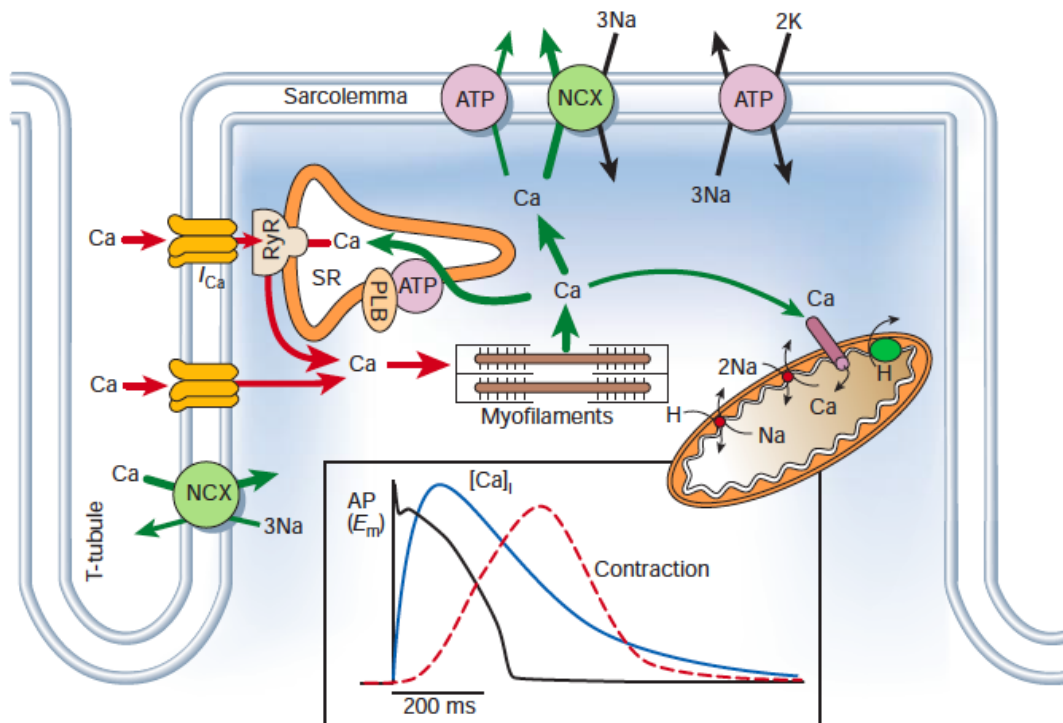
### 1.1.1 Elektromechanische Kopplung des Herzens

Ein Herzschlag kommt durch das gemeinsame Kontrahieren und Relaxieren aller Kardiomyozyten zustande. Diese bilden ein funktionelles System beziehungsweise Synzytium. Damit es zu einem Herzschlag kommt, müssen alle Kardiomyozyten elektrisch erregt werden. Dies geschieht durch ein Aktionspotenzial (AP), welches auf zellulärer Ebene zu einer Depolarisation der Zellmembran und letztlich zu einer anschließenden Kontraktion führt (Bers, 2001).

Im Prozess der elektromechanischen Kopplung (Englisch: Excitation-Contraction-Coupling; ECC) des Herzens spielen Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als sekundäre Messenger beziehungsweise Sekundärsignale eine entscheidende Rolle (Bers, 2002). Bei der Depolarisation am Sarkolemm werden die, sich in den Transversal-Tubuli befindlichen spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle, auch bekannt als Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR), aktiviert. Dabei kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in die Zelle. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ist jedoch nicht ausreichend um die Myofilamente zu aktivieren, sondern löst einen weiteren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) aus. Diesen Vorgang bezeichnet man als  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR) (Fabiato & Fabiato, 1977). Hierbei werden die Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2) des SR durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert, wodurch es zu einer Erhöhung des zytosolischen Kalziums  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von  $\approx 0,1\mu\text{M}$  in der Diastole zu  $\approx 1\mu\text{M}$  in der Systole kommt (Bers & Guo, 2005). Dadurch kann nun genug  $\text{Ca}^{2+}$  an das Troponin C (TnC) der Myofilamente binden, wodurch diese aktiviert werden.

Damit wieder eine Relaxation stattfinden kann, muss es in der Diastole wieder zu einer genauso großen Abnahme des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  kommen, wie zuvor freigesetzt wurde. Das geschieht auf vier Wegen: Der überwiegende Großteil wird von der sarko-/endoplasmatisches Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2a (SERCA2a) zurück ins SR befördert. Aus der Zelle gelangt das  $\text{Ca}^{2+}$  über den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) und zu einem geringen Teil über die Plasmamembran durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, während der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter ebenfalls noch einen kleinen Teil aus dem Zytosol entfernt (Bassani et al., 1992; Bers, 2002). Die Aktivität der

einzelnen Transporter unterscheidet sich unter verschiedenen Spezies. So werden bei Mäusen 90-95% über SERCA2a und 5-8% über den NCX entfernt, während bei menschlichen Kardiomyozyten ca. 70% über SERCA2a und 25-28% über den NCX aus dem Zytosol entfernt werden (Bers, 2002, 2008). Um die Kalziumhomöostase aufrechtzuerhalten ist es wichtig, dass während eines Kontraktionszyklus genauso viel  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmt (Systole), wie wieder hinausströmt (Diastole), da die Herzmuskelzelle auf Dauer sonst entweder  $\text{Ca}^{2+}$  verlieren oder von  $\text{Ca}^{2+}$  überladen werden würde und dies letztlich zu einer Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase führen würde (Bers, 2002).

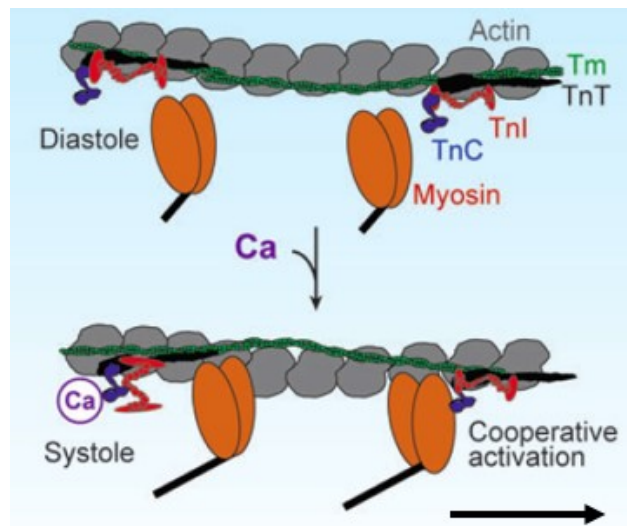


**Abbildung 1: Kalziumzyklus in Kardiomyozyten**

Nach Ankunft eines Aktionspotentials strömt  $\text{Ca}^{2+}$  über L-Typ-Kalziumkanäle in die Zelle hinein und aktiviert die Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2), wodurch es zu weiterem Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt (SR) und aktiviert damit die Myofilamente. Die roten Pfeile zeigen intrazelluläre Prozesse in der Systole.  $\text{Ca}^{2+}$  wird aus dem Zytosol wieder durch die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase2a in das SR aufgenommen und durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, aus der Zelle entfernt, beziehungsweise zu einem kleinen Teil über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter aufgenommen. Die grünen Pfeile zeigen die intrazellulären Prozesse in der Diastole. (Abbildung aus Bers 2002)

Zur Umwandlung chemischer Energie in Form von ATP in mechanische Energie kommt es in den Sarkomeren, den kleinsten kontraktile Einheiten eines Muskels (Bers, 2001). Sarkomere bestehen aus Myofilamenten, welche sich wiederum aus Aktinfilamenten (dünn) und Myosinfilamenten (dick) zusammensetzen, an denen mehrere regulatorische Proteine anheften (Ali et al., 2020; Bers, 2001). Die Kraftübertragung geschieht nach dem Prinzip der Gleitfilamenttheorie, welche die Abläufe bei der Kontraktion von Muskelfasern beschreibt und auf den Entdeckungen von zwei Forschungsgruppen aus dem Jahr 1954 basiert (Huxley & Niedergerke, 1954; Huxley & Hanson, 1954).

Vereinfacht beschrieben findet die Kraftübertragung und damit ein sogenannter Querbrückenzyklus folgendermaßen statt: Myosinfilamente besitzen viele Myosinschwänze, an deren Ende jeweils zwei Myosinköpfe sitzen. Damit es zu einer Kontraktion kommt (unter Verbrauch von ATP), müssen die Myosinköpfe an die Aktinfilamente andocken. Daraufhin drehen sie sich und es kommt zu einer Kraftübertragung, wobei die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbei gleiten. Normalerweise wird das Andocken durch einen Troponinkomplex verhindert, welcher dem Tropomyosin (Tm) anliegt, welches wiederum an den Aktinfilamenten anliegt. Er besteht aus drei Untereinheiten: Troponin T (TnT), TnC und Troponin I (TnI). Bindet nun  $\text{Ca}^{2+}$  an das TnC, kommt es zu Konformationsänderungen des Komplexes, woraufhin die Myosinköpfe an die Aktinfilamente andocken können. Damit es nun wieder zu einer Kraftübertragung kommen kann, müssen sich die Myosinköpfe wieder vom Aktin lösen und der Zyklus beginnt von vorne (Bers, 2001; Stevens A., 1997).



**Abbildung 2: Querbrückenzyklus**

In der Diastole verhindert der Troponinkomplex, bestehend aus Tropomyosin (Tm), Troponin T (TnT), Troponin I (TnI) und Troponin C (TnC), ein Andocken der Myosinköpfe an das Aktin. In der Systole bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an das TnC und es kommt zu einer Konformationsänderung des Troponinkomplexes, sodass die Myosinköpfe an das Aktin andocken können und es zu einer Bewegungsrichtung des Myosins in die Richtung des schwarzen Pfeils kommt. (Abbildung modifiziert aus Bers 2008)

### 1.1.2 Kalziumsensitivität der kardialen Myofilamente

Das Ausmaß der Kraftentwicklung während eines Kontraktionszyklus hängt zum einen davon ab, wie hoch und lange die Kalziumtransienten sind und zum anderen davon, wie viel Kalzium überhaupt benötigt wird, um eine definierte Kraft zu generieren (Bers, 2002). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die Myofilamente wird mit der Kalzium-Empfindlichkeit beschrieben. Diese Eigenschaft des Muskels ist dynamisch und kann von verschiedenen Faktoren unter physiologischen oder pathophysiologischen Umständen beeinflusst werden. So ist die Kalziumsensitivität unter anderem von der Temperatur, der Sarkomerlänge und dem pH-Wert abhängig (Blanchard et al., 1984; Harrison & Bers, 1989; Hibberd & Jewell, 1982). Beispielsweise führt auch eine Erniedrigung des pH-Werts (Azidose), welcher pathologischer Weise bei einer Hypoxie beziehungsweise Ischämie sinkt (Jacobus et al., 1982), zu einer Abnahme der Kalziumsensitivität und der maximal möglichen Kraftentwicklung.

Auch Phosphate, die vermehrt bei ATP-Verbrauch anfallen, oder auch freies Magnesium führen zu einer Desensibilisierung der Myofilamente (Best et al., 1977; Kentish, 1986). Dagegen erhöhen andere Substanzen wie z.B. Imidazole oder

einige Kalzium-Sensitizer wie Levosimendan die Kalzium-Empfindlichkeit (Edes et al., 1995; Lamont & Miller, 1992). Die Kalzium-Empfindlichkeit der kardialen Myofilamente kann auch aktiv über eine Phosphorylierung des TnI beeinflusst werden (Fentzke et al., 1999). Die Phosphorylierung dient der Steuerung des homöostatischen und der physiologisch adaptiven Kontrolle des Herzminutenvolumens. Eine der TnI Phosphorylierungen, die sowohl physiologisch als auch pathologisch stattfindet, ist die durch beta-adrenerge Rezeptoren ( $\beta$ -AR) vermittelte Proteinkinase A (PKA) Phosphorylierung an den Serinen 23 und 24. Sie trägt erheblich zur Kalziumregulierung der Myofilamente bei und führt zu einer verringerten kalziumabhängigen Kraftproduktion und einer beschleunigten Relaxation der Myofilamente (Solaro et al., 2013). Durch diese Phosphorylierung senkt auch der beta-adrenerge Agonist Isoprenalin die Kalziumsensitivität der kardialen Myofilamente (Bers, 2001).

Es gibt starke Hinweise darauf, dass eine Veränderung der Kalziumsensitivität zu Störungen der intrazellulären Kalziumhomöostase und der Aktivität der Ionenkanäle in Kardiomyozyten führt (Zhao et al., 2016). Dies spiegelt sich in veränderter Kontraktilität und Relaxation in erkrankten Herzen wider und äußert sich unter anderem in Arrhythmien (Schober et al., 2012). Es ist daher sehr wichtig, etwaige Pathomechanismen der Kalziumsensitivität zu evaluieren (Zhao et al., 2016).

Meistens werden Messungen, die sich mit der Kalziumsensitivität beschäftigen, an präparierten Kardiomyozyten durchgeführt. Dies hat jedoch den Nachteil, dass sich die physiologischen Eigenschaften der Zelle verändern können (Bers, 2001). In dieser Arbeit wurde eine Messmethode an intakten Kardiomyozyten verwendet, die die intrazellulären Kalziumtransienten und die Dynamiken der Myofilamente gleichzeitig mit einbezogen haben, ohne den intrazellulären Raum, die Organellen und das Zytosol wesentlich zu verändern.

### **1.1.3 Regulation der Kontraktilität durch den beta-adrenergen Signalweg**

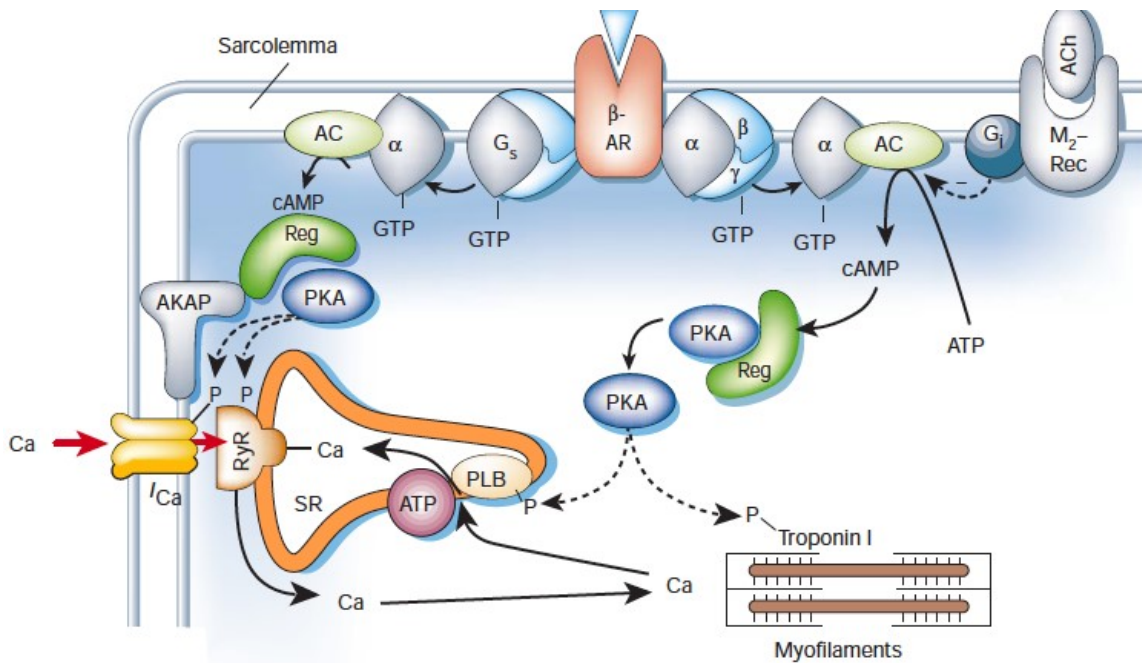
Kardiomyozyten reagieren auf elektrische, mechanische sowie auf hormonelle Einflüsse (Bers, 2002). Dies spiegelt sich in einer veränderten Kontraktionskraft und -Frequenz der Zellen wider und beeinflusst damit das Herzminutenvolumen.

Während eine Erhöhung der Vorlast, und damit der Dehnung der Kardiomyozyten, (Frank-Starling-Mechanismus) und eine Erhöhung der Frequenz das Schlagvolumen steigern (Bowditch Effekt), führt auch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems über eine Aktivierung der  $\beta$ -AR zu einer Steigerung der Inotropie, Lusitropie und Chronotropie des Herzens (Bers, 2001).

Das Binden von Isoprenalin an den  $\beta$ -AR stimuliert die Adenylylcyclase, um cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu produzieren, welches wiederum die PKA aktiviert. PKA hat die Eigenschaft mehrere Proteine zu phosphorylieren, welche in den ECC eingebunden sind, wie beispielsweise das SERCA2a Regulationsprotein Phospholamban (PLB), DHPR, RyR2, TnI und das Myosin-bindende Protein C. Die Phosphorylierung von PLB und TnI hat zur Folge, dass die Zelle schneller relaxiert (positive Lusitropie), was unter anderem durch eine schnellere  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR durch SERCA2a und schnellerer Dissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$  von den Myofilamenten erreicht wird, wobei der Phosphorylierung von PLB die dominantere Rolle zukommt (Li et al., 2000). Außerdem führt die Phosphorylierung von DHPR und RyR2 zu schnelleren und höheren Kalziumtransienten, was die Kontraktionskraft erhöht (positive Inotropie) (Bers, 2002).

Es sind drei Subtypen der  $\beta$ -AR bekannt,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und der  $\beta_3$ -AR (Wachter & Gilbert, 2012). Während der  $\beta_3$ -AR für das Herz eine geringe Bedeutung hat und hauptsächlich mit metabolischer Regulation in Verbindung gebracht werden kann, sind im gesunden menschlichen Herzen vor allem  $\beta_1$ -AR (circa 77%) und  $\beta_2$ -AR (circa 23%) vorzufinden (Bristow et al., 1986; Lands et al., 1967; Wachter & Gilbert, 2012). Die Aktivierung von  $\beta_1$ -AR am Herzen führt über die oben beschriebenen Mechanismen zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens. Außerdem führt die Aktivierung der  $\beta_1$ -AR in den Nieren zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und somit zu einer Erhöhung des Blutdrucks.  $\beta_2$ -AR finden sich vor allem in den Blutgefäßen und der Bronchialmuskulatur, weshalb eine Aktivierung einen vaso- und bronchodilatatorischen Effekt hat (Griffin et al., 2004). Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, senkt die Aktivierung des beta-adrenergen Signalwegs durch Isoprenalin die Kalziumsensitivität der Myofilamente. Jedoch gleicht die Erhöhung der Kalziumtransienten dies mehr als aus und führt so insgesamt zu einer Steigerung der Inotropie. Die komplexen Vorgänge des

dynamischen Zusammenspiels aus Myofilamenteigenschaften und Kalziumtransienten sind essenziell und sogar überlebenswichtig, um den erhöhten Bedarf der Organe (z.B. unter Stress, sog. „fight or flight response“) zu decken (Bers, 2001).

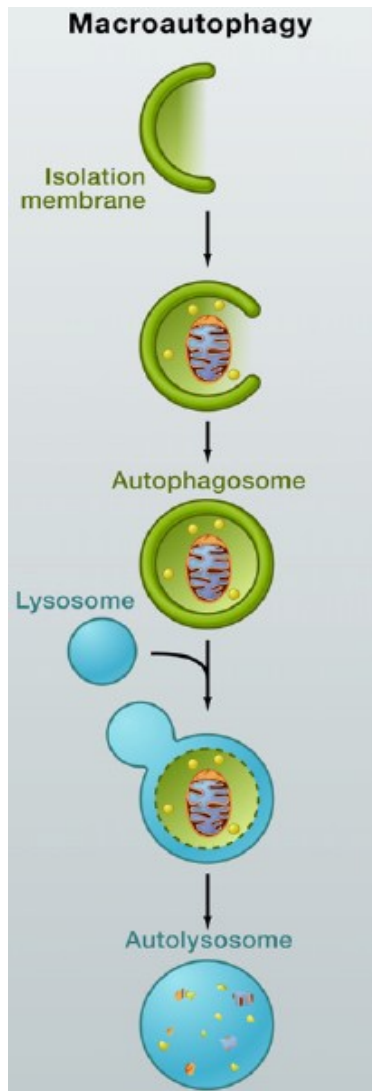


### Abbildung 3: Beta-adrenerger Signalweg

Bindung von Isoprenalin (blaues Dreieck) an beta-adrenerge Rezeptoren ( $\beta$ -AR) führt über die Aktivierung von GTP-bindendem Protein und Adenylylcyclase (AC) zu einer Erhöhung der cAMP Konzentration und damit zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). PKA phosphoryliert L-Typ Kalziumkanäle, kardiale Ryanodinrezeptoren (RyR2), Phospholamban (PLB) und Troponin I. (Abbildung aus Bers 2002)

## 1.2 Autophagie in Kardiomyozyten

Autophagie (aus dem Griechischen *auto* für „sich selbst“ und *-phagie* für „essen/verzehren“) ist ein Degradationsmechanismus von intrazellulären Strukturen, wie z.B. geschädigten, langlebigen und fehlgefalteten Proteinen sowie toxischen Zellorganellen, die zum Abbau und zur Wiederverwertbarkeit (Recycling) gedacht sind. Außerdem dient Autophagie als Energielieferant bei Nährstoffmangel.



So können die abgebauten Proteine zur Proteinneusynthese, Energiebereitstellung und Glukoneogenese genutzt werden (Mizushima & Komatsu, 2011). Autophagie kann sehr spezifisch sein und nur einzelne Zellorganellen betreffen. So wird zum Beispiel der Prozess der Autophagie von Mitochondrien als Mitophagie bezeichnet (Parzych & Klionsky, 2014). Autophagie ist essenziell für die Qualitätskontrolle von Proteinen und spielt daher eine wichtige Rolle um die Homöostase einer Zelle aufrechtzuhalten. (Nishida et al., 2009). Man kann den Prozess somit auch als zelluläre Recyclingfabrik bezeichnen (Glick et al., 2010). Stimuliert wird Autophagie unter anderem durch Kalorienrestriktion und körperliche Aktivität, aber auch durch kalorienrestriktionsnachahmende Substanzen wie Spermidin oder Rapamycin (Abdellatif et al., 2018). Dagegen wird Autophagie unter anderem durch das Protein mTOR aber auch durch Medikamente wie z.B. Chloroquin inhibiert (Towers & Thorburn, 2016).

**Abbildung 4: Entstehung eines Autophagosoms**

Heranwachsen einer Isolationmembran mit Reifung und Umschließen abzubauenen Zellbestandteile. Am Ende Verschmelzung des Autophagosomes mit dem Lysosom zum Autolysosom und Degradation der Zellkomponenten. (Abbildung aus Mizushima & Komatsu 2011)

Es sind drei Hauptformen von Autophagie bekannt: **Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie**. Letzere ist der Hauptmechanismus für Autophagie, weswegen sich im folgenden Autophagie immer auf Makroautophagie bezieht (Mizushima et al., 2002).

Den Prozess der Autophagie kann man in fünf Schritte unterteilen, an deren Ende immer die Fusion eines Autophagosomes mit dem Lysosom steht. Zunächst entsteht eine Isolationsmembran (**Initiierung**), welche man als Phagophore bezeichnet. Diese reift dann unter dem Einfluss einiger Proteinkomplexe zu denen auch *Atg5* (Autophagie-assoziiertes Gen 5) gehört heran (**Maturation**) und wird größer (**Elongation**), bis sie die abzubauenen Zellbestandteile komplett umschlossen hat, was man dann als Autophagosom bezeichnet (Mizushima & Komatsu, 2011).

In die Membran des gereiften Autophagosoms ist ein Protein namens microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II) eingebaut, welches häufig als Marker verwendet wird, um die Qualität der Autophagie zu kontrollieren (Mizushima et al., 2002). Zuletzt verschmilzt das Autophagosom mit dem Lysosom zu einem sogenannte Autolysosom (**Fusion**) und die Zerlegung (**Degradierung**) der eingeschlossenen Zellkomponenten beginnt.

Schädigungen am Herzen sind besonders gravierend, da der Hauptteil der Kardiomyozyten schon terminal differenziert ist und deshalb nur noch eingeschränkt proliferiert (Abdellatif et al., 2018). Tatsächlich werden weniger als 50% der Kardiomyozyten während eines durchschnittlichen Lebens ausgetauscht (Bergmann et al., 2009; Bergmann et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Autophagie in Mäuseherzen zu Herzinsuffizienz, linksventrikulärer Hypertrophie und Dysfunktion führt (Nakai et al., 2007). Dies sind Krankheiten, die mit höherem Alter vergesellschaftet sind und tatsächlich nimmt auch die Aktivität der Autophagie in fast allen Zellen und Geweben mit dem Alter ab (Cuervo, 2008). Obwohl sich auf ultrastruktureller Ebene schon Störungen der Sarkomerenstruktur und Veränderungen der Mitochondrien bemerkbar machten, zeigten spezifisch *Atg5*-defiziente Mäuseherzen bis zu einem Alter von beinahe vier Monaten keine Unterschiede zur Kontrollgruppe in der Kammergröße und Kontraktilität. Dieser Umstand änderte sich jedoch ab einem Alter von ungefähr sechs Monaten signifikant. Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen *Atg5*-Defizienz sind also bis zu einem Alter von drei Monaten unter basal Bedingungen gesund, denn

Kompensationsmechanismen wie die Chaperon-vermittelte Autophagie tragen hier dazu bei, dass die Entwicklung von Kardiomyopathien hinausgezögert werden (Taneike et al., 2010). Sind Mäuse mit einer Autophagiedefizienz jedoch vermehrtem Stress ausgesetzt zum Beispiel durch Drucküberlastung nach einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) oder durch beta-adrenergen induzierten Stress, führte dies bei den Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe frühzeitig zu linksventrikulärer Dilatation, kontraktiler Dysfunktion und Tod. Dies zeigt, dass Autophagie eine protektive Rolle unter Stress einnimmt und unter anderem den erhöhten Energieverbrauch während des kardialen Remodellings kompensieren könnte (Nakai et al., 2007).

Auch eine gestörte Kalziumhomöostase führt vermehrt zu kardialem Remodelling (Sedej et al., 2014). Kalzium hat auf viele Prozesse von Kardiomyozyten Einfluss, wie der Zellzykluskontrolle, dem Zellwachstum, der Apoptose und auch der Autophagie (Shaikh et al., 2016). Neuere Studien konnten zeigen, dass auch Autophagie von einer Vielzahl von Mechanismen durch intrazelluläres Kalzium reguliert wird (Shirakabe et al., 2016). Jedoch ist es noch unklar, ob Kalzium Autophagie induziert oder inhibiert. Studien kommen hier zu unterschiedlichen Ergebnissen bei den Auswirkungen von Störungen der Kalziumhomöostase auf die Autophagie (Bround et al., 2013; Zou et al., 2011). Es werden weitere Studien benötigt, um die Bedeutung der Autophagie in Kardiomyozyten zu beleuchten und daraus einen therapeutischen Nutzen zu ziehen.

### **1.3 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit**

Wie oben beschrieben spielt die Autophagie eine wichtige Rolle für die strukturelle und funktionelle Homöostase des Herzens. Unsere *in vitro* Experimente deuten darauf hin, dass Autophagie die globale  $Ca^{2+}$  Homöostase nicht wesentlich verändert. Es zeigte sich jedoch überraschenderweise in unseren *in vivo* Vorversuchen, dass der Verlust der Autophagie die Kontraktilität, die kardiale Reserve sowie das Herzzeitvolumen unter akutem beta-adrenergen Stress beeinträchtigt. Um dieses unerwartete Ergebnis zu erklären, wird in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob der Verlust von Autophagie in isolierten Maus-Kardiomyozyten mit einer verringerten Kalzium-Empfindlichkeit verbunden ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Maus Modell

Für diese Versuchsreihe wurden transgene *Atg5<sup>flox/flox</sup>-MLC2a-Cre<sup>+</sup>* Mäuse verwendet. Die Cre Rekombinase wird hier unter der Kontrolle von myosin light chain 2a (*MLC2a*) exprimiert. Während der Kardiogenese wird in diesen Mäusen das *Atg5* Gen entfernt (Nakai et al., 2007). Diese Tiere haben dann eine Defizienz der basalen Autophagie, die nur in den Kardiomyozyten auftritt. ATG5 ist ein Protein, welches für die Entstehung des Autophagosoms mit dem Lysosom benötigt wird und somit für die Autophagie eine essenzielle Rolle spielt (Kuma et al., 2017). Wird dieses Protein nicht synthetisiert oder ist es nicht funktionsfähig, findet in diesen Zellen keine Autophagie statt. Wurfgeschwister, beziehungsweise im Folgenden Wildtyp (WT) genannt, die die Cre Rekombinase nicht exprimieren (*Atg5<sup>flox/flox</sup>-MLC2a-Cre<sup>-</sup>*), dienen als Kontrolle. Die Mäuse wurden im Alter von 12 bis 15 Wochen für die Versuche genommen, da sich zu diesem Zeitpunkt unter Basalbedingungen noch keine echokardiographischen Veränderungen im Vergleich zum WT gezeigt haben (Eisenberg et al., 2016).

#### 2.1.2 Langendorff Setup

Das Langendorff System ist seit der Erfindung durch Oscar Langendorff im Jahr 1895 ein in der Pharmakologie, Pathologie und Physiologie sehr vielseitig einsetzbares Gerät und ist bis heute ein unverzichtbares Werkzeug in der kardiovaskulären Forschung (Liao et al., 2012). Um die Kardiomyozyten zu isolieren, wird das Herz der Versuchstiere an das Langendorff Setup angeschlossen und mit einer enzymatischen Lösung retrograd über die Aorta perfundiert (Abbildung 5). In Abbildung 6 wird das Setup mit dem Versuchsaufbau näher beschrieben. Zur Vermeidung etwaiger Kontaminationen wurde die Langendorff Apparatur einmal

wöchentlich mit 70% Ethanol und an jedem Tag der Isolation mit Perfusionslösung (siehe Tabelle 1) gespült.

## **2.2 Isolation der Kardiomyozyten**

Die Isolation der Kardiomyozyten gliedert sich grob in folgende Teilschritte: Maus-Heparinisierung, Herzentnahme, Kanülierung, Perfusion und Dissoziation und zuletzt den Kalzium-Aufbau.

Bereits am Vorabend der Isolation wurden zur Vorbereitung Objektträger mit Laminin beschichtet. Am Tag der Isolation wurden zunächst alle für die Isolation benötigten Lösungen hergestellt. Dies erfolgte nach den Tabellen in Kapitel 2.4 Chemikalien und Lösungen.

### **2.2.1 Maus-Heparinisierung**

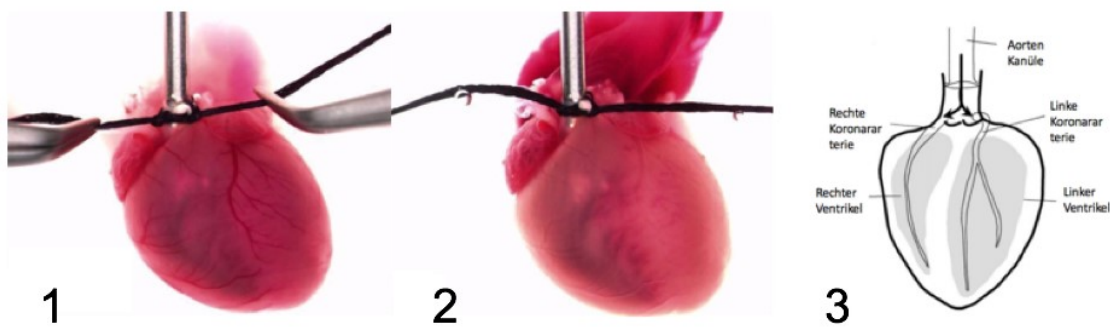
Die Mäuse wurden in einer Induktionsbox mit 5% Isofluran (Forane®, Baxter, USA) narkotisiert und anschließend wurde ihnen 50 I.E. Heparin intraperitoneal injiziert. Nach 20 Minuten wurden die Mäuse noch einmal narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation (Genickbruch) euthanisiert, bevor das Herz entnommen wurde.

### **2.2.2 Isolation des Herzens**

Jedes Tier wurde auf den Rücken gedreht und an allen vier Extremitäten fixiert. Nach Eröffnung des Thorax und Freilegung des Herzens wurden die Gefäße an der Herzbasis mit einer Pinzette umgriffen und diese dann unmittelbar unter der Pinzette durchtrennt, um eine passende Länge des Aortenstumpfes vor der Kanülierung zu bekommen. Es ist wichtig, hier genau zu arbeiten, da ein zu kurzer Aortenstumpf die Kanülierung unmöglich macht und ein zu langer Stumpf die Kanülierung erheblich erschwert. Daraufhin wurde das Herz in die zuvor auf Eis gestellte Kanülierungslösung (siehe Tabelle 3) gegeben.

### 2.2.3 Herz-Kanülierung

Das Herz wurde aus der Kanülierungslösung entnommen und in eine auf Eis gestellte, mit Perfusionslösung gefüllte Petrischale, transferiert. Unter dem Stereomikroskop (Wild Heerbrugg M5A, Schweiz, Vergrößerung: 12x) wurde zunächst der Aortenstumpf ausfindig gemacht. Der Stumpf wurde daraufhin mit zwei feinen Pinzetten über eine Kanüle gestülpt, welche an einer mit Perfusionslösung gefüllten Spritze steckt, und dann soweit auf die Kanüle gezogen, dass sie sich vor der Aortenklappe und der Abzweigung der Koronarien befand. Der Stumpf wurde dann mit dem vorher über die Kanüle gezogenen Faden (Stärke 5-0, Johnson & Johnson, USA) mit einem doppelten Knoten festgebunden. Danach wurde das Herz vorsichtig gespült, um das restliche Blut aus den Koronarien zu entfernen



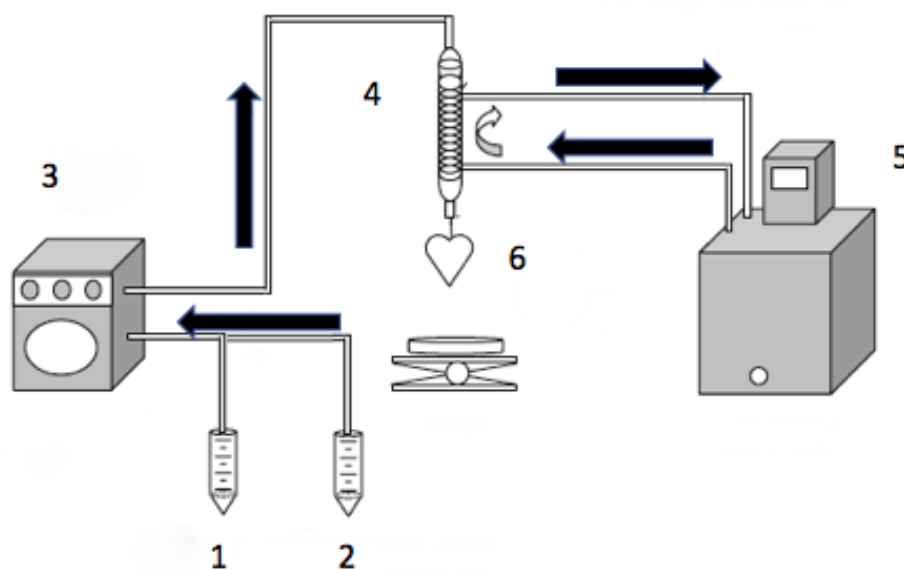
**Abbildung 5: Kanülierung der Aorta**

(1) Befestigen des Knotens an der Kanüle, (2) Ausspülen des restlichen Blutes aus dem Herzen (3) Schematische Darstellung der Kanülierung. (Abbildung modifiziert aus Dhein 2005)

### 2.2.4 Herz-Perfusion

Die Kanüle wurde nun mit dem Herzen an das Langendorff Setup befestigt, die Pumpe wurde eingeschaltet (Geschwindigkeitsrate: 3 ml/min) und die Herz-Perfusion gestartet. Der Trichter in dem das Herz hing, wurde mit Alufolie abgedeckt, um eine konstante Temperatur von 37°C zu gewährleisten. Vier Minuten nach der Perfusion mit einer Null  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösung wurden Trypsin (0,056 mg/ml, GIBCO Trypsin 2.5%, Thermo Fisher Scientific, USA) und Liberase (0,075 mg/ml, Liberase TM Research Grade, Roche, Schweiz) zur Verdauungslösung (siehe Tabelle 4) gegeben und das Herz wurde für weitere sieben Minuten

perfundiert, um die Verdauung von extrazellulärer Matrix und die Zelltrennung zu ermöglichen. Dann wurde die Perfusion gestoppt, das Herz unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten und die Ventrikel in die Stopplösung (siehe Tabelle 5) gegeben. Beide Ventrikel wurden in kleine Stücke geschnitten und danach wurden die verdauten Herzgewebestücke mit Pasteurpipetten unterschiedlicher Öffnungsgrößen mechanisch dissoziiert. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Filtermaschenwerk mit 250 µm Maschengröße in ein 50 ml Falcontube transferiert.

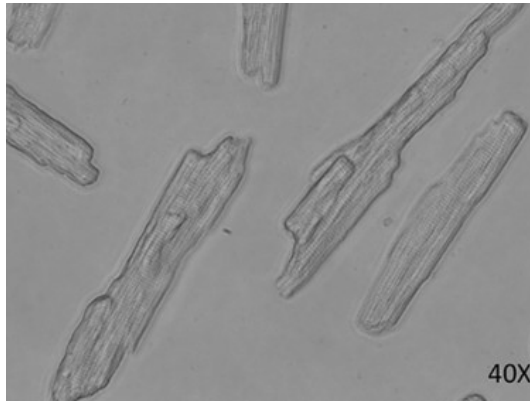


**Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Langendorff Setups**

Perfusionslösung (1) und Verdauungslösung (2) werden mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (3) zur Herz-Kanüle gepumpt, an der das Herz hängt (6). Die Wärmepumpe (5) umschließt das gesamte System inklusive Luftfänger (4) und hält dieses auf einer Temperatur von 37°C, um eine optimale Aktivität der Verdauungsenzyme zu gewährleisten. (Modifiziert aus O'Connell T. 2002)

### 2.2.5 Kalzium-Aufbau

Nachdem sich das Zellpellet gebildet hatte, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in 10-minütigen Abständen wurden die Lösungen mit aufsteigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 0,125 mM; 0,25 mM und 0,5 mM; siehe Tabelle 7) schrittweise ausgewechselt. Anschließend wurde das Zellpellet in der Normal-Tyrode-Lösung (siehe Tabelle 2) bis zum Experiment am Mikroskop aufbewahrt. Für die Messungen wurden nur quergestreifte Zellen, die nicht spontan kontrahierten, verwendet.



**Abbildung 7: Maus-Kardiomyozyten nach der Isolation**

40-fache Vergrößerung gesunder stabförmige Kardiomyozyten mit einem Längen-Seiten Verhältnis von mindestens 3:1. Es lässt sich auch eine regelrechte Anordnung der Sarkomere erkennen. (Abbildung aus Li et al. 2014)

### 2.2.6 Fura-2AM Beladung

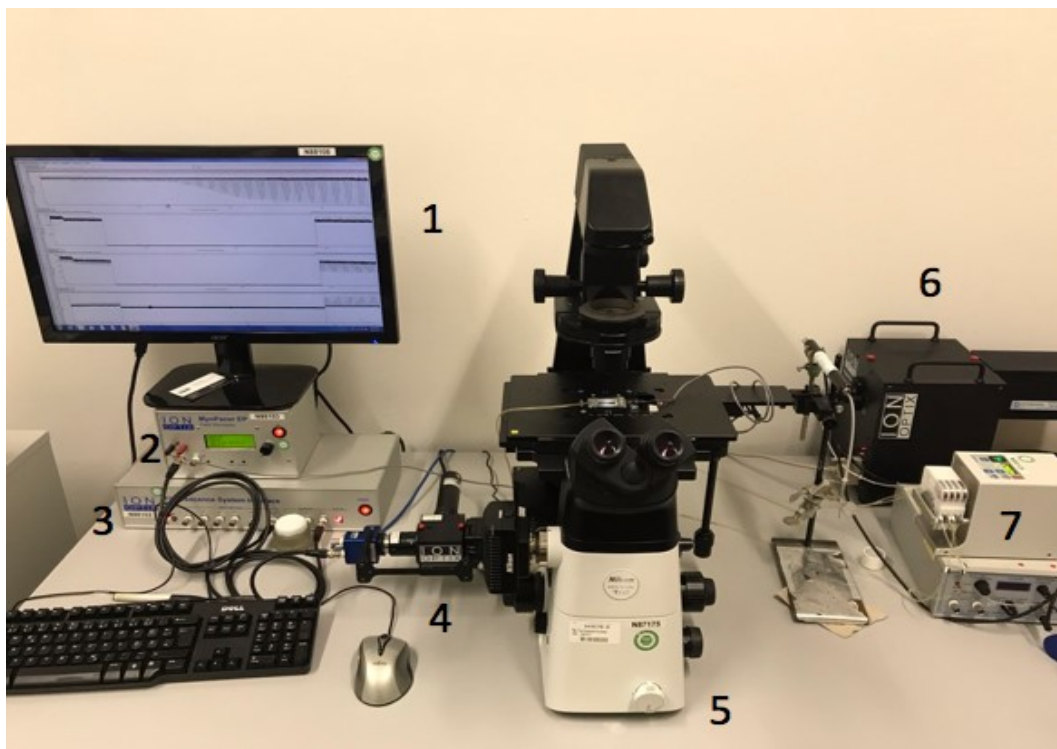
Um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration messen zu können, benötigt man einen Farbstoff, mit dem man das freie Kalzium sichtbar machen kann. Im Rahmen dieses Experimentes wurde der Farbstoff Fura-2AM (Invitrogen™ Fura2-AM, Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Fura-2AM ist ein ratiometrischer  $\text{Ca}^{2+}$  Indikator der bei den Wellenlängen 340 nm (gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$ ) und 380 nm (freies  $\text{Ca}^{2+}$ ) angeregt wird und bei einer Wellenlänge  $>512$  nm fluoresziert. Fura-2AM ist ein Acetoxymethylester und deswegen zellmembrangängig. Im Zytosol spalten intrazelluläre Esterasen die Acetoxymethyl-Gruppe ab und somit bleibt der Fluoreszenzfarbstoff membranundurchlässig in der Zelle. (Paredes et al., 2008)

Die Kardiomyozyten wurden mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2AM für 15 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt beladen. Danach wurde der nicht aufgenommene Farbstoff mit der Normal-Tyrode-Lösung ausgewaschen und somit waren die Zellen bereit für die Messungen.

### 2.2.7 IonOptix Setup

Für die simultanen Messungen der Kontraktilität (Sarkomeren-Shortening) und der Kalziumtransienten wurde ein System der Firma IonOptix (Milton, MA, USA)

verwendet (siehe Abbildung 7). Fura-2AM wurde mit einer HyperSwitch Dual Excitation Lichtquelle angeregt. Zur Feld-Stimulation der Kardiomyozyten wurde ein MyoPacer Cell Stimulator eingesetzt. Die Bilder wurden mit einer High-speed MyoCam-S3 Digital Kamera aufgenommen und die Fluoreszenzphotometrie wurde mit einem PMT Sub-System gemessen. Diese Komponenten waren mit einem Cell Framing Adapter und einem Fluorescence System Interface (Model FSI-800) verbunden. Die Aufnahmen wurden mittels IonWizard 7.2 auf einem PC gespeichert. Das System wurde an ein inverses Lichtmikroskop Nikon Eclipse *Ti2*, Wien, Österreich) mit einem 40x Objektiv (Nikon Super Fluor 40x/0.9 N.A.) angeschlossen.



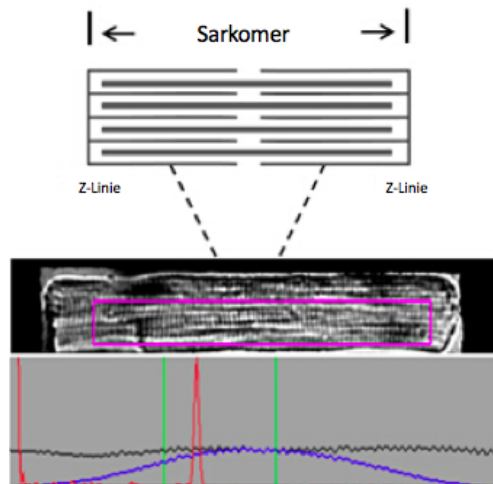
**Abbildung 8: IonOptix Setup**

Die Abbildung zeigt das für die Messungen verwendete Setup. (1) Aufnahmesoftware IonWizard, (2) MyoPacer, (3) Interface, (4) Photomultiplier für die Signalverstärkung, (5) Mikroskop, (6) Lichtquelle, (7) peristaltische Pumpe.

### 2.3 Messungen am Ionoptix Setup

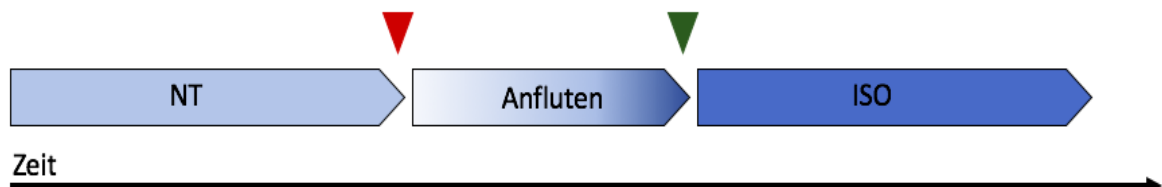
Mit Fura-2AM beladene Zellen wurden auf die Lamininschicht des Objektträgers aufgetragen. Nach kurzer Zeit hatten sich die Zellen an das Laminin angeheftet und wurden dann mit dem MyoPacer stimuliert (0,5 Hz, Quadratpuls: 5 ms und 20 V).

Die zu messende Zelle wurde mit Blendenlamellen von der Umgebung optisch getrennt und das Kästchen im Bereich der Zelle angelegt, um das Sarkomeren-Shortening zu messen (siehe Abbildung 8). Die Messungen finden nach dem in Abbildung 9 beschriebenen Messprotokoll statt.



**Abbildung 9: Einstellung des Messfeldes**

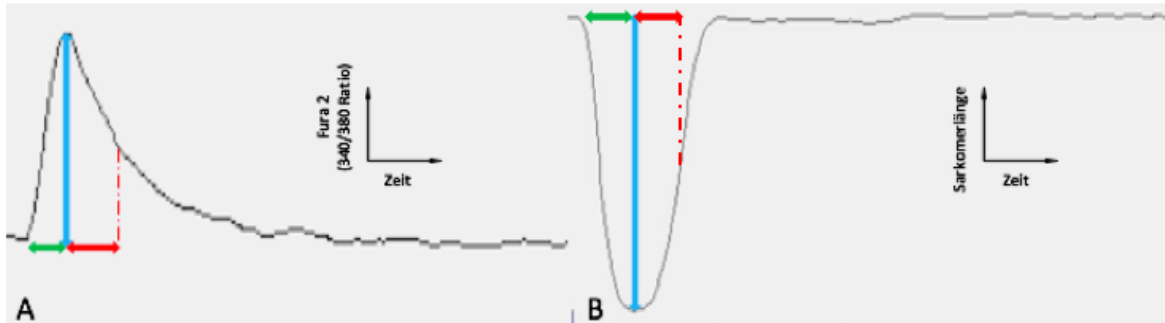
Das Sarkomeren-Shortening wurde innerhalb des lila Rechtecks/Kästchens gemessen. Die rote Kurve zeigt den Durchschnittswert der Sarkomere an und sollte möglichst spitz sein. Das Kalzium wird nur innerhalb des schwarzen Feldes gemessen, indem sich eine Zelle befindet. (Abbildung modifiziert aus Zhao et al. 2016)



**Abbildung 10: Messprotokoll für Kalziumtransienten und Sarkomeren-Shortening in isolierten Maus-Kardiomyozyten**

Linksventrikuläre Kardiomyozyten werden mit Normal-Tyrode (NT) perfundiert und mit einer Frequenz von 0,5 Hz, einem Quadratpuls von 5 ms, sowie einer Spannung von 20 V angeregt. Die Kalziumtransienten und das Sarkomeren-Shortening einer geeigneten Zelle wird unter Baseline-Bedingungen (hellblauer Pfeil) gemessen. Nach circa 15 Kontraktionen wird 10 nM Isoprenalin verabreicht (rotes Dreieck). Bis das Isoprenalin (ISO) angeflutet ist wird die Messung unterbrochen (Farbverlaufspfeil) und die Zellen nicht mit der Lichtquelle bestrahlt, um den Effekt des Photobleaching zu verringern. Sobald ein Steady-State erreicht ist (rotes Dreieck), wird die Zelle unter dem Einfluss von Isoprenalin wieder für circa 15 Kontraktionen gemessen (dunkelblauer Pfeil).

Zur weiteren statistischen Analyse wurden die Transienten sowie die Kurve der Sarkomerenverkürzung gemittelt und relevante Parameter (Amplitude und Kinetik) der Kurven mit Ionwizard und Excel verarbeitet (Siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Auswertung der Messungen**

Es wurden jeweils 7-10 Transienten gemittelt und dann daraus die Amplituden und Kinetik bestimmt. (A) Gemittelte Kurve aus 7-10 Kalziumtransienten: Blauer Pfeil: maximale Amplitude. Grüner Pfeil: Time to peak (TTP). Roter Pfeil: Halb-maximale Abfallzeit der Amplitude ( $DT_{50}$ ). (B) Gemittelte Kurve aus 7-10 Zellkontraktionen. Blauer Pfeil: maximale Amplitude. Grüner Pfeil: TTP. Roter Pfeil:  $DT_{50}$ .

## 2.4 Chemikalien und Lösungen

**Tabelle 1: Perfusionslösung**

Substanz	Hersteller/Quelle	Molekulargewicht (g/mol)	Quantität (g)	Konzentration (mmol/l)
NaCl	Sigma-Aldrich	58,4	7,884	135
KCl	Sigma-Aldrich	74,6	0,351	4,7
$KH_2PO_4$	Sigma-Aldrich	136,1	0,082	0,6
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich	268,07	0,160	0,6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich	246,5	0,296	1,2
HEPES	Sigma-Aldrich	238,31	2,3831	10
Taurin	Sigma-Aldrich	125,1	3,753	30
2,3-Butanedionmonoxim	Sigma-Aldrich	101,1	0,337	10
D-Glukose	Sigma-Aldrich	180,2	0,600	10

**Tabelle 2: Normal-Tyrode Lösung**

Substanz	Hersteller/Quelle	Molekulargewicht (g/mol)	Quantität (g/L)	Konzentration (mmol/l)
<b>NaCl</b>	Sigma-Aldrich	58,44	7,948	136
<b>KCl</b>	Sigma-Aldrich	74,56	0,373	5
<b>MgCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	203,3	0,203	1
<b>HEPES</b>	Sigma-Aldrich	238,3	2,383	10
<b>D-Glukose</b>	Sigma-Aldrich	180,2	1,802	10
<b>CaCl<sub>2</sub> 1 mol/l Stammlösung</b>	Sigma-Aldrich	110,98	1 ml	1

(pH 7,4 bei 22°C)

**Tabelle 3: Kanülierungslösung**

Substanz	Hersteller/Quelle	Molekulargewicht (g/mol)	Quantität (ml)	Konzentration (mmol/l)
<b>Perfusion Buffer</b>	Siehe oben	-	150	-
<b>CaCl<sub>2</sub> 1 mol/l Stammlösung</b>	Sigma-Aldrich	110,98	0,15	1

**Tabelle 4: Verdauungslösung**

Substanz	Hersteller/Quelle	Stammlösung	Volumen (ml)	Konzentration
<b>Perfusion Buffer, pH 7.46</b>	Siehe oben	1x	25	1x
<b>Liberase TM</b>	Roche	50 mg/10 ml	0,300	0.075 mg/ml
<b>Trypsin 10x flüssig</b>	GIBCO	10x	0,111	0.056 mg/ml
<b>CaCl<sub>2</sub>, 1M, 1:100 verdünnt</b>	Sigma-Aldrich	10 mmol/l	0,030	12.5 µmol/l

**Tabelle 5: Stopplösung 1**

Substanz	Hersteller/Quelle	Stammlösung	Volumen	Konzentration
Perfusion Buffer, pH 7.46	Siehe oben	1x	2,25 ml	1x
Bovine calf serum (BCS)	Sigma-Aldrich	100%	0,25 ml	0.25 mg/ml (10%)
CaCl <sub>2</sub> , 1M, 1:100 verdünnt	Sigma-Aldrich	10 mmol/l	3,125 µl	12,5 µmol/l

**Tabelle 6: Stopplösung 2 (SL2)**

Substanz	Hersteller/Quelle	Stammlösung	Quantität	Konzentration
Perfusion Buffer, pH 7.46	Siehe oben	1x	19 ml	1x
Bovine calf serum (BCS)	Sigma-Aldrich	100%	1 ml	5%
CaCl <sub>2</sub> , 1M, 1:100 verdünnt	Sigma-Aldrich	10 mmol/l	25 µl	12,5 µmmol/l

**Tabelle 7: Ca<sup>2+</sup> Verdünnungsreihen für den Ca<sup>2+</sup>-Aufbau**

Substanz	Konzentration (mmol/l)	Quantität
Ca <sup>2+</sup> Lösung 1	0,125 Ca <sup>2+</sup>	10 µl 0,1 M CaCl <sub>2</sub> in 8 ml SL2
Ca <sup>2+</sup> Lösung 2	0,25 Ca <sup>2+</sup>	10 µl 0,1 M CaCl <sub>2</sub> in 4 ml SL2
Ca <sup>2+</sup> Lösung 3	0,5 Ca <sup>2+</sup>	40 µl 0,1 M CaCl <sub>2</sub> in 8 ml SL2

### Fura-2AM

50 µg Fura-2AM (Hersteller: ThermoFisher Scientific) gelöst in 50,4 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Hersteller: Sigma-Aldrich) um 1mM zu erreichen.

### 10 nmol/l Isoprenalin

50 µl von 10 µM Isoprenalin (Hersteller: Sigma-Aldrich) in 50 ml Normal Tyrode (siehe oben)

### Laminin

20 µl Laminin (Hersteller: Sigma-Aldrich, Laminin aus Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane) in 980 µl Normal Tyrode (siehe oben). 3 Stunden bei Raumtemperatur auf Deckgläsern inkubieren.

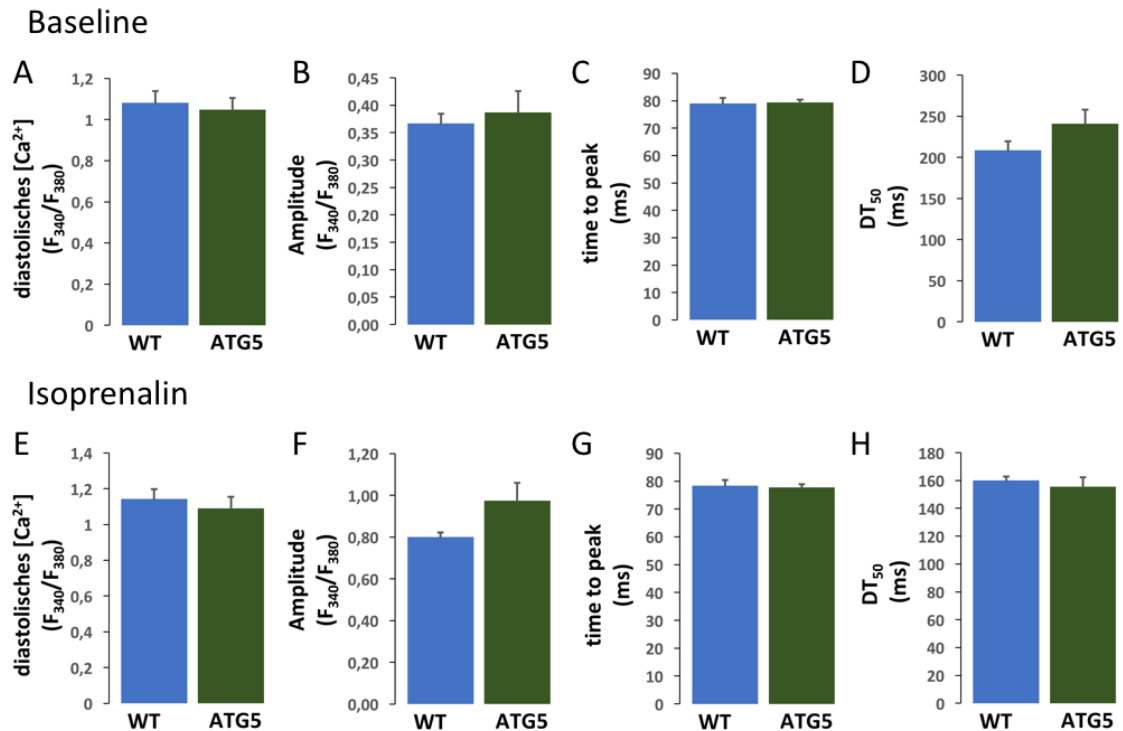
## 2.5 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mit Excel und SPSS analysiert und wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die Analyse wurde der Student's t-Test und Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um die Daten auf Normalverteilung zu prüfen, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Mit dem Levene-Test wurden die Daten auf Varianzgleichheit überprüft. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kalziumhomöostase und Kontraktilität in *Atg5*-defizienten Kardiomyozyten

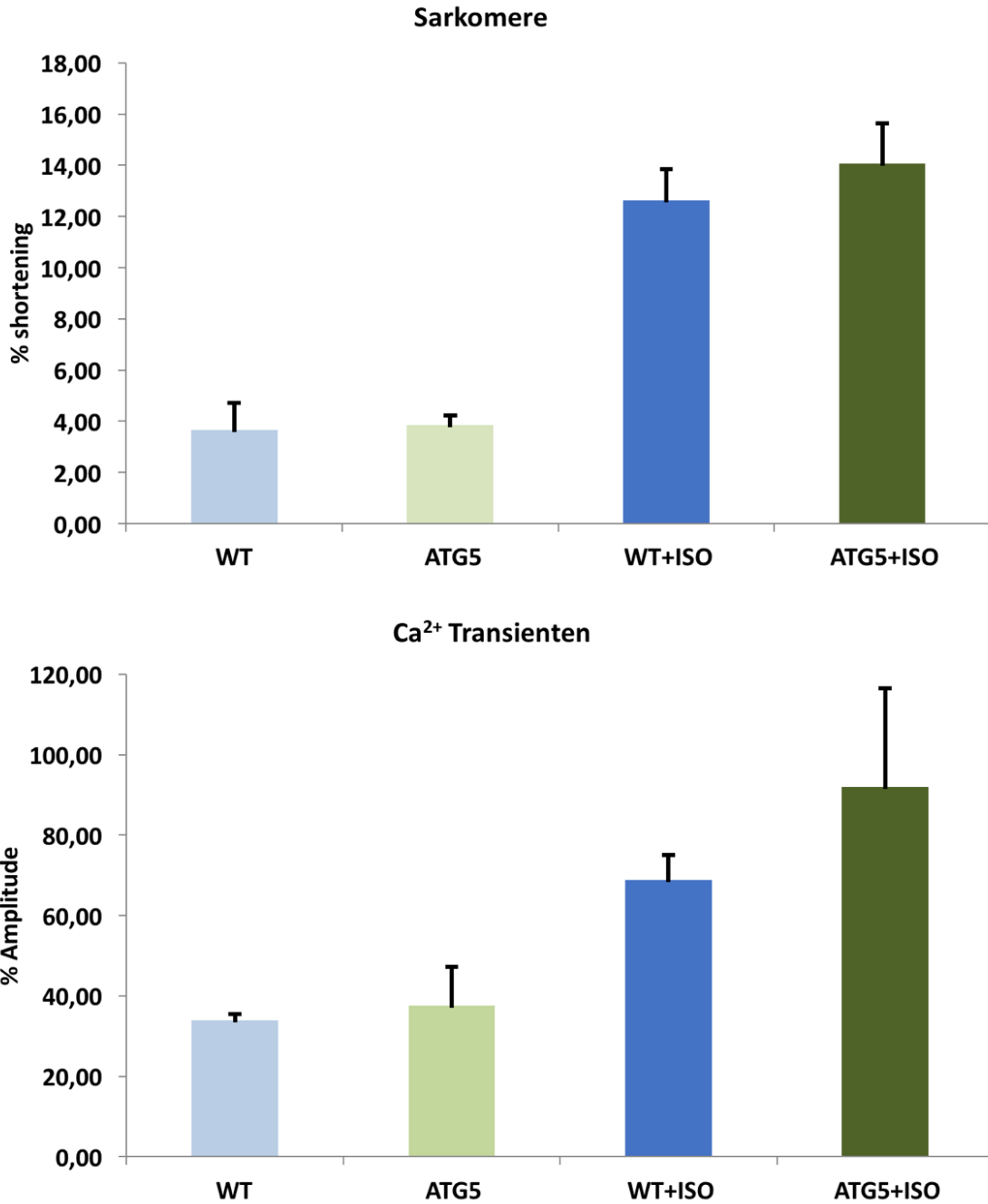
Zunächst wurden die Kalziumtransienten der beiden Gruppen *Atg5*<sup>+/+</sup> versus *Atg5*<sup>-/-</sup> global unter Baseline-Bedingungen und nach Isoprenalingabe betrachtet. Hierbei zeigten sich unter Baseline ähnliche Werte des diastolischen Kalziums [Ca<sup>2+</sup>]<sub>(F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>)</sub> in *Atg5*<sup>+/+</sup> versus *Atg5*<sup>-/-</sup> ( $1,08 \pm 0,06$  versus  $1,05 \pm 0,06$ ;  $p=0,69$ ) und dem Kalziumanstieg in der Systole ( $0,37 \pm 0,02$  versus  $0,039 \pm 0,04$ ;  $p=0,66$ ). Außerdem wurde die Kinetik betrachtet, wobei sich gleiche Werte bei der TTP (*Atg5*<sup>+/+</sup>:  $79 \pm 0,002$  ms und *Atg5*<sup>-/-</sup>:  $79 \pm 0,001$  ms;  $p=0,77$ ) und ähnliche Werte bei der halb-maximalen Abfallzeit des Fura-2AM Signals DT<sub>50</sub> ( $209 \pm 0,01$  ms versus  $241 \pm 0,017$  ms;  $p=0,167$ ) ergaben. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kalziumhomöostase unter basal Bedingungen bei *Atg5*<sup>-/-</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert ist. Nach Isoprenalingabe zeigten sich erwartungsgemäß höhere und schnellere Kalziumtransienten bei diastolischem Kalzium (*Atg5*<sup>+/+</sup>:  $1,14 \pm 0,06$  versus *Atg5*<sup>-/-</sup>:  $1,09 \pm 0,07$ ;  $p=0,56$ ), einem systolischen Anstieg von ( $0,80 \pm 0,02$  versus  $0,97 \pm 0,09$ ;  $p=0,13$ ), einer TTP von ( $78 \pm 0,002$  ms versus  $78 \pm 0,001$  ms;  $p=0,81$ ) und der Abfallrate DT<sub>50</sub> von ( $160 \pm 0,003$  ms versus  $156 \pm 0,007$  ms;  $p=0,557$ ). Die vergleichbaren Werte zwischen den Gruppen, sowohl beim intrazellulären Kalzium als auch in der Kinetik, deuten darauf hin, dass die Kalziumhomöostase auch nach beta-adrenerger Stimulation bei *Atg5*<sup>-/-</sup> Kardiomyozyten intakt ist.



**Abbildung 12: Analyse der Kalziumtransienten in *Atg5*<sup>+/+</sup> und *Atg5*<sup>-/-</sup> Herzmuskelzellen**

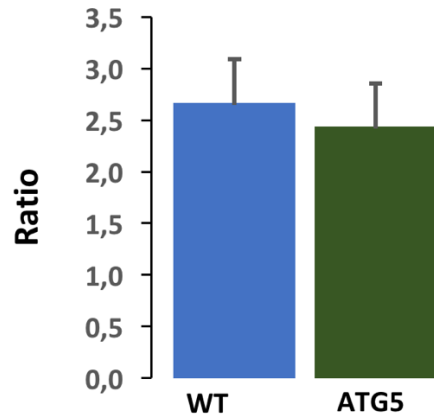
A-D: Vergleich der Kalziumtransienten von *Atg5*<sup>+/+</sup> versus *Atg5*<sup>-/-</sup> unter Baseline-Bedingungen. Sowohl die Amplituden als auch die Kinetik sind vergleichbar. E-G: Auch unter Isoprenalingabe sind die Transienten vergleichbar. Es wurden n=23-26 Zellen von N=5 Mäusen pro Gruppe für die Auswertung herangezogen.

Beide Gruppen hatten eine ähnliche relative Sarkomerenverkürzung, sowohl unter Baseline (*Atg5*<sup>+/+</sup>: 3,65 ± 0,53 % versus *Atg5*<sup>-/-</sup>: 3,84 ± 0,20 %; p=0,75) als auch nach Isoprenalingabe (*Atg5*<sup>+/+</sup>: 12,62 ± 0,61 % versus *Atg5*<sup>-/-</sup>: 14,07 ± 0,78 %; p=0,044). Bei den Kalziumtransienten ergab sich unter Baseline bei *Atg5*<sup>+/+</sup> Zellen ein ähnlicher Anstieg der maximalen Amplitude (33,89 ± 0,82 %) im Vergleich zu *Atg5*<sup>-/-</sup> Herzmuskelzellen (37,63 ± 4,82 %; p=0,50). Isoprenalin hat in beiden Gruppen die maximale Amplitude vergleichbar erhöht (68,85 ± 3,13 % versus 91,89 ± 12,34 %; p=0,16). Betrachtet man nun das Verhältnis von relativem Kalziumanstieg zur relativen Sarkomerenlängenverkürzung ergibt sich kein signifikanter Unterschied (*Atg5*<sup>+/+</sup>: 2,67 ± 0,3 und *Atg5*<sup>-/-</sup>: 2,43 ± 0,42; p=0,28).

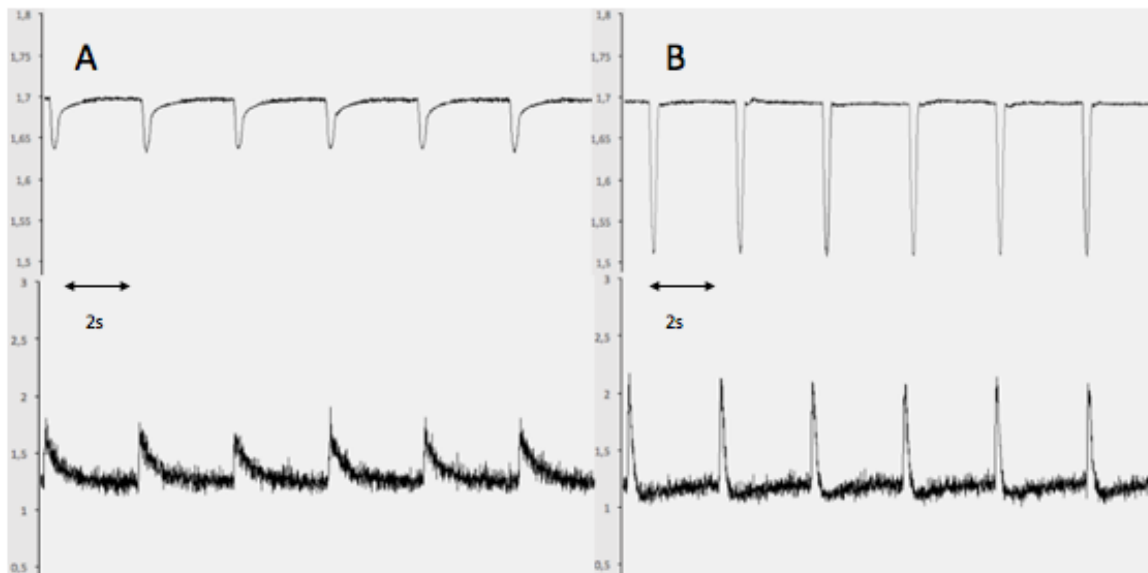


**Abbildung 13: Relative Veränderung der Sarkomerlänge und der Kalziumtransienten**

Oben: Prozentuelle Veränderung der Sarkomerlänge der einzelnen Gruppen unter Basalbedingungen und unter Isoprenalingabe (ISO). Wie erwartet zeigte sich eine deutliche Zunahme der Verkürzungen unter Isoprenalin in beiden Gruppen. Unten: Prozentuelle Veränderung der Kalziumtransienten unter Basalbedingungen und unter Isoprenalingabe. Auch hier zeigte sich eine deutliche Zunahme der Veränderung. Die *Atg5<sup>-/-</sup>* Gruppe zeigte hier eine Tendenz zu höheren Transienten, die mit einer größeren relativen Verkürzung der Sarkomere einherging.

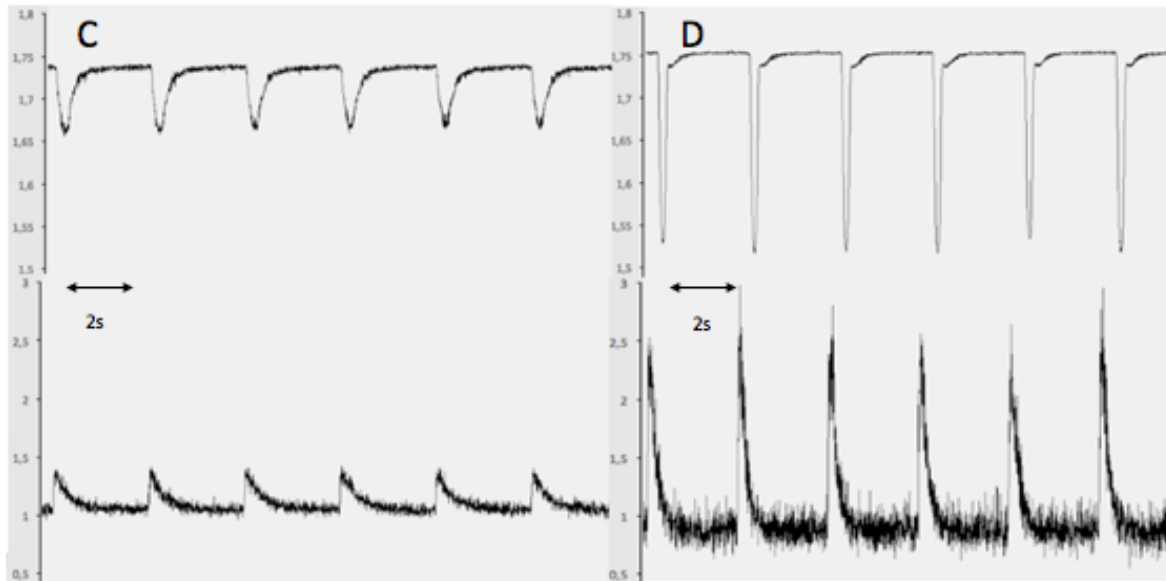


**Abbildung 14: Verhältnis zwischen relativem Kalziumanstieg und der prozentuellen Sarkomerlängenveränderung**



**Abbildung 15: Repräsentative Originalaufnahmen in *Atg5*<sup>+/+</sup> Kardiomyozyten**

Oben sieht man die Veränderung der Sarkomerlänge und unten die dazugehörigen Kalziumtransienten unter Baseline (A) und Isoprenalingabe (B) in *Atg5*<sup>+/+</sup> Zellen.

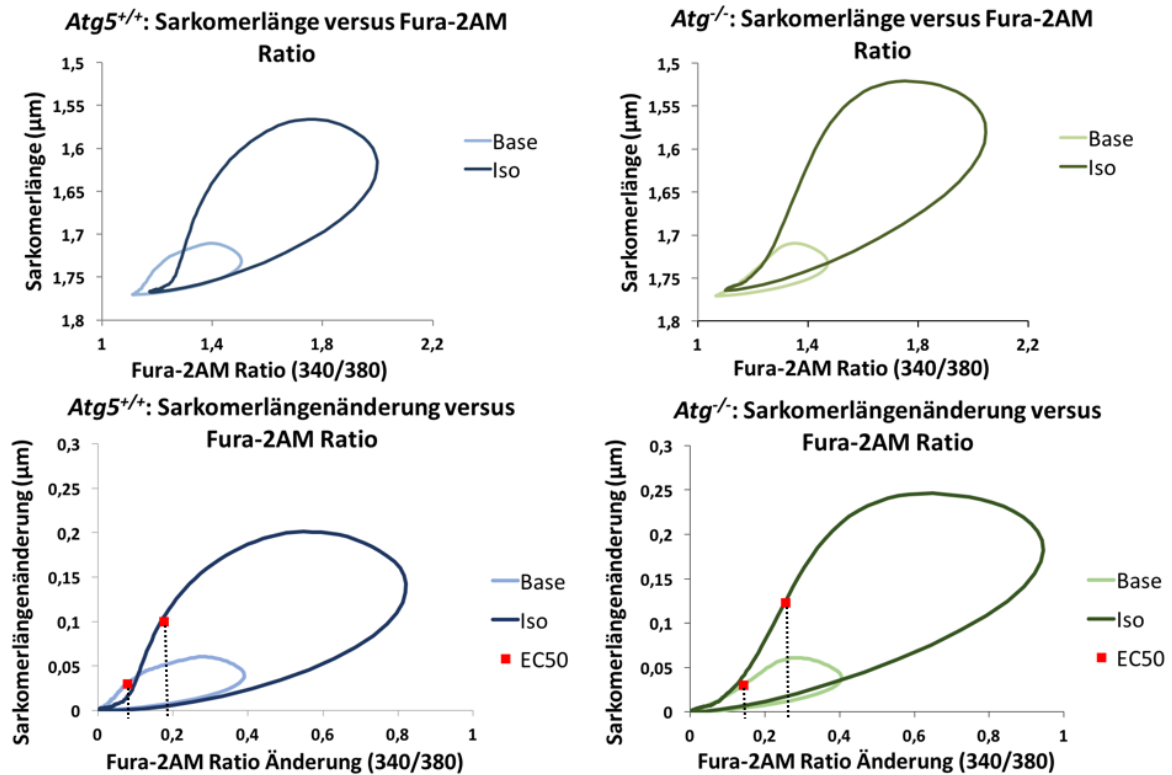


**Abbildung 16: Repräsentative Originalaufnahmen in *Atg5*<sup>-/-</sup> Kardiomyozyten**

Oben sieht man die Veränderung der Sarkomerlänge und unten die dazugehörigen Kalziumtransienten unter Baseline (C) und Isoprenalingabe (D) in *Atg5*<sup>-/-</sup> Zellen

### 3.2 Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente in *Atg5*<sup>-/-</sup> Kardiomyozyten

Während der Relaxationsphase ist das zytosolische Kalzium, die Sarkomerlänge und das Kalzium, welches an die Myofilamente gebunden ist, im „Gleichgewicht“ (Zhao et al., 2016). Wenn man das Verhältnis (Ratio) zwischen der Sarkomerlängenveränderung und der Ca<sup>2+</sup>-Veränderung innerhalb eines Zyklus vergleicht, kann man eventuelle Unterschiede in der Kalziumsensitivität von Myofilamenten darstellen. Dafür muss man die Kurven der beiden Gruppen anhand der halb-maximalen Abfallzeit des Ca<sup>2+</sup>-Signals (Fura2-Ratio bei 50 % Relaxation; EC50) vor und nach Isoprenalingabe vergleichen. Verschiebt sich EC50 signifikant nach rechts, würde das auf eine Desensibilisierung der Myofilamente hindeuten.

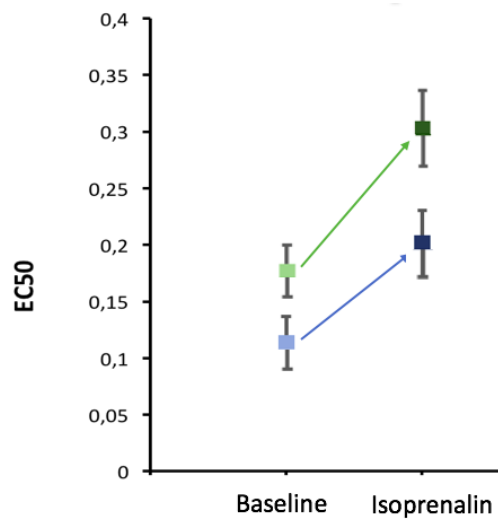


**Abbildung 17 Das Verhältnis zwischen Sarkomerenlänge und  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenz**

Oben: Absolute Sarkomerenlänge gegen die Änderung der Fura-2AM Ratio (F340/F380) während eines Kontraktions-Relaxationszyklus. Links: Die hellblaue Schleife ist unter Basalbedingungen in der *Atg5*<sup>+/+</sup> Gruppe und die dunkelblaue Schleife unter Isoprenalingabe. Rechts: Die hellgrüne Schleife ist unter Basalbedingungen in der *Atg5*<sup>-/-</sup> Gruppe und die dunkelgrüne unter Isoprenalingabe. Es zeigt sich in beiden Gruppen eine deutliche Vergrößerung der Schleife nach Isoprenalingabe und damit beta-adrenerger Stimulation.

Unten: Die Sarkomerlängenveränderung gegen die Fura-2AM Ratio (F340/F380) Veränderung. Zum Vergleich der Kalziumsensitivität der Myofilamente kann man die EC50 (Fura-2AM Fluoreszenz-Wert bei 50% Relaxation, roter Punkt) heranziehen. Würde sich die EC50 signifikant weiter rechts befinden, würde das für eine Desensibilisierung der Myofilamente sprechen.

Wie erwartet bewirkt die Isoprenalingabe eine Desensibilisierung in beiden Gruppen. Allerdings zeigte sich mit einer Veränderung der EC50 von  $0,09 \pm 0,0064$  in *Atg5*<sup>+/+</sup> im Vergleich zu  $0,13 \pm 0,025$  in *Atg5*<sup>-/-</sup> und einem  $p < 0,5$  kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Damit konnten wir nicht bestätigen, dass *Atg5*<sup>-/-</sup> Zellen eine verringerte Kalziumsensitivität der Myofilamente aufweisen.



**Abbildung 18: Verschiebung der EC50**

Die blauen Vierecke zeigen die EC50 der *Atg5*<sup>+/+</sup> Gruppe vor und nach Isoprenalingabe. Der blaue Pfeil zeigt die Verschiebung der EC50 bei *Atg5*<sup>+/+</sup>. Die grünen Vierecke zeigen die EC50 der *Atg5*<sup>-/-</sup> Gruppe vor und nach Isoprenalingabe. Der grüne Pfeil zeigt die Verschiebung der EC50 bei *Atg5*<sup>-/-</sup> nach der Gabe von 10 nM Isoprenalin. Es wurden n=23-26 Zellen von N=5 Mäusen pro Gruppe für die Auswertung herangezogen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Kalziumtransienten simultan zu den Sarkomerlängenverkürzungen gemessen, um die Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente in *Atg5*-defizienten Kardiomyozyten zu untersuchen. Wir haben junge *Atg5*<sup>-/-</sup> Mäuse herangezogen, deren Herzfunktion *in vivo* unter basal Bedingungen keine Veränderungen zur Kontrollgruppe und keine Krankheitssymptome zeigten. In *in vivo* Vorversuchen zeigte sich nach beta-adrenerger Aktivierung ein verminderter Kontraktilitätsanstieg und eine eingeschränkte kardiale Reserve sowie ein reduziertes Herzzeitvolumen, obwohl *in vitro* höhere Amplituden der Kalziumtransienten nach Isoprenalingabe beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung gibt einen möglichen Hinweis darauf, dass die Myofilamente bei Autophagie-inkompetenten Kardiomyozyten eine verminderte Kalziumsensitivität aufweisen. Jedoch konnte diese Hypothese in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Kontrolle der Myofilamente durch Kalzium ist komplex und von vielen Faktoren abhängig. So wird, wie anfangs beschrieben, schon alleine die Kalziumsensitivität durch äußere Einflüsse, wie unter anderem der Temperatur, des pH-Wertes und auch der Sarkomerlänge, beeinflusst. Es ist hinlänglich bekannt, dass *in vitro* Versuche lediglich ein Model darstellen und nie die Komplexität der *in vivo* Vorgänge vollkommen widerspiegeln können. Ein Effekt, der in diesen Experimenten nicht in Betracht gezogen werden konnte, ist der klassische Frank-Starling-Mechanismus. Eine Änderung des Frank-Starling-Mechanismus geht auch mit einem anderen Stoffwechsel einher, wie es in isolierten Kardiomyozyten, die nicht in einem Synzytium eingebettet sind, der Fall ist. So arbeiten die Mitochondrien anders, der Sauerstoffverbrauch ändert sich und die Myofilamente sind unterschiedlich gedehnt – sowohl passiv als auch aktiv. *In vivo* sind Sarkomere in der Diastole normalerweise vorgedehnt und haben somit eine Länge von 2,0-2,2 µm, was der optimalen Überlappung der Sarkomere in der Längen-Spannungs-Beziehung entspricht (Bers, 2001). Bei *in vitro* Versuchen dieser Art erfahren die Sarkomere jedoch keine Vordehnung und haben eine Ausgangslänge von circa 1,8 µm, was die Kalzium-Empfindlichkeit der Myofilamente beeinflussen kann. Eine mögliche Interpretation der Ergebnisse ist somit, dass die unterschiedlichen

Bedingungen *in vivo* einen so großen Einfluss haben, dass sie Änderungen der Kalziumsensitivität aufheben beziehungsweise maskieren.

Isoprenalin bewirkt über die PKA gesteuerte Phosphorylierung von PLB und TnI eine positive Inotropie und Lusitropie des Herzens (siehe Kapitel 1.1.3). In weiteren Versuchen untersuchten wir den Einfluss von Isoprenalin auf die Phosphorylierung bei Autophagiedefizienz und fanden heraus, dass bei *Atg5<sup>-/-</sup>* Mäusen die Phosphorylierung von PLB intakt, die von TnI jedoch vermindert ist. Layland *et al.* konnten zeigen, dass die Effekte einer TnI Phosphorylierung deutlich ausgeprägter bei Bedingungen sind, die die *in vivo* Verhältnisse besser nachstellen, als bei unbelasteten isolierten Kardiomyozyten (Layland *et al.*, 2004). Dies könnte ebenfalls erklären, warum wir *in vivo* eine erniedrigte kardiale Reserve beziehungsweise ein vermindertes Herzzeitvolumen beobachten konnten, *in vitro* aber nicht die Hypothese einer verminderten Kalziumsensitivität bestätigen konnten.

Da die von uns untersuchten Mäuse noch keine Herzinsuffizienz entwickelt haben, daher auch nicht krank waren und sich *in vivo* Unterschiede erst unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Stress zeigten, kann es vorkommen, dass etwaige Änderungen *in vitro* nicht reproduziert werden können. So spielt unter anderem die Stimulationsfrequenz eine wichtige Rolle, denn wir konnten in *in vitro* Vorversuchen zeigen, dass *Atg5<sup>-/-</sup>* Mäuse bei erhöhter Frequenz eine gestörte Kalziumhomöostase aufweisen. Abhängig von der Aktivität und Umweltfaktoren haben Mäuse eine Herzfrequenz von 500-700 Hz (Ho *et al.*, 2011), wohingegen bei diesen Versuchen die Kardiomyozyten bei 0,5 Hz stimuliert wurden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Kalzium-Empfindlichkeit indirekt, das heißt über das Sarkomer-Shortening und nicht direkt an den Myofilamenten über das Verhältnis von  $Ca^{2+}$  und Kraftproduktion, gemessen. Auch eine Anpassung von Faktoren wie der Temperatur auf 37°C und vor allem die Beachtung von Vor- und Nachlast (Frank-Starling-Mechanismus), zum Beispiel mit einer Vordehnung der Sarkomere auf 2,2  $\mu m$ , könnten die Ergebnisse verändern. Es müssten weitere Versuche durchgeführt werden, die diese Punkte mit einbeziehen, um die physiologischen Bedingungen möglichst gut nachzustellen und damit auszuschließen, dass die Kalzium-Empfindlichkeit bei Autophagiedefizienz sicher nicht vermindert ist.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abdellatif, M., Sedej, S., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., & Kroemer, G. (2018, Sep 14). Autophagy in Cardiovascular Aging. *Circulation Research*, 123(7), 803-824. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312208>
- Ali, H., Braga, L., & Giacca, M. (2020, Feb). Cardiac regeneration and remodelling of the cardiomyocyte cytoarchitecture. *Febs j*, 287(3), 417-438. <https://doi.org/10.1111/febs.15146>
- Bassani, R. A., Bassani, J. W., & Bers, D. M. (1992). Mitochondrial and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *453*(1), 591-608. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019246>
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., & Frisen, J. (2009, Apr 3). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324(5923), 98-102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjoström, S. L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., Dos Remedios, C., Malm, T., Andrä, M., Jashari, R., Nyengaard, J. R., Possnert, G., Jovinge, S., Druid, H., & Frisén, J. (2015, Jun 18). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 161(7), 1566-1575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003, 2003/07/01). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bers, D. M. (2001). Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. <https://doi.org/doi:10.1093/cvr/26.4.430>
- Bers, D. M. (2002, Jan 10). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70, 23-49. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455>
- Bers, D. M., & Guo, T. (2005, Jun). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, 86-98. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.008>
- Best, P. M., Donaldson, S. K., & Kerrick, W. G. (1977, Feb). Tension in mechanically disrupted mammalian cardiac cells: effects of magnesium adenosine triphosphate. *Journal of Physiology*, 265(1), 1-17. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011702>

- Blanchard, E. M., Pan, B. S., & Solaro, R. J. (1984, Mar 10). The effect of acidic pH on the ATPase activity and troponin Ca<sup>2+</sup> binding of rabbit skeletal myofilaments. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5), 3181-3186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6142051>
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., Jamieson, S., & et al. (1986, Sep). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circulation Research*, 59(3), 297-309. <https://doi.org/10.1161/01.res.59.3.297>
- Bround, M. J., Wambolt, R., Luciani, D. S., Kulpa, J. E., Rodrigues, B., Brownsey, R. W., Allard, M. F., & Johnson, J. D. (2013, Jun 28). Cardiomyocyte ATP production, metabolic flexibility, and survival require calcium flux through cardiac ryanodine receptors in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18975-18986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427062>
- Cuervo, A. M. (2008, Dec). Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in Genetics*, 24(12), 604-612. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.10.002>
- Dhein, S. (2005, 01/01). The Langendorff Heart. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. [https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0\\_9](https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_9)
- Edes, I., Kiss, E., Kitada, Y., Powers, F. M., Papp, J. G., Kranias, E. G., & Solaro, R. J. (1995, Jul). Effects of Levosimendan, a cardiotoxic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circulation Research*, 77(1), 107-113. <https://doi.org/10.1161/01.res.77.1.107>
- Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., Tong, M., Ruckstuhl, C., Dammbroek, C., Gross, A. S., Herbst, V., Magnes, C., Trausinger, G., Narath, S., Meinitzer, A., Hu, Z., Kirsch, A., Eller, K., Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., Pietrocola, F., Knittelfelder, O., Schrepfer, E., Rockenfeller, P., Simonini, C., Rahn, A., Horsch, M., Moreth, K., Beckers, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Neff, F., Janik, D., Rathkolb, B., Rozman, J., de Angelis, M. H., Moustafa, T., Haemmerle, G., Mayr, M., Willeit, P., von Frieling-Salewsky, M., Pieske, B., Scorrano, L., Pieber, T., Pechlaner, R., Willeit, J., Sigrist, S. J., Linke, W. A., Mühlfeld, C., Sadoshima, J., Dengjel, J., Kiechl, S., Kroemer, G., Sedej, S., & Madeo, F. (2016, Dec). Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nature Medicine*, 22(12), 1428-1438. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>

- Fabiato, A., & Fabiato, F. (1977, Feb). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circulation Research*, 40(2), 119-129. <https://doi.org/10.1161/01.res.40.2.119>
- Fentzke, R. C., Buck, S. H., Patel, J. R., Lin, H., Wolska, B. M., Stojanovic, M. O., Martin, A. F., Solaro, R. J., Moss, R. L., & Leiden, J. M. (1999). Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *The Journal of Physiology*, 517 ( Pt 1)(Pt 1), 143-157. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0143z.x>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010, May). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Griffin, P. P., Schubert-Zsilavec, M., & Stark, H. (2004, 2004/11/01). Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede [<https://doi.org/10.1002/pauz.200400091>]. *Pharmazie in Unserer Zeit*, 33(6), 442-449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pauz.200400091>
- Harrison, S. M., & Bers, D. M. (1989). Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *The Journal of general physiology*, 93(3), 411-428. <https://doi.org/10.1085/jgp.93.3.411>
- Hibberd, M. G., & Jewell, B. R. (1982). Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *The Journal of Physiology*, 329(1), 527-540. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014317>
- Ho, D., Zhao, X., Gao, S., Hong, C., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2011). Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1, 123-139. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100159>
- Huxley, A. F., & Niedergerke, R. (1954, May 22). Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173(4412), 971-973. <https://doi.org/10.1038/173971a0>
- Huxley, H., & Hanson, J. (1954, May 22). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173(4412), 973-976. <https://doi.org/10.1038/173973a0>
- Jacobus, W. E., Pores, I. H., Lucas, S. K., Weisfeldt, M. L., & Flaherty, J. T. (1982, 1982/09/01/). Intracellular acidosis and contractility in the normal and ischemic heart as examined by <sup>31</sup>P NMR. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 14, 13-20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2828\(82\)90124-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2828(82)90124-9)
- Kentish, J. C. (1986, Jan). The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle.

- Journal of Physiology*, 370, 585-604.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015952>
- Kuma, A., Komatsu, M., & Mizushima, N. (2017, Oct 3). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, 13(10), 1619-1628.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1343770>
- Lamont, C., & Miller, D. J. (1992, Aug). Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. *Journal of Physiology*, 454, 421-434.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019271>
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., & Brown, T. G., Jr. (1967, May 6). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214(5088), 597-598. <https://doi.org/10.1038/214597a0>
- Layland, J., Grieve, D. J., Cave, A. C., Sparks, E., Solaro, R. J., & Shah, A. M. (2004, May 1). Essential role of troponin I in the positive inotropic response to isoprenaline in mouse hearts contracting auxotonically. *Journal of Physiology*, 556(Pt 3), 835-847.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061176>
- Li, D., Wu, J., Bai, Y., Zhao, X., & Liu, L. (2014, 05/21). Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiomyocytes for Cell Signaling and in vitro Cardiac Hypertrophy. *Journal of Visualized Experiments*.  
<https://doi.org/10.3791/51357>
- Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G., & Bers, D. M. (2000, Mar). Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 278(3), H769-779.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.3.H769>
- Liao, R., Podesser, B. K., & Lim, C. C. (2012, Jul 15). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 303(2), H156-167. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00333.2012>
- Ljubojevic, S., Radulovic, S., Leitinger, G., Sedej, S., Sacherer, M., Holzer, M., Winkler, C., Pritz, E., Mittler, T., Schmidt, A., Sereinigg, M., Wakula, P., Zissimopoulos, S., Bisping, E., Post, H., Marsche, G., Bossuyt, J., Bers, D. M., Kockskämper, J., & Pieske, B. (2014). Early remodeling of perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation*, 130(3), 244-255.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008927>
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011, Nov 11). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>

- Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002). Autophagosome Formation in Mammalian Cells. *Cell Structure and Function*, 27(6), 421-429. <https://doi.org/10.1247/csf.27.421>
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N., & Otsu, K. (2007, May). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine*, 13(5), 619-624. <https://doi.org/10.1038/nm1574>
- Nishida, K., Kyoji, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J., & Otsu, K. (2009). The role of autophagy in the heart. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 31-38. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.163>
- O'Connell T., Y. N. (2002). Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart. *AfCS Procedure Protocol PP00000125*, 1.
- Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., Akira, S., Yamamoto, A., Komuro, I., & Otsu, K. (2012). Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, 485(7397), 251-255. <https://doi.org/10.1038/nature10992>
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008, Nov). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.025>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014, Jan 20). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K., Alla, F., Alvis-Guzman, N., Amrock, S., Ansari, H., Arnlov, J., Asayesh, H., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., Banerjee, A., Barac, A., Barnighausen, T., Barregard, L., Bedi, N., Belay Ketema, E., Bennett, D., Berhe, G., Bhutta, Z., Bitew, S., Carapetis, J., Carrero, J. J., Malta, D. C., Castaneda-Orjuela, C. A., Castillo-Rivas, J., Catala-Lopez, F., Choi, J. Y., Christensen, H., Cirillo, M., Cooper, L., Jr., Criqui, M., Cundiff, D., Damasceno, A., Dandona, L., Dandona, R., Davletov, K., Dharmaratne, S., Dorairaj, P., Dubey, M., Ehrenkranz, R., El Sayed Zaki, M., Faraon, E. J. A., Esteghamati, A., Farid, T., Farvid, M., Feigin, V., Ding, E. L., Fowkes, G., Gebrehiwot, T., Gillum, R., Gold, A., Gona, P., Gupta, R., Habtewold, T. D., Hafezi-Nejad, N., Hailu, T., Hailu, G. B., Hankey, G., Hassen, H. Y., Abate, K. H., Havmoeller, R., Hay, S. I., Horino, M., Hotez, P. J., Jacobsen, K., James, S., Javanbakht, M., Jeemon, P., John, D., Jonas, J., Kalkonde, Y., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Khader, Y., Khan, A., Khang, Y. H., Khera, S., Khoja, A. T., Khubchandani, J., Kim, D., Kolte, D., Kosen, S., Krohn, K. J., Kumar, G. A., Kwan, G. F., Lal, D. K., Larsson, A., Linn, S., Lopez, A., Lotufo, P. A., El Razek, H. M. A., Malekzadeh, R., Mazidi, M., Meier, T., Meles, K. G., Mensah, G., Meretoja, A., Mezgebe, H., Miller, T., Mirrakhimov, E.,

Mohammed, S., Moran, A. E., Musa, K. I., Narula, J., Neal, B., Ngalesoni, F., Nguyen, G., Obermeyer, C. M., Owolabi, M., Patton, G., Pedro, J., Qato, D., Qorbani, M., Rahimi, K., Rai, R. K., Rawaf, S., Ribeiro, A., Safiri, S., Salomon, J. A., Santos, I., Santric Milicevic, M., Sartorius, B., Schutte, A., Sepanlou, S., Shaikh, M. A., Shin, M. J., Shishehbor, M., Shore, H., Silva, D. A. S., Sobngwi, E., Stranges, S., Swaminathan, S., Tabares-Seisdedos, R., Tadele Atnafu, N., Tesfay, F., Thakur, J. S., Thrift, A., Topor-Madry, R., Truelsen, T., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Uthman, O., Vasankari, T., Vlassov, V., Vollset, S. E., Wakayo, T., Watkins, D., Weintraub, R., Werdecker, A., Westerman, R., Wiysonge, C. S., Wolfe, C., Workicho, A., Xu, G., Yano, Y., Yip, P., Yonemoto, N., Younis, M., Yu, C., Vos, T., Naghavi, M., & Murray, C. (2017, Jul 4). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(1), 1-25.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>

Schober, T., Huke, S., Venkataraman, R., Gryshchenko, O., Kryshtal, D., Hwang, H. S., Baudenbacher, F. J., & Knollmann, B. C. (2012, Jul 6). Myofilament Ca sensitization increases cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circulation Research*, 111(2), 170-179.

<https://doi.org/10.1161/circresaha.112.270041>

Sedej, S., Schmidt, A., Denegri, M., Walther, S., Matovina, M., Arnstein, G., Gutschli, E. M., Windhager, I., Ljubojević, S., Negri, S., Heinzl, F. R., Bisping, E., Vos, M. A., Napolitano, C., Priori, S. G., Kockskämper, J., & Pieske, B. (2014, Apr 22). Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(15), 1569-1579.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.11.010>

Shaikh, S., Troncoso, R., Criollo, A., Bravo-Sagua, R., García, L., Morselli, E., Cifuentes, M., Quest, A. F., Hill, J. A., & Lavandro, S. (2016, Apr 15). Regulation of cardiomyocyte autophagy by calcium. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 310(8), E587-e596.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00374.2015>

Shirakabe, A., Ikeda, Y., Sciarretta, S., Zablocki, D. K., & Sadoshima, J. (2016, May 13). Aging and Autophagy in the Heart. *Circulation Research*, 118(10), 1563-1576. <https://doi.org/10.1161/circresaha.116.307474>

Solaro, R. J., Henze, M., & Kobayashi, T. (2013, Jan 18). Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks. *Circulation Research*, 112(2), 355-366. <https://doi.org/10.1161/circresaha.112.268672>

Stevens A., L. J. (1997). Histologie des Menschen. *Chapman and Hall*, 2. Auflage.

Taneike, M., Yamaguchi, O., Nakai, A., Hikoso, S., Takeda, T., Mizote, I., Oka, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nishida, K., Shimizu, T., Hori, M., Komuro, I., Takuji Shirasawa, T. S., Mizushima, N., & Otsu, K. (2010, Jul).

- Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*, 6(5), 600-606. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.11947>
- Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y., Weeks, K. L., & McMullen, J. R. (2015, Sep). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology*, 89(9), 1401-1438. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>
- Towers, C. G., & Thorburn, A. (2016, Dec). Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine*, 14, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.034>
- Wachter, S. B., & Gilbert, E. M. (2012). Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*, 122(2), 104-112. <https://doi.org/10.1159/000339271>
- Zhao, Z. H., Jin, C. L., Jang, J. H., Wu, Y. N., Kim, S. J., Jin, H. H., Cui, L., & Zhang, Y. H. (2016, Aug 1). Assessment of Myofilament Ca<sup>2+</sup> Sensitivity Underlying Cardiac Excitation-contraction Coupling. *J Vis Exp*(114). <https://doi.org/10.3791/54057>
- Zou, Y., Liang, Y., Gong, H., Zhou, N., Ma, H., Guan, A., Sun, A., Wang, P., Niu, Y., Jiang, H., Takano, H., Toko, H., Yao, A., Takeshima, H., Akazawa, H., Shiojima, I., Wang, Y., Komuro, I., & Ge, J. (2011, Dec). Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 58(6), 1099-1110. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.111.173500>