

Regulation der cytoplasmatischen und nucleären  
Calcium-Konzentration durch den speichergesteuerten  
Calcium-Einstrom in adulten Kardiomyozyten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Julia Madeleine Hermes**

aus **Hamburg**

Marburg an der Lahn, **2022**

Erstgutachter: **Prof Dr. Jens Kockskämper**

Zweitgutachter: **Prof Dr. Moritz Bünemann**

Eingereicht am 15.09.2022

Tag der mündlichen Prüfung am 02.11.2022

Hochschulkenziffer: 1180

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen des Herzens .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Der allgemeine Aufbau und Blutfluss des Herzens .....	6
<b>1.2 Mikroskopischer Aufbau des Herzens .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Das T-tubuläre System von Ventrikelmyozyten.....	8
<b>1.3 Calciumregulierung in Kardiomyozyten .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Das Aktionspotenzial eines Ventrikelmyozyten .....	10
1.3.2 Die elektromechanische Kopplung .....	10
1.3.3 Unterschiede zwischen Vorhof- und Ventrikelmyozyten .....	13
<b>1.4 Grundlagen des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (SOCE) .....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Geschichte des speichergesteuerten Calcium-Einstroms .....	14
1.4.2 Der Mechanismus des speichergesteuerten Calcium-Einstroms .....	15
1.4.3 <i>Stromal interaction molecule</i> (STIM) .....	16
1.4.4 Orai.....	18
1.4.5 <i>Transient receptor potential canonical channels</i> (TRPC-Kanäle).....	19
1.4.6 Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom im Herzen .....	21
<b>1.5 Pathogenese der Hypertrophie.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Die nucleäre Calciumregulation in Ventrikelmyozyten .....	24
1.5.2 Prohypertrophe Signalwege .....	25
1.5.3 Die Rolle des speichergesteuerten Calcium-Einstroms in der Hypertrophie.....	30
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>32</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Versuchstiere .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Zellisolierung.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Die retrograde Herzperfusion an der Langendorff-Apparatur.....	35
2.2.2 Ablauf der Zellisolierung .....	36
<b>2.3 Lösungen .....</b>	<b>38</b>
2.3.1 Tyrode-Lösung .....	38
2.3.2 Lösungen für die Zellisolierung.....	39
2.3.3 Kardioplegielösung .....	40
2.3.4 Kanülierungslösung .....	40
2.3.5 Calcium-freie Lösung.....	40
2.3.6 Enzymlösung .....	41

2.3.7	Stopplösung Ventrikel.....	41
2.3.8	Calcium-Lösungen (1 mM und 1,5 mM).....	42
2.3.9	Stopplösung und Ca-Adaptation Vorhöfe.....	42
2.3.10	Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten.....	43
<b>2.4</b>	<b>Lösungen für die Calciummessungen am LSM 510.....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Messlösung (ML).....	43
2.4.2	Ca-freie Messlösung.....	44
2.4.3	2 mM Ca-Messlösung.....	44
<b>2.5</b>	<b>Pharmakologische und chemische Substanzen.....</b>	<b>45</b>
2.5.1	Thapsigargin.....	45
2.5.2	Verapamil.....	46
2.5.3	KB-R7943.....	47
2.5.4	Koffein.....	48
2.5.5	Formamid.....	49
2.5.6	Pharmakologische SOCE-Inhibitoren.....	50
<b>2.6</b>	<b>Konfokalmikroskopie.....</b>	<b>55</b>
2.6.1	Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.....	55
2.6.2	Fluoreszenzindikatoren.....	57
2.6.3	Beladen der Zellen mit Fluo-4.....	60
2.6.4	Beladen der Zellen mit di-8-ANEPPS.....	60
2.6.5	Calciummessungen am LSM 510.....	61
<b>2.7</b>	<b>Auswertung der Messungen.....</b>	<b>64</b>
2.7.1	Bildbearbeitung.....	65
<b>2.8</b>	<b>Western Blot.....</b>	<b>65</b>
2.8.1	Gewebeisolierung.....	65
2.8.2	Gewebehomogenisierung.....	66
2.8.3	Quantitative Proteinbestimmung.....	68
2.8.4	Probenvorbereitung und Beladung der Geltaschen.....	70
2.8.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	71
2.8.6	Transfer.....	71
2.8.7	Proteindetektion.....	73
2.8.8	Auswertung der Western Blots.....	75
<b>2.9</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung des SOCE in adulten Ventrikelmyozyten.....</b>	<b>77</b>
3.1.1	Die Erhöhung des extrazellulären Ca löst nach Entleerung der Ca-Speicher in Ca-freier Messlösung den SOCE in Ventrikelmyozyten aus.....	77
3.1.2	SR-Ca-Beladung in Ca-freier Messlösung mit Thapsigargin ermittelt durch Koffein.....	81
<b>3.2</b>	<b>Der cytoplasmatische Calcium-Einstrom durch SOCE erhöht das nucleäre Calcium..</b>	<b>83</b>
<b>3.3</b>	<b>SOCE in Ventrikelmyozyten spontan-hypertensiver Ratten (SHR).....</b>	<b>86</b>

3.3.1	Vergleich des SOCE zwischen WKY- und SHR-Ventrikelfmyozyten .....	88
3.3.2	Expression von SOCE-Proteinen in linksventrikulärem Gewebe von WKY und SHR....	89
<b>3.4</b>	<b>Pharmakologische Untersuchung der am SOCE-beteiligten Kanäle.....</b>	<b>91</b>
3.4.1	Gadolinium blockiert den SOCE in Ventrikelfmyozyten.....	91
3.4.2	Orai- und TRPC-Kanäle tragen zum SOCE in Ventrikelfmyozyten bei .....	93
<b>3.5</b>	<b>T-Tubuli werden für die SOCE-Aktivierung in Ventrikelfmyozyten nicht benötigt .....</b>	<b>99</b>
<b>3.6</b>	<b>Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom in Vorhofmyozyten .....</b>	<b>103</b>
3.6.1	Charakterisierung des SOCE in Vorhofmyozyten .....	103
3.6.2	Der SOCE unterscheidet sich in Vorhof- und Ventrikelfmyozyten.....	107
3.6.3	Der SOCE in Vorhofmyozyten wird durch S66, BTP-2 oder SKF gehemmt .....	108
3.6.4	Erhöhte Expression von TRPC1, 3 und 6 sowie von STIM1 in Vorhofmyozyten .....	113
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>115</b>
4.1	Die Erhöhung des extrazellulären Ca löst nach Speicherentleerung den SOCE in adulten Ventrikelfmyozyten aus .....	116
4.1.1	Der nucleäre SOCE ist vom cytoplasmatischen SOCE abhängig.....	119
4.2	Orai- und TRPC-Kanäle tragen zum Ca-Einstrom in Ventrikelfmyozyten bei.....	122
4.3	Die Aktivierung des SOCE benötigt keine T-Tubuli.....	124
4.4	Der SOCE ist in der frühen Hypertrophie in SHR nicht erhöht.....	127
4.5	Der SOCE in Vorhofmyozyten.....	129
4.6	Der SOCE unterscheidet sich zwischen atrialen und ventrikulären Myozyten.....	130
4.7	Hemmung des SOCE in Kardiomyozyten zur Therapie der Herzhypertrophie? .....	132
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick .....	133
<b>5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>153</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>154</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>155</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Atrium
AM	Acetoxymethylester
Amp	Amplitude
AP	Aktionspotenzial
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Klappen	Atrioventrikularklappen
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N, N, N, N' tetraacetat
BCA	Bicinchoninsäure
BDM	2,3-Butandionmonoxim
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
[Ca <sup>2+</sup> ]	Calcium-Konzentration
CAD	<i>CRAC activation domain</i>
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase II
CaN	Calcineurin
CaT	Calciumtransient
CC	<i>Coiled-coil</i> , Proteinstrukturmotiv
CCE	<i>capacitative Ca entry</i> , kapazitativer Ca-Einstrom
CICR	<i>Calcium induced calcium release</i> , Ca-induzierte Ca-Freisetzung
CRAC	<i>Ca release-activated Ca channels</i> , Ca-Freisetzungsaktivierte Ca-Kanäle
CRU	<i>Ca release units</i> , Ca-Freisetzungseinheiten
Cu	Kupfer-Ion
Cyto	Cytoplasma, Cytoplasmatisch
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECC	<i>excitation-contraction coupling</i> , elektromechanische Kopplung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
F	Fluoreszenzintensität

---

F <sub>rest</sub>	Ruhefluoreszenz
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GATA4/6	Transkriptionsfaktor
Gd	Gadolinium
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Hydrochlorid
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IQR	<i>interquartile range</i> , Interquartilsabstand
K	Kalium
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Koff	Koffein
Ktr	Kontrollzelle
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanal
MEF2	Transkriptionsfaktor, <i>myocyte enhancer factor-2</i>
ML	Messlösung
Na	Natrium
NCX	Na-/Ca-Austauscher
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssequenz
Nuc	Nucleus, nucleär
Phe	Phenylephrin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKD	Proteinkinase D
PLB	Phospholamban
PMCA	<i>plasma membrane Ca-ATPase</i> , Plasmamembran Ca-ATPase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROCE	<i>Receptor-operated calcium entry</i> , rezeptorgesteuerter Calcium-Einstrom
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RyR	Ryanodinrezeptor
SAM	<i>sterile alpha motif</i>

SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	<i>Standard error of mean</i> , Standardfehler
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SHR	Spontan-hypertensive Ratten
SOAR	<i>STIM-Orai activating region</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i> , speichergesteuerter Calcium-Einstrom
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TAC	<i>Transverse aortic constriction</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TG	Thapsigargin
TRPC	<i>Transient receptor potential canonical channels</i>
T-Tubuli	transversale Tubuli
V	Ventrikel
Vera	Verapamil
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte
$\Delta F$	Amplitude des Calciumtransienten

## Zusammenfassung

Der speichergesteuerte Calcium (Ca)-Einstrom (SOCE) ist ein Mechanismus, der durch den Füllungszustand intrazellulärer Ca-Speicher (endo-/ sarkoplasmatisches Retikulum, ER/SR) gesteuert wird. Die Entleerung der Speicher führt zur Aktivierung von Ca-permeablen Kanälen in der Plasmamembran (*transient receptor potential canonical* (TRPC-) und Orai-Kanäle) mit anschließendem Ca-Einstrom. Die Aktivierung dieser Kanäle erfolgt durch den Ca-Sensor STIM1, der in der ER-/SR-Membran lokalisiert ist. In elektrisch nicht-erregbaren Zellen ist der SOCE unerlässlich für die Aktivierung Ca-abhängiger Signalwege und die Wiederauffüllung der Ca-Speicher. In Kardiomyozyten werden die SOCE-Proteine zwar exprimiert, ihre Bedeutung und Beteiligung an Ca-abhängigen Signalprozessen werden aber bis heute kontrovers diskutiert. Calcium spielt als Botenstoff eine essentielle Rolle für viele zelluläre Prozesse in Kardiomyozyten, wie z.B. die Kontraktion oder die Regulation des Energiestoffwechsels. Veränderungen der intrazellulären Ca-Konzentrationen können kardiale Umbauprozesse (Remodeling) verursachen. Für die Genexpression im Zellkern ist das Kerncalcium essentiell. Die Erhöhung des Kerncalciums spielt eine entscheidende Rolle in der prohypertrophen Genexpression und trägt damit wesentlich zum kardialen Remodeling bei Herzerkrankungen bei. Die Mechanismen der nucleären Ca-Regulation sind jedoch bis heute nicht ausreichend verstanden. Dem SOCE wird eine Beteiligung am Remodeling und der Pathogenese der Herzhypertrophie zugeschrieben. Dabei ist bislang nicht bekannt, ob der SOCE auch das Kerncalcium regulieren kann.

In dieser Arbeit wurden adulte Rattenkardiomyozyten isoliert und zur funktionellen Charakterisierung des SOCE mit einem Ca-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-4) beladen und mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Das Konfokalmikroskop wurde im Linescan-Modus betrieben, so dass simultane Aufnahmen von cytoplasmatischen und nucleären Bereichen möglich waren. Zunächst wurde ein Messprotokoll für die Aktivierung und Quantifizierung des SOCE etabliert. Zu Beginn dieses Protokolls wurden elektrisch-stimulierte Calciumtransienten (CaT) aufgenommen. Anschließend wurde das SR experimentell mit Thapsigargin (0,5  $\mu\text{M}$ ) und Koffein (20 mM) in einer Ca-freien Messlösung entleert. Dabei waren der L-Typ-Ca-Kanal (LTCC) mit Verapamil (5  $\mu\text{M}$ ) sowie der Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) mit KB-R7943 (10  $\mu\text{M}$ ) blockiert, so dass die Proteine, die zu einem sarkolemmalen Ca-Einstrom in die Zelle führen können, geblockt waren. Nach der Speicherentleerung wurde das extrazelluläre Ca erhöht (auf 2 mM) und eine Ca-Erhöhung in den Kardiomyozyten registriert. Diese Ca-Erhöhung wurde als SOCE definiert. Sie war sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus messbar und wurde durch Gadolinium (1 mM), einem Blocker von Kationenkanälen, nahezu vollständig unterdrückt. Zur Quantifizierung des SOCE

wurden die elektrisch-stimulierten CaT herangezogen und die SOCE-Amplitude auf die CaT-Amplitude normiert. Es bestand eine lineare Korrelation zwischen dem nucleären und dem cytoplasmatischen SOCE, so dass die Erhöhung des cytoplasmatischen Ca durch den SOCE auch zu einer Erhöhung des Kerncalciums durch passive Diffusion des Ca durch die Kernporen führt.

Der Anteil der am SOCE beteiligten Kanäle (TRPC und/ oder Orai) wurde durch den Einsatz verschiedener SOCE-Inhibitoren bestimmt. Dazu wurden die Orai-spezifischen Blocker S66 und BTP-2 und der TRPC-Blocker SKF 96365 eingesetzt. S66 (1  $\mu$ M), BTP-2 (3  $\mu$ M) und SKF 96365 (5  $\mu$ M) blockierten den Ca-Einstrom durch SOCE im Cytoplasma um  $\approx$  25-40 % und im Nucleus um  $\approx$  30-40 %. Die Kombination aus einem Orai-Blocker (S66) mit dem TRPC-Blocker SKF 96365 führte zu einer Reduktion des SOCE im Cytoplasma und Nucleus um  $\approx$  60 %. Durch einen Formamid-induzierten osmotischen Schock wurde das T-tubuläre System der Ventrikelmyozyten zerstört. In den detubulierten Ventrikelmyozyten waren die SOCE-Amplituden im Cytoplasma und Nucleus unverändert. In Ventrikelmyozyten von spontanhypertensiven Ratten (SHR), die sich in einem frühen Stadium der Herzhypertrophie befanden, wurden ähnliche SOCE-Amplituden wie in den Ventrikelmyozyten der normotensiven Kontrollratten (Wistar-Kyoto-Ratte, WKY) ermittelt.

Vorhof- und Ventrikelmyozyten unterscheiden sich funktionell und strukturell voneinander, weshalb der SOCE ebenfalls in Vorhofmyozyten charakterisiert wurde. Auch in diesen Zellen konnte ein robuster SOCE sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus gemessen werden. Zwischen dem cytoplasmatischen und dem nucleären SOCE bestand in den Vorhofmyozyten eine direkte lineare Korrelation. Auch die atriale SOCE-Amplitude wurde durch den Einsatz der verschiedenen pharmakologischen Substanzen (S66, BTP-2, SKF 96365) blockiert. Die cytoplasmatischen SOCE-Amplituden wurden durch die genannten Blocker um  $\approx$  65-80 % reduziert, die nucleären SOCE-Amplituden sanken um  $\approx$  60-75 %. Im Vergleich zu den Ventrikelmyozyten waren die cytoplasmatischen und nucleären SOCE-Amplituden in Vorhofmyozyten etwa doppelt so groß. In Western Blot-Untersuchungen wurden erhöhte Expressionen ( $\approx$  40-260 %) von TRPC1, 3, 6 und STIM1 im Vorhofgewebe gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher mit anschließender Erhöhung des extrazellulären Ca zu einem Ca-Einstrom in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten führt. Dieser Ca-Einstrom ist dem SOCE zuzuordnen und ist sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus quantifizierbar. Der SOCE wird durch TRPC- und Orai-Kanäle getragen, die überwiegend in der Oberflächenmembran lokalisiert sind. Die Erhöhung des nucleären Ca legt eine mögliche Beteiligung des SOCE an der Ca-abhängigen Regulation der Transkription beim kardialen Remodeling nahe.

## Summary

The store-operated calcium (Ca) entry (SOCE) is a mechanism regulated by the filling state of intracellular Ca stores (endo/sarcoplasmic reticulum, ER/SR). Depletion of the stores leads to the activation of Ca-permeable channels located in the plasma membrane (transient receptor potential canonical (TRPC) and Orai channels) with subsequent Ca influx. The activation of these channels is mediated by the Ca sensor STIM1, which is located in the ER/SR membrane. In electrically nonexcitable cells, SOCE is essential for activating Ca-dependent signaling pathways and refilling of intracellular Ca stores. Cardiomyocytes express SOCE proteins, but their relevance and contribution to Ca-dependent signaling pathways remain elusive. Ca is an important second messenger and plays an essential role for many cellular processes in cardiomyocytes, such as contraction or regulation of energy metabolism. Changes in intracellular Ca concentrations can cause cardiac remodeling. Nuclear Ca is essential for gene transcription in the nucleus. Therefore, the increase of nuclear Ca plays an essential role in hypertrophic gene expression and thus contributes to cardiac remodeling. However, the mechanisms of nuclear Ca regulation are not well understood. SOCE is thought to be involved in remodeling and pathogenesis of cardiac hypertrophy. To date, it is not yet known whether SOCE also affects nuclear Ca.

In the present work, adult rat cardiomyocytes were isolated and loaded with a Ca-dependent fluorescent dye (Fluo-4) for functional characterization of SOCE and examined at a confocal microscope. The confocal microscope was used in linescan mode, allowing simultaneous recordings of cytoplasmic and nuclear regions. A protocol for measuring and quantifying SOCE was established first. At the beginning of this protocol, electrically stimulated Ca transients (CaTs) were recorded. Subsequently, the SR was depleted with thapsigargin (0.5  $\mu\text{M}$ ) and caffeine (20 mM) in a Ca-free solution. During this procedure, L-type Ca channels (LTCC) were blocked with verapamil (5  $\mu\text{M}$ ) and the sodium-calcium exchanger (NCX) was blocked with KB-R7943 (10  $\mu\text{M}$ ), thus the proteins that may lead to sarcolemmal Ca influx into the cell were blocked. After store depletion, extracellular Ca was increased and a Ca increase into the cells was recorded. This Ca increase was assessed as SOCE. It could be quantified in both, cytoplasm and nucleus and was blocked by the cation channel blocker gadolinium (1 mM). Electrically stimulated CaTs were used to quantify SOCE such that SOCE amplitude was normalized to CaT amplitude. There was a linear correlation between nuclear and cytoplasmic SOCE, thus the increase of cytoplasmic Ca by SOCE also leads to an increase of nuclear Ca by passive diffusion of Ca through the nuclear pores.

The impact of channels contributing to SOCE (TRPC and/or Orai) was studied by using different SOCE inhibitors. For this purpose, the Orai channel inhibitors S66 and BTP-2 and the

TRPC channel blocker SKF 96365 were used. S66 (1  $\mu$ M), BTP-2 (3  $\mu$ M) and SKF 96365 (5  $\mu$ M) blocked the Ca influx in the cytoplasm by  $\approx$  25-40 % and in the nucleus by  $\approx$  30-40 %. The combination of an Orai channel blocker (S66) with the TRPC channel blocker SKF 96365 led to a reduction of SOCE in the cytoplasm and nucleus by  $\approx$  60 %. Formamide-induced osmotic shock diminished the T-tubular system of ventricular myocytes. In detubulated ventricular myocytes, SOCE amplitudes in the cytoplasm and nucleus were unchanged. In ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats (SHR) at an early stage of cardiac hypertrophy, SOCE amplitudes were similar to those in ventricular myocytes from normotensive control rats (Wistar-Kyoto-rats, WKY).

Atrial and ventricular myocytes show functional and structural differences. Therefore, SOCE was also characterized in atrial myocytes. In these cells, a robust SOCE was also determined in both, the cytoplasm and the nucleus. There was a direct linear correlation between the cytoplasmic and nuclear SOCE in atrial myocytes. Atrial SOCE amplitude was also blocked by the use of pharmacological inhibitors (S66, BTP-2, SKF 96365). Cytoplasmic SOCE amplitudes were reduced by  $\approx$  65-80 % by the mentioned blockers, nuclear SOCE amplitudes were decreased by  $\approx$  60-75 %. Cytoplasmic and nuclear SOCE amplitudes were about twice as large in atrial myocytes compared to ventricular myocytes. Western blot studies revealed increased expressions of TRPC1, 3, 6 and STIM1 ( $\approx$  40-260%) in the atrial tissue.

The results of this work demonstrate that SOCE in atrial and ventricular cardiomyocytes leads to an increase of cytoplasmic and nuclear Ca. Both, TRPC and Orai channels contribute to the cytosolic and nuclear Ca increase and these channels are predominantly localized in the surface membrane. The increase in nuclear Ca suggests a potential contribution of SOCE to Ca-dependent regulation of transcription during cardiac remodeling.

# 1 Einleitung

Das Herz – der Motor des Lebens – schlägt etwa 100.000-mal am Tag und versorgt durch seine Pumpleistung alle Organe und Gewebe des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dabei laufen fein aufeinander abgestimmte Mechanismen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene im Herzen ab, um die stetige Pumpleistung zu garantieren.

Auf mikroskopischer Ebene steuern Kardiomyozyten einen Mechanismus, der das Herz zum Schlagen bringt. Dieser Mechanismus, der als elektromechanische Kopplung bezeichnet wird, ist auf zellulärer Ebene bereits gut erforscht. Trotz des umfangreich vorhandenen Wissens fasziniert die Herzphysiologie weiterhin viele Naturwissenschaftler auf der ganzen Welt. In den letzten Jahrzehnten wurden Proteine in Herzmuskelzellen entdeckt, die vorher nur aus elektrisch nicht-erregbaren Zellen bekannt waren und deren Funktion im Herzen bis heute nicht ausreichend verstanden ist.

Die Proteine sind Teil eines Mechanismus, bei dem nach Entleerung von intrazellulären Calcium (Ca)-Speichern ein Ca-Einstrom durch die Plasmamembran erfolgt. Dieser Prozess wird speichergesteuerter Calcium-Einstrom (*store-operated calcium entry*, SOCE) genannt.

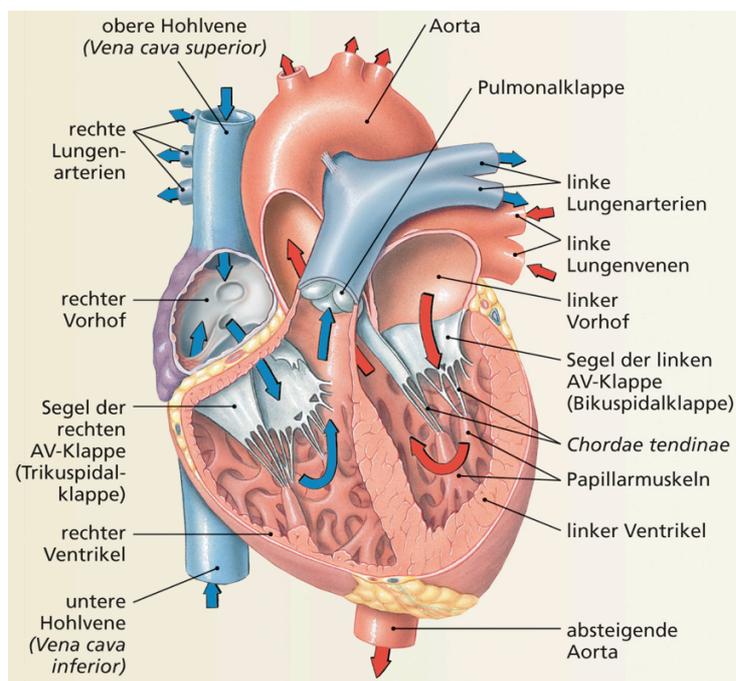
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den speichergesteuerten Calcium-Einstrom in adulten Vorhof- und Ventrikelmyozyten von Ratten (*Rattus norvegicus*) zu charakterisieren. Im Folgenden wird dieser Mechanismus vorgestellt, dabei wird zuvor die Herzanatomie und-physiologie mit dem Schwerpunkt auf der elektromechanischen Kopplung erläutert. Des Weiteren wird die Pathogenese der Herzhypertrophie erläutert, bevor im letzten Teil der Einleitung die Rolle des SOCE in der Herzhypertrophie beleuchtet wird.

## 1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen des Herzens

### 1.1.1 Der allgemeine Aufbau und Blutfluss des Herzens

Das Herz ist ein Hohlmuskel, der topographisch im Thorax zwischen den beiden Lungenflügeln etwas nach links versetzt liegt und mit Blut gefüllt ist. Die Kontraktion des Herzens sorgt dafür, dass sauerstoffreiches Blut durch den Körper gepumpt wird und alle Organe mit Sauerstoff versorgt werden. Das Herz eines gesunden Menschen ist dabei etwa faustgroß und wiegt etwa 250-350 g. Es ist vom Herzbeutel (Perikard) umgeben, der durch Bindegewebe mit dem Zwerchfell verwachsen ist. Gleichzeitig ist das Perikard an der Rückseite des Brustbeins befestigt, so dass das Herz über das Perikard seinen Platz im Thorax beibehält. Das Herz gliedert sich funktionell in ein linkes und ein rechtes Herz, das jeweils aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel) besteht (Abb. 1-1). Der rechte und der linke Vorhof sowie der rechte und der linke Ventrikel sind jeweils durch die Herzscheidewand (Septum) voneinander getrennt. Die Vorhöfe sind von den Ventrikeln durch die Atrioventrikularklappen (AV-Klappen) getrennt, die in einer Ebene liegen. In der gleichen Ebene befinden sich auch die Taschenklappen (Pulmonalklappe und Aortenklappe), die zu den großen Gefäßen, der Aorta und der Pulmonalarterie, führen. Diese Ebene wird daher auch Klappenebene oder Ventilebene genannt und stellt eine bindegewebig versteifte Platte dar. Diese bindegewebige Trennschicht zwischen Vorhof- und Ventrikelmyokard wird auch als Herzskelett bezeichnet und sorgt für die Stabilisierung der Ventilebene. Die Herzklappen gewährleisten den gerichteten Blutfluss im Herzen und in die großen Gefäße. Die AV-Klappen sind an muskulären Strukturen innerhalb der Ventrikel aufgehängt, den sogenannten Papillarmuskeln, die über Sehnenfäden mit den Klappen verbunden sind. Dadurch wird während der Kontraktion der Ventrikel verhindert, dass die Klappen in die Vorhöfe umschlagen und das Blut zurück in die Vorhöfe fließen kann. Die Muskelwände der einzelnen Herzbinnenräume sind unterschiedlich dick, was auf die unterschiedlichen Funktionen zurückzuführen ist. Die Vorhöfe nehmen das Blut aus den Hohlvenen oder den Lungenvenen auf und leiten es in die Ventrikel weiter, während die Ventrikel das Blut in die folgenden Gefäße auswerfen. Dadurch sind die Atria und die Ventrikel unterschiedlich hohen Drücken ausgesetzt. Der linke Ventrikel verfügt über die dickste Wand ( $\approx 8-11$  mm), da hier die größten Drücke entstehen und dieser beim Pumpen des Blutes in den Körperkreislauf die meiste Kraft aufbringen muss. Im Gegensatz dazu ist die Wand der Vorhöfe lediglich  $\approx 1,5$  mm dick. Die physiologische Fließrichtung (Abb. 1-1) des Blutes beginnt im Herzen mit dem Eintritt der oberen (*Vena cava superior*) und unteren Hohlvene (*Vena cava inferior*) in den rechten Vorhof. Hierüber gelangt sauerstoffarmes Blut aus dem Körperkreislauf zum Herzen. Über die Trikuspidalklappe fließt das Blut weiter in den rechten Ventrikel und durch die Kontraktion des Ventrikels strömt es durch die Pulmonalklappe in den *Truncus pulmonalis*, der sich in die beiden Lungenarterien (*Arteriae pulmonales dextra*

*et sinistra*) aufteilt, die das Blut in den rechten und linken Lungenflügel führen. Das Blut gelangt damit in den Lungenkreislauf und wird dort mit Sauerstoff aus der Atemluft angereichert. Das sauerstoffreiche Blut strömt anschließend über die vier Lungenvenen (*Venae pulmonales*) zurück zum Herzen in den linken Vorhof. Durch die Mitralklappe, auch Bikuspidalklappe genannt, strömt das Blut danach in den linken Ventrikel und gelangt von dort über die Aortenklappe in die Aorta und damit zurück in den Körperkreislauf (Abb. 1-1). Das Herz selbst wird durch die Koronararterien mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Durch die Koronarvenen gelangt das venöse Blut des Herzens im Wesentlichen in den rechten Vorhof (Aumüller et al., 2020; Silverthorn, 2009). Die Phasen der Herzaktion werden als Systole und Diastole bezeichnet. Die Systole bezeichnet die Kontraktionsphase der Ventrikel, in der das Blut in die Pulmonalarterien oder in die Aorta gepumpt wird. Während der Diastole (Erschlaffungsphase) erschlaffen die Ventrikel und füllen sich mit Blut für die nächste Systole (Brandes et al., 2019).



**Abbildung 1-1 Makroskopischer Aufbau und Blutfluss des Herzens**

Schematische Darstellung eines geöffneten Herzens mit den vier Binnenräumen. Blaue Pfeile zeigen den Blutfluss des sauerstoffarmen Blutes, rote Pfeile den des mit Sauerstoff angereicherten Blutes.

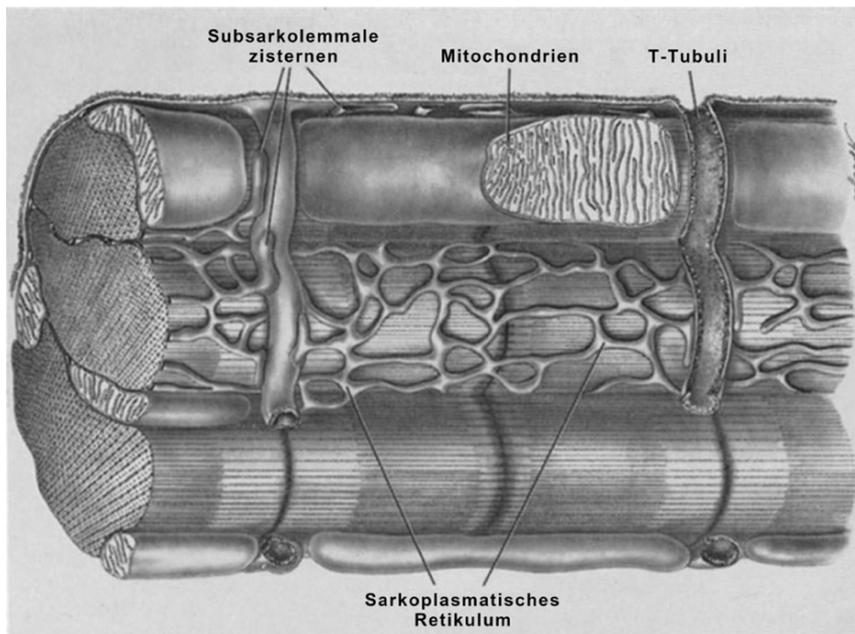
(Abbildung modifiziert nach (Silverthorn, 2009)– Physiologie 4. Auflage, Pearson 2009)

## 1.2 Mikroskopischer Aufbau des Herzens

Die Herzwand zeigt auf mikroskopischer Ebene einen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus Endokard, Myokard und Epikard. Das einschichtige Endokard überzieht den gesamten Innenraum des Herzens. Das Epikard bedeckt von außen die Herzoberfläche und besteht aus einem einschichtigen Epithel und einer dünnen Bindegewebsmembran. Die zwischen Endo- und Epikard liegende Muskelschicht des Herzens, das Myokard, besteht aus den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) und zählt ähnlich wie die Skelettmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Die einzelnen Kardiomyozyten sind im Myokard über Glanzstreifen miteinander verbunden. Über die Myofilamente sorgen sie für die rhythmische Kontraktion des Herzens (Aumüller et al., 2020; Mutschler et al., 2013). Insgesamt sind Kardiomyozyten sehr große Zellen mit einer Länge von  $> 100 \mu\text{m}$  (Satoh et al., 1996). Man unterscheidet verschiedene Zelltypen innerhalb des Myokards (Vorhof- und Ventrikelmyozyten), auf die in Kapitel 1.3.3 näher eingegangen wird.

### 1.2.1 Das T-tubuläre System von Ventrikelmyozyten

Die Transversaltubuli (T-Tubuli) bilden tiefe Einstülpungen der Oberflächenmembran (Sarkolemm) eines Ventrikelmyozyten, die alle  $\approx 2 \mu\text{m}$  auftreten und tief in die Zelle hineinragen (Abb. 1-2). T-Tubuli stellen ein regelmäßiges Membransystem und komplexes Netzwerk dar (Jayasinghe et al., 2009; Soeller & Cannell, 1999). Sie verlaufen orthogonal zur Faserrichtung der Myozyten, wodurch sie ihren Namen erhalten haben. Des Weiteren verfügt das System über axiale Komponenten, die nicht unmittelbar mit der Oberflächenmembran verbunden sind (Soeller & Cannell, 1999). In den T-Tubuli sind wichtige Komponenten der elektromechanischen Kopplung (vgl. Kapitel 1.3.2), wie die L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCC) oder die Natrium-Calcium-Austauscher (*Na-Ca exchanger*, NCX), lokalisiert (Scriven et al., 2000). Die T-Tubuli reichen unmittelbar an das dichte Netzwerk des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) heran, so dass ein Aktionspotenzial (AP) schnell und tief in die Zelle geleitet werden kann, wo es durch die kurze Distanz zum SR zu einer gleichzeitigen (homogenen) Freisetzung von SR-Calcium in der gesamten Zelle kommt (Smyrniak et al., 2010).



**Abbildung 1-2 Mikroskopischer Aufbau einer Herzmuskelzelle**

Schematische Darstellung einer Säugetier-Herzmuskelzelle mit den T-Tubuli, die tief in die Zelle ragen, den Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum.

(Abbildung modifiziert nach (Fawcett & McNutt, 1969))

### 1.3 Calciumregulierung in Kardiomyozyten

Die elektromechanische Kopplung (*excitation-contraction coupling*, ECC) bezeichnet den Zusammenhang zwischen der elektrischen Erregung einer Muskelzelle und der darauffolgenden mechanischen Kontraktion. Die zur Kontraktion erforderlichen Aktionspotenziale werden in sogenannten Schrittmacherzellen gebildet und von dort bis zum Arbeitsmyokard weitergeleitet. Entscheidend für die Kontraktion der Herzmuskelzellen ist die vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration, die als Calciumtransient (CaT) bezeichnet wird. Die cytosolischen Ca-Konzentrationen liegen bei einem Ventrikelmyozyten dabei in einem Bereich zwischen  $\approx 100$  nM in der Diastole und  $\approx 1$   $\mu$ M während der Systole (Kockskämper, 2016).

### 1.3.1 Das Aktionspotenzial eines Ventrikelmyozyten

Das Aktionspotenzial entsteht im Sinusknoten, dem primären Schrittmacher des Herzens, und breitet sich über die Vorhöfe, den AV-Knoten, das His-Bündel, die Kammerchen und Purkinje-Fäden bis ins Arbeitsmyokard der Ventrikel aus (Brandes et al., 2019).

Ventrikelmyozyten besitzen ein langes Aktionspotenzial mit einer Dauer von etwa 200-400 ms (Nerbonne & Kass, 2005). Das Aktionspotenzial wird in fünf Phasen (0-4) unterteilt, wobei die Phase 4 das Ruhemembranpotenzial darstellt. Dieses ist in Ventrikelmyozyten stabil bei -85 mV nahe dem Kaliumgleichgewichtspotenzial ( $E_K$ , -90 mV) und wird erst bei elektrischer Erregung durch eine depolarisierende Nachbarzelle über das Schwellenpotenzial von etwa -60 mV angehoben. Durch die Änderung des Membranpotenzials öffnen sich schlagartig spannungsabhängige Natrium (Na)-Kanäle, wodurch ein schneller, starker Na-Einstrom ( $I_{Na}$ ) generiert wird und es dadurch zum steilen Aufstrich im Aktionspotenzial mit einer initialen Spitze kommt (Phase 0). Hierbei steigt das Membranpotenzial auf +30 mV an. Die Na-Kanäle inaktivieren sehr schnell wieder (<1-2 ms) und es kommt zur partiellen Repolarisation (Phase 1), die zusätzlich durch einen transienten Kalium (K)-Ausstrom ( $I_{to}$ ) getragen ist. Das Membranpotenzial fällt während der partiellen Repolarisation auf etwa +10 mV ab. Die Na-Kanäle sind daraufhin im inaktivierten Zustand.

Ab einem Membranpotenzial von -40 mV (während der Depolarisation) öffnen spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ (LTCC,  $Ca_v1.2$ ), wodurch es in der folgenden Plateau-Phase (Phase 2) zu einem Ca-Einstrom in die Zelle kommt. Diese Kanäle werden nur langsam inaktiviert, weshalb sie nach Aktivierung lange geöffnet bleiben. Das Plateau basiert auf dem Gleichgewicht zwischen dem langsamen Ca-Einstrom und den repolarisierenden K-Strömen mit unterschiedlichen Kinetiken. Das Membranpotenzial liegt hierbei konstant bei etwa 0 mV. Mit der Inaktivierung der LTCC beginnt die Repolarisation (Phase 3), in der schließlich etwas verzögert unterschiedliche K-Kanäle aktiviert werden, die einen vermehrten K-Ausstrom ( $I_K$ ) zur Folge haben. Das Membranpotenzial sinkt, wodurch das Ruhemembranpotenzial (Phase 4) wieder hergestellt wird (Brandes et al., 2019; Kockskämper, 2016).

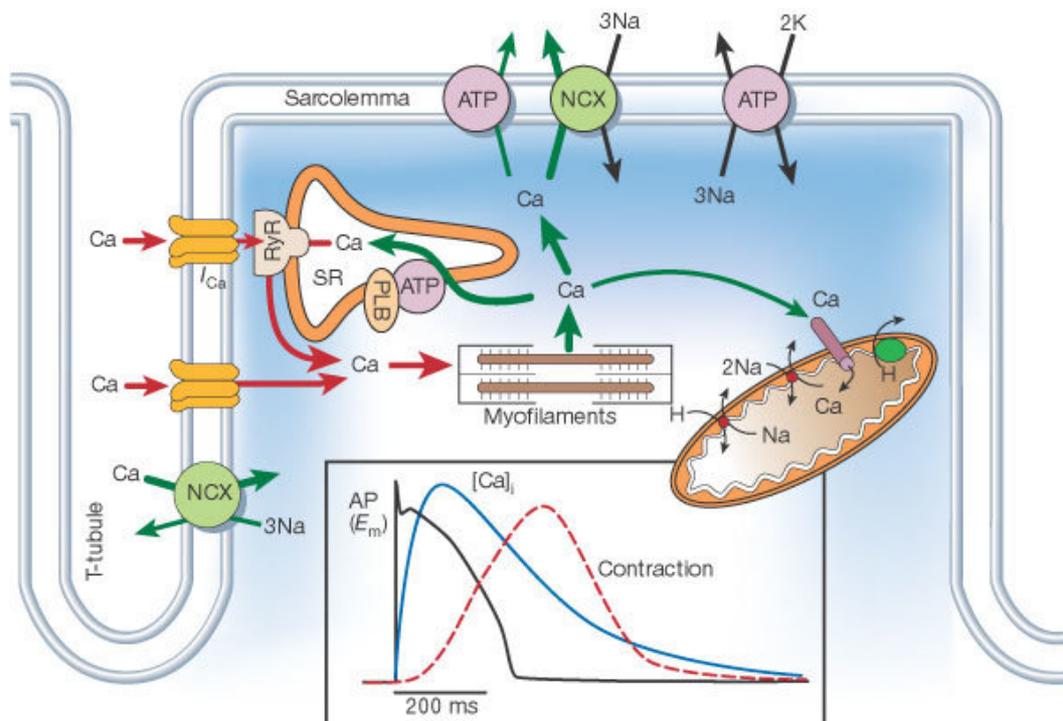
### 1.3.2 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung beginnt während der Depolarisation des Aktionspotenzials, wenn membranständige spannungsabhängige Ca-Kanäle vom L-Typ (LTCC,  $Ca_v1.2$ ) öffnen. Diese befinden sich überwiegend in den T-Tubuli, sind aber auch in der Oberflächenmembran der Zelle lokalisiert. Aus dem Öffnen der Kanäle resultiert ein sarkolemmaler Ca-Einstrom ( $I_{Ca,L}$ ), der den wesentlichen Anteil des Ca-Einstroms von extrazellulär darstellt und in einem begrenzten Bereich zwischen der Plasmamembran und dem sarkoplasmatischen Retikulum,

der als Dyade oder als *junctional cleft* bezeichnet wird, erfolgt (Fearnley et al., 2011). In der Dyade stehen sich LTCC und das SR der Zelle unmittelbar gegenüber ( $\approx 12\text{-}15\text{ nm}$ ), so dass es in diesem Bereich zu einer schnellen Erhöhung der Ca-Konzentration von etwa  $100\text{ nM}$  auf etwa  $10\text{ }\mu\text{M}$  kommt (Bers, 2008; Scriven et al., 2013). Etwa 10-25 LTCC und 100-200 Ryanodinrezeptoren (RyR, kardiale Isoform RyR2), die in der Membran des SR lokalisiert sind, sind in der Dyade in Clustern angeordnet und werden als *Couplon* oder Ca-Signalkomplex bezeichnet. Der Ca-Einstrom durch die LTCC führt zur Freisetzung von Ca-Ionen aus dem SR durch die Aktivierung der Typ 2-Ryanodin-Rezeptoren (Abb. 1-3). Dieser Schritt wird Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung (*calcium-induced calcium release*, CICR) genannt und ist charakteristisch für Kardiomyozyten (Fabiato & Fabiato, 1975; Kockskämper, 2016). Der RyR2 ist ein ligandengesteuerter Calciumfreisetzungskanal. Der Name beruht auf dem Ryanodin, einem Diterpenderivat aus *Ryania speciosa*, das als Ligand am RyR wirkt und für den Menschen bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch ist (Hänsel & Sticher, 2010). Ein weiterer pharmakologischer Ligand am RyR ist das Koffein, das in Experimenten häufig zur Entleerung der intrazellulären Speicher eingesetzt wird (Kong et al., 2008). Der durch die CICR induzierte systolische Ca-Anstieg aktiviert die Myofilamente und damit den Querbrückenzyklus und bewirkt schließlich die Kontraktion der Zelle (Abb. 1-3). Die Entfernung von Ca aus dem Cytoplasma führt zu einem diastolischen Ca-Konzentrationsabfall, um die Relaxation einzuleiten. Der Ca-Abfall wird durch mehrere Mechanismen vermittelt, von denen die beiden wichtigsten die Ca-Wiederaufnahme in das SR über die SR-Ca-ATPase (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum ATPase*, SERCA) und die Ca-Entfernung aus der Zelle über den sarkolemmalen Na-Ca-Austauscher (NCX) sind (Bers, 2002).

Der NCX (kardiale Isoform NCX1) ist ein elektrogenes Austauscherprotein, das drei Natrium-Ionen im Austausch gegen ein Calcium-Ion in die Zelle einschleust, womit eine positive Ladung in die Zelle verschoben wird ( $I_{\text{NCX}}$ ). Der Na-Gradient wird dabei als treibende Kraft genutzt. Der  $I_{\text{NCX}}$  ist umkehrbar, das bedeutet, dass der NCX sowohl Na einschleusen und Ca ausschleusen (Vorwärtsmodus) kann, als auch in entgegengesetzter Richtung, im sogenannten Rückwärtsmodus (Ca-Einstrom, Na-Ausstrom), arbeiten kann (Bers, 2002). Die Richtung ist dabei abhängig von den intra- und extrazellulären Ca- und Na-Konzentrationen sowie vom Membranpotenzial. Der Vorwärtsmodus (Na-Einstrom, Ca-Ausstrom) des NCX wird kurz nach dem Aufstrich des Aktionspotenzials mit dem systolischen Ca-Anstieg aktiviert und bleibt für den Rest des CaT aktiv (Bers, 2002). Der Rückwärtsmodus tritt unter physiologischen Bedingungen nur für wenige Millisekunden während des schnellen Aufstrichs zu Beginn eines AP bei einem Membranpotenzial von  $+40\text{ mV}$  auf (Bers, 2002). Wird jedoch der  $I_{\text{Ca,L}}$  durch die LTCC aktiviert und die SR-Ca-Freisetzung setzt ein, treten hohe Ca-Konzentrationen auf, so dass bevorzugt der Vorwärtsmodus aktiviert und Ca durch den NCX ausgeschleust wird.

Die SERCA (kardiale Isoform 2a) vermittelt ATP-abhängig die Wiederaufnahme von Ca aus dem Cytosol ins SR und wird von einem kleinen Protein, dem Phospholamban (PLB), reguliert. Im dephosphorylierten Zustand inhibiert PLB die SERCA-Aktivität. Die Phosphorylierung wird von verschiedenen Kinasen vermittelt und hebt die Hemmung auf, wobei das PLB von der SERCA abdissoziiert (James et al., 1989; Kockskämper, 2016). SERCA2a und PLB sind entscheidende Regulatoren der diastolischen sowie der systolischen Herzfunktion. Die SERCA ist zum einen für den cytosolischen Ca-Abfall und dem damit verbundenen Abklingen des CaT verantwortlich und zum anderen reguliert sie den SR-Ca-Gehalt und beeinflusst damit, wie viel Ca bei der nächsten Kontraktion aus dem SR freigesetzt wird (Kockskämper, 2016). Neben diesen genannten Mechanismen, die für eine Abnahme der cytosolischen Ca-Konzentration sorgen, gibt es andere, langsamere Systeme, wie den mitochondrialen Ca-Uniporter oder die sarkolemmale Ca-ATPase (*plasma membrane Ca-ATPase*, PMCA). Über diese Systeme wird das übrige Ca aus der Zelle transportiert. In Ventrikeldmyozyten der Ratte werden etwa 92 % des cytosolischen Ca von der SERCA, etwa 7 % vom NCX und etwa 1 % durch die langsamen Systeme entfernt (Bers, 2002).



**Abbildung 1-3 Elektromechanische Kopplung eines Ventrikeldmyozyten**

Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung eines Ventrikeldmyozyten mit den beteiligten Proteinen; außerdem dargestellt ist der Zeitverlauf eines Aktionspotenzials, eines Calciumtransienten und der resultierenden Kontraktion. Details und Abkürzungen sind im Text erläutert.

(Abbildung übernommen aus (Bers, 2002))

### 1.3.3 Unterschiede zwischen Vorhof- und Ventrikelmyozyten

Das Herz besteht aus vier Kammern, den zwei Vorhöfen und den zwei Ventrikeln. Diese haben jeweils unterschiedliche Aufgaben, weshalb sich die Zellen des Vorhof- und Ventrikelmyokards strukturell und funktionell voneinander unterscheiden. Sowohl Ventrikel- als auch Vorhofmyozyten sind quergestreifte Muskelzellen. Vorhofmyozyten sind in der Regel kleiner ( $\leq 100 \mu\text{m}$ ) und schmaler als Ventrikelmyozyten. Ventrikelmyozyten haben eine eher rechteckige Form mit zwei Zellkernen, wohingegen atriale Myozyten eher schlank und spindelförmig sind und meistens nur einen zentralen Zellkern besitzen (Brandenburg, Arakel, et al., 2016; Kockskämper, 2016; Satoh et al., 1996; Walden et al., 2009).

Das Aktionspotenzial eines Vorhofmyozyten unterscheidet sich in Form und Dauer von dem eines Ventrikelmyozyten. Das Ruhemembranpotenzial (Phase 4) liegt bei atrialen Myozyten stabil bei etwa  $-80 \text{ mV}$ . Die initiale Depolarisation (Phase 0) und die partielle Repolarisation (Phase 1) ähneln den Phasen der Ventrikelmyozyten. Atriale Myozyten weisen jedoch eine weniger ausgeprägte Plateauphase (Phase 2) auf. Die darauffolgende Repolarisation (Phase 3) ist bei Vorhofmyozyten weniger steil und langsamer. Dadurch sind atriale Aktionspotenziale in der Regel kürzer als die der Ventrikelmyozyten (Kockskämper, 2016; Nerbonne & Kass, 2005).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Vorhof- und Ventrikelmyozyten besteht darin, dass Vorhofmyozyten kein regelmäßiges T-tubuläres System besitzen (Blatter et al., 2003; Bootman et al., 2006), während Ventrikelmyozyten ein ausgeprägtes, charakteristisches T-tubuläres System aufweisen. Daraus ergeben sich Unterschiede hinsichtlich der elektromechanischen Kopplung zwischen atrialen und ventrikulären Myozyten. Die LTCC befinden sich bei Ventrikelmyozyten überwiegend in den T-Tubuli in unmittelbarer Nähe zu den RyR2 (Scriven et al., 2000). Dadurch erfolgt die Ca-Freisetzung aus dem SR in Ventrikelmyozyten gleichzeitig, was einen homogenen Ca-Anstieg zur Folge hat (Smyrniak et al., 2010). In Vorhofmyozyten fehlt das dichte T-tubuläre Netzwerk. Die CICR findet in Vorhofmyozyten nahe der Oberflächenmembran in sogenannten Ca-Freisetzungseinheiten (*Ca release units*, CRU) statt, in der sich etwa sechs LTCC und 50 RyR2 gegenüberstehen, vergleichbar mit den Dyaden in Ventrikelmyozyten (Brandenburg, Kohl, et al., 2016; Hohendanner et al., 2015). Der atriale Calciumtransient beginnt mit der Ca-Freisetzung in den CRU nahe der Oberflächenmembran und breitet sich dann über die gesamte Vorhofzelle aus. Bei elektrischer Erregung werden zunächst durch den Ca-Einstrom, vermittelt durch die LTCC, nur die RyR aktiviert, die sich auf dem SR in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran befinden (junktionale RyR). Die Ca-Welle propagiert anschließend weiter innerhalb des Vorhofmyozyten über nicht-junktionale RyR, denen keine LTCC unmittelbar gegenüber liegen (Kockskämper et al., 2001). Diese befinden sich in den zentralen Bereichen der Zelle und sind nicht mit der

Oberflächenmembran verbunden. Die Ca-Ausbreitung erfolgt demnach zuerst subsarkolemmal ehe sie das Zentrum des Vorhofmyozyten erreicht. Daraus resultiert eine heterogenere Ausbreitung des Ca-Signals in Vorhofmyozyten. Diese kann durch transversale Linescan-Messungen am Konfokalmikroskop in einem U-förmigen Calciumtransienten abgebildet werden (Blatter et al., 2003; Bootman et al., 2011; Hohendanner et al., 2015; Hüser et al., 1996). Neuere Studien beschrieben, dass Vorhofmyozyten über axiale Tubuli verfügen. Diese sind mit der Oberflächenmembran durch wenige transversale Tubuli verbunden. Über dieses System ist auch in Vorhofmyozyten eine schnelle Ausbreitung von Ca-Signalen innerhalb der Zelle möglich (Brandenburg, Kohl, et al., 2016).

## 1.4 Grundlagen des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (SOCE)

### 1.4.1 Geschichte des speichergesteuerten Calcium-Einstroms

Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom (*store-operated calcium entry*, SOCE) ist ein Prozess, der erstmals 1977 von Putney beschrieben wurde. In diesem Prozess führt die Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern (endo- oder sarkoplasmatisches Retikulum, ER/SR) zu einem Ca-Einstrom von extrazellulär über die Plasmamembran (Putney, 1986). Putney entdeckte, dass in Azinuszellen der Ohrspeicheldrüse der Ca-Freisetzung aus intrazellulären Speichern ein Ca-Einstrom durch die Plasmamembran folgte. Zunächst wurde angenommen, dass dieser Ca-Einstrom zum Auffüllen der intrazellulären Ca-Speicher erforderlich war. Der kausale Zusammenhang zwischen diesen beiden Ca-Quellen wurde jedoch erst knapp 10 Jahre später, im Jahr 1986, mit der Formulierung des kapazitiven Ca-Einstrom-Modells (*capacitative Ca entry*, CCE) definiert (Collins et al., 2013; Putney, 1986). In dem Modell wurde beschrieben, dass die Ca-Freisetzung aus intrazellulären Speichern den extrazellulären Ca-Einstrom über die Plasmamembran aktiviert, um die geleerten Speicher wie einen Kondensator direkt aufzufüllen, da man davon ausging, dass die Speicher mit der Plasmamembran in direktem Kontakt zueinanderstehen (Parekh & Penner, 1997). Waren die Speicher voll, kam es zu keiner Aktivierung der Plasmamembran-Kanäle und damit zu keinem Ca-Einstrom von extrazellulär in die Zelle. Erst bei der Entleerung der Speicher folgte der Ca-Eintritt (Parekh & Putney, 2005). In den folgenden Jahren zeigten Studien schließlich, dass der Einstrom von extrazellulärem Ca zunächst in das Cytosol und nicht direkt in die intrazellulären Ca-Speicher erfolgte, woraufhin Putney im Jahr 1990 sein Modell weiterentwickelte und demonstrierte, dass die Entleerung der Ca-Speicher einen Ca-Einstrom zunächst in das Cytosol durch Ca-Kanäle in der Plasmamembran aktivierte (Collins et al., 2013; Putney, 1990). Dieser Prozess ist heute als speichergesteuerter Calcium-Einstrom (SOCE) bekannt.

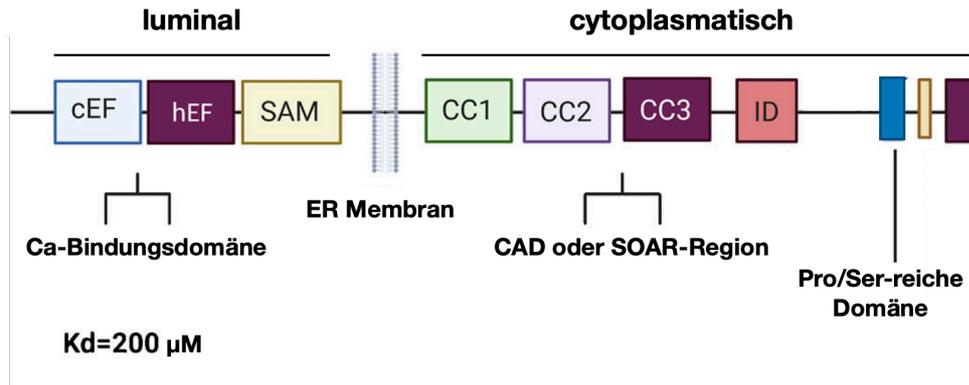
Im Jahr 1992 zeichneten Hoth und Penner mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik erstmals einen Strom in Mastzellen auf, der durch die Entleerung der Ca-Speicher verursacht wurde und dem SOCE zugeordnet wurde. Dieser Strom war Ca-selektiv und nicht durch eine Änderung des Membranpotenzials aktivierbar. Er wird als  $I_{CRAC}$  (*calcium release-activated calcium current*) bezeichnet (Hoth & Penner, 1993). Die molekularen Mechanismen und beteiligten Proteine, die aufgrund der Speicherentleerung zum Ca-Einstrom durch die Plasmamembran führten, waren fast zwei Jahrzehnte lang Gegenstand intensiver Forschung, bis im Jahr 2005 durch ein groß angelegtes RNA-Screening die beteiligten Proteine STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) als Ca-Sensor des ER/SR (Roos et al., 2005) und ein weiteres Jahr später Orai als porenbildende Untereinheit der  $I_{CRAC}$ /SOCE-Kanäle identifiziert wurden (Collins et al., 2013; Prakriya et al., 2006; Vig, Beck, et al., 2006). Durch weitergehende Untersuchungen sind heute neben den Orai-Kanälen auch TRPC-Kanäle (*transient receptor potential canonical*) als weitere Kanäle beschrieben worden, die zum Ca-Einstrom über die Plasmamembran nach Speicherentleerung beitragen (Venkatachalam & Montell, 2007). Es folgten weitere Untersuchungen, die weitere Details zum Mechanismus des SOCE aufdeckten (Hogan & Rao, 2015; Prakriya, 2009).

#### 1.4.2 Der Mechanismus des speichergesteuerten Calcium-Einstroms

Für den SOCE sind im Wesentlichen zwei molekulare Komponenten erforderlich; zum einen ein Ca-Sensor, der den ER/SR-Ca-Gehalt misst, und zum anderen Plasmamembrankanäle, die den Ca-Einstrom von extrazellulär ins Cytoplasma generieren. Als Ca-Sensor fungiert das wichtige Schlüsselprotein STIM, das in der ER/SR-Membran lokalisiert ist (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Sind die intrazellulären Speicher (ER/SR) mit Ca gefüllt, liegt STIM als Monomer vor. Das heißt, dass einzelne STIM-Moleküle verteilt in der ER/SR-Membran lokalisiert sind und über eine sogenannte EF-Hand mit SAM-Domäne Ca binden können. Kommt es zu einer Ca-Entleerung des ER/SR, führt dies zu einer Konformationsänderung von STIM, wobei sich STIM-Homooligomere bilden (S. L. Zhang et al., 2005). Die STIM-Homooligomere bilden sogenannte *Punctae*, bewegen sich zur Plasmamembran und aktivieren dort die Plasmamembrankanäle. Dabei werden auch die Plasmamembrankanäle zu den *Punctae* rekrutiert (Liou et al., 2007). Zu diesen Plasmamembranproteinen, die für den Ca-Einstrom nach ER/SR-Entleerung verantwortlich sind, zählen Orai- und TRPC-Kanäle. TRPC-Kanäle sind unspezifische Kationenkanäle, während Orai ein Ca-selektiver Kanal ist. Durch die Aktivierung über STIM strömt Ca schließlich durch diese Kanäle in die Zelle, wodurch es zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Ca-Konzentration kommt.

### 1.4.3 *Stromal interaction molecule* (STIM)

STIM ist das Schlüsselprotein des SOCE. Es handelt sich um ein *single-pass*-Transmembranprotein, das in der ER/SR-Membran lokalisiert ist und empfindlich auf Veränderungen der Ca-Konzentration im ER/SR reagiert. Über das Transmembran (TM)-Segment ist STIM in der ER/SR-Membran verankert. Die N-terminale Domäne befindet sich auf der luminalen Seite, während der C-Terminus in das Cytoplasma ragt und aus drei *coiled-coil*-Regionen (CC1-CC3) sowie einer Prolin-/Serin-reichen und einer Lysin-reichen Region besteht (Abb. 1-4) (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Rosenberg et al., 2021; S. L. Zhang et al., 2005). Die luminal Domäne besteht aus einem Paar EF-Hände, von denen nur eine Ca reversibel bindet und aus einer sterilen  $\alpha$ -Motiv-Domäne (*sterile alpha motif*, SAM), die mit der breiten unpolaren Oberfläche der EF-Hände interagiert. Die Helix der SAM-Domäne ist im Ca-gebundenen Zustand im EF-Hand-Spalt verankert, wodurch EF-SAM in einer kompakten, monomeren Konformation gehalten wird und STIM im Ruhezustand verbleibt (Stathopoulos et al., 2006, 2008). Sinkt die Ca-Konzentration im ER/SR, führt dies zur Freisetzung von Ca aus der EF-Hand-Domäne mit folgender Konformationsänderung. Dabei werden Protein-Protein-Interaktionsdomänen freigelegt, was zu einer Oligomerisierung von STIM führt, die auch mit einer Konformationsänderung der cytosolischen Domänen einhergeht (Stathopoulos et al., 2008). Durch den Abfall der Ca-Konzentration im ER/SR und damit einhergehender Oligomerisierung von STIM, wird die Aktivierung von Ca-Kanälen in der Plasmamembran ausgelöst und SOCE damit initiiert (Soboloff et al., 2006; Stathopoulos et al., 2006, 2008). Während die EF-SAM-Domäne für die Funktion als Ca-Sensor und die Initiierung der STIM-Oligomerisierung verantwortlich ist, spielen die cytosolischen Domänen bei der Oligomerisierung, der Translokation und der Orai-Kopplung eine entscheidende Rolle (Liou et al., 2007; Stathopoulos & Ikura, 2017; Vig, Beck, et al., 2006). Mehrere STIM-Oligomere ordnen sich in *Punctae* an, was sowohl über die CC-Domänen als auch die Lysin-reiche Region vermittelt wird (Park et al., 2009). Während der Aktivierung kommt es zu strukturellen Veränderungen der CC-Domänen, was für die Aktivierung der Plasmamembrankanäle entscheidend ist (Muik et al., 2008, 2009). Zu den *Punctae* werden schließlich auch die Plasmamembrankanäle rekrutiert. Dabei wurde eine Region in STIM identifiziert, welche für die Aktivierung von Orai notwendig ist. Sie wird als SOAR (*STIM-Orai activating region*) (Yuan et al., 2009) oder CAD-Region (*CRAC activation domain*) bezeichnet (Abb. 1-4). Die Aktivierung von Orai- und TRPC-Kanälen löst schließlich den Ca-Einstrom aus dem Extrazellularraum ins Zellinnere aus.



**Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der funktionalen STIM-Domänen**

Illustration der luminalen und cytoplasmatischen Domänen von STIM1. Luminal befindet sich die EF-Hand mit der Ca-Bindestelle sowie die SAM-Domäne, die wichtig für die Oligomerisierung von STIM1 ist. Auf der cytoplasmatischen Seite sind die *coiled-coil*-Domänen mit der CAD/SOAR-Region lokalisiert, die entscheidend für die Interaktion mit den Plasmamembrankanälen ist.

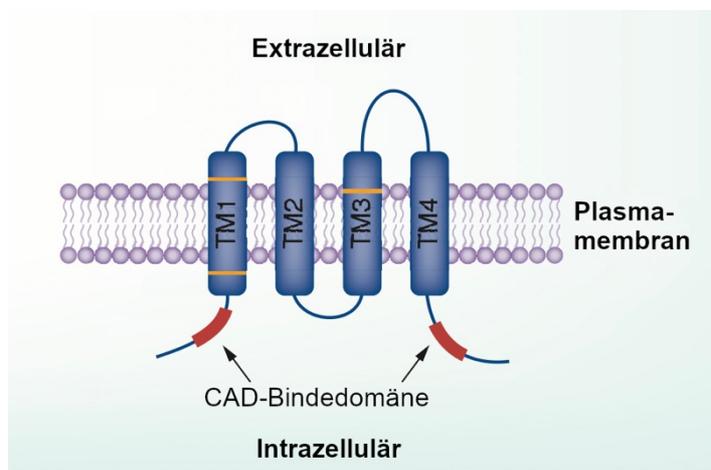
(Abbildung modifiziert nach (Rosenberg et al., 2021))

#### 1.4.4 Orai

Die Plasmamembrankanäle, die den Ca-Einstrom nach der Entleerung der intrazellulären Speicher generieren (speichergesteuerte Ca-Kanäle), werden als Ca-Freisetzungsaktivierte Ca-Kanäle (*Ca release-activated Ca channels*, CRAC) bezeichnet. Ihre molekulare Struktur wurde 2006 aufgeklärt und Orai als porenformende Untereinheit der CRAC-Kanäle identifiziert (Feske et al., 2006; Prakriya et al., 2006).

Orai besteht aus vier Transmembrandomänen, N- und C-Terminus liegen im Cytoplasma (Abb. 1-5) (Prakriya et al., 2006; Vig, Peinelt, et al., 2006). Der Kanal, der für den  $I_{CRAC}$  verantwortlich ist, wird durch die Multimerisierung der porenbildenden Untereinheiten gebildet und besteht aus einem Orai-Tetramer (Penna et al., 2008; Vig, Beck, et al., 2006). Orai wird nach der Aktivierung durch STIM zu den gleichen *Punctae* rekrutiert und bewegt sich durch Diffusion in der Plasmamembran zu diesen Stellen (M. M. Wu et al., 2014).

Die *coiled-coil*-Domäne am C-Terminus von Orai ist entscheidend für die Interaktion mit STIM, da über die SOAR/CAD-Domäne von STIM der Kontakt zum C-Terminus von Orai vermittelt wird (Muik et al., 2008; Stathopoulos & Ikura, 2017; Yuan et al., 2009). Auch der N-Terminus von Orai besitzt mit einer hoch konservierten Region wichtige Strukturen für die Kanalaktivierung (Yuan et al., 2009).



**Abbildung 1-5 Schematische Darstellung von Orai**

Schematische Darstellung der vier Transmembransegmente (TM) eines Orai-Monomers. N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär, dort liegen auch die CAD-Bindedomänen.

(Abbildung modifiziert nach (Tian et al., 2016))

#### 1.4.5 *Transient receptor potential canonical channels* (TRPC-Kanäle)

Die TRPC (*transient receptor potential canonical*) -Kanäle gehören zur großen Familie der TRP-Kanäle und umfassen sieben Isoformen (TRPC1-7). Ihren Namen erhielten die TRP-Kanäle durch eine *Drosophila*-Mutante, die einen Defekt in der visuellen Signaltransduktionskaskade aufwies. Diese *trp* (*transient receptor potential*) -Mutante zeichnete sich dadurch aus, dass andauernde Lichtreize im Elektretinogramm nur mit einem transienten anstatt einem persistierenden Licht-induzierten Rezeptorpotenzial beantwortet werden konnten (Montell & Rubin, 1989). TRPC-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, von denen alle sieben Isoformen im Herzen von Nagetieren beschrieben wurden (Freichel et al., 2017). Im humanen Genom existieren hingegen nur sechs Isoformen, da TRPC2 dort für ein Pseudogen codiert (Vannier et al., 1999). TRPC-Kanäle bilden Tetramere aus vier Proteinuntereinheiten, wobei jede TRPC-Untereinheit aus sechs Transmembransegmenten (TM) besteht (Abb. 1-6). Die N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert. Zwischen dem TM5 und TM6 befindet sich eine Porenschleife (*pore loop*), die die porenbildende Region darstellt (Clapham et al., 2001; Watanabe et al., 2008). Eine ähnliche Primärstruktur weisen z.B. spannungsgesteuerte Kationenkanäle, wie die spannungsaktivierten K- oder Na-Kanäle auf. Am N-Terminus der TRPC befinden sich Ankyrinbindungsdomänen und eine *coiled-coil*-Domäne, die für den tetrameren Zusammenbau der Kanäle essentiell sind (Eder & Molkentin, 2011).

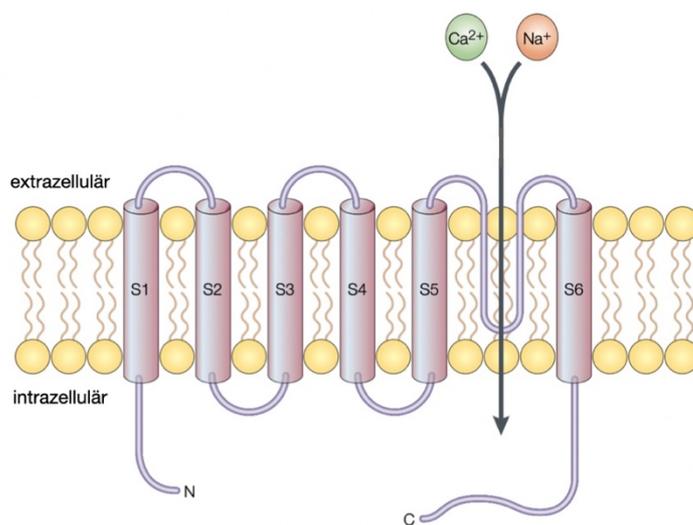
TRPC-Kanäle haben ein breites Expressionsmuster und können als Homo- oder Heterotetramere vorliegen. Die Oligomerisierung kann innerhalb und zwischen Unterfamilien oder sogar außerhalb einer bestimmten TRP-Familie stattfinden, was zu vielen unterschiedlichen Kanälen in verschiedenen Zelltypen führen kann (Alessandri-Haber et al., 2009; Eder & Molkentin, 2011; Hofmann et al., 2002).

TRPC-Kanäle können durch verschiedene Mechanismen gesteuert werden. Sie können zum einen im Rahmen des SOCE nach der Entleerung intrazellulärer Speicher (Putney & McKay, 1999) und zum anderen über einen rezeptorgesteuerten Mechanismus (*receptor-operated calcium entry*, ROCE) aktiviert werden (Clapham et al., 2001). Der ROCE-Signalweg beschreibt die Aktivierung eines Ca/Na-Einstroms vermittelt über die durch Agonisten-induzierte Hydrolyse des Membranphospholipids PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat). Diese Hydrolyse wird durch die Phospholipase C vermittelt, die durch Gq-gekoppelte Rezeptoren oder durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert wird. Durch die Hydrolyse entstehen die Signalstoffe (*second messenger*) Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>). Das gebildete DAG kann die Isoformen TRPC3, 6 und 7 direkt aktivieren (Hofmann et al., 1999; Lemonnier et al., 2009). Dahingegen bindet das gebildete IP<sub>3</sub> an die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (Ca-

Freisetzungskanäle) in der ER/SR-Membran, woraufhin es zur Freisetzung von Ca aus dem ER/SR kommt und ein Ca-Einstrom über die Plasmamembran folgt.

Obwohl Studien eindeutig zeigen, dass TRPC-Kanäle einen Beitrag zum SOCE leisten, ist deren Rolle angesichts der Entdeckung von STIM1 und Orai bis heute nicht eindeutig geklärt und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Es ist jedoch beschrieben worden, dass einige TRPC-Kanäle (1,4 und 5) direkt mit STIM interagieren (Yuan et al., 2007) und, dass das Ausschalten von STIM mit Hilfe von siRNA die Aktivität von TRPC1 und damit die des SOCEs hemmt (Worley et al., 2007).

Trotz der kontroversen Studien über die physiologische Aktivierung und Rolle von TRPC-Kanälen im Rahmen des SOCE zeigen jüngste Forschungen, dass neben STIM und Orai auch TRPC-Kanäle eine kritische Rolle in der Pathophysiologie der Herzhypertrophie spielen können, die in den folgenden Kapiteln erläutert werden.



#### Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der Membrantopologie eines TRPC-Proteins

Der TRPC-Kanal besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), dem intrazellulären N- und C-Terminus sowie der *pore loop*, die sich zwischen S5 und S6 befindet.

(Abbildung modifiziert nach (Clapham et al., 2001).)

#### 1.4.6 Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom im Herzen

In elektrisch nicht-erregbaren Zellen ist der speichergesteuerte Calcium-Einstrom für die Aufrechterhaltung der zellulären Ca-Signalübertragung und für die Wiederauffüllung entleerter Ca-Speicher unerlässlich (Tojyo et al., 2014). Die Rolle des SOCE wird in Kardiomyozyten hingegen kontrovers diskutiert und ist bis heute Gegenstand aktiver Forschungen. Der Existenz des SOCE wurde in Kardiomyozyten zunächst wenig Aufmerksamkeit geschenkt, da die Kardiomyozyten bei jedem Herzschlag mit der elektromechanische Kopplung bereits einen großen Ca-Einstrom generieren können (Bootman & Rietdorf, 2017). Dessen ungeachtet wurde die Expression der am SOCE-beteiligten Proteine in Kardiomyozyten nachgewiesen. Der regelmäßige zyklische Anstieg und Abfall des cytosolischen Ca während der elektromechanischen Kopplung ist ausschlaggebend für die Herzfunktion. Die Ca-regulierenden Proteine (Ca-Kanäle, Transporter und Pumpen), die für diese cytosolischen Ca-Signale und der damit verbundenen Kontraktion verantwortlich sind, sind heute bereits sehr gut erforscht (Bers, 2002). Aus diesem Grund wurde zunächst angenommen, dass Kardiomyozyten den SOCE für die Kontraktion oder zur Auffüllung intrazellulärer Speicher nicht benötigen. Jedoch können Veränderungen der intrazellulären Ca-Signale in Kardiomyozyten zu kardialen Funktionsstörungen führen und so z.B. zur Pathogenese der Herzhypertrophie beitragen (Berridge et al., 2003; Bisping et al., 2014; Bootman & Rietdorf, 2017; Dewenter et al., 2017). Dabei sind verschiedene Faktoren für diese Veränderungen der Ca-Signale in Kardiomyozyten verantwortlich. Die elektromechanische Kopplung beruht auf streng regulierten Abläufen von Ca-Ein- und -Ausströmen. Der SOCE stellt einen Mechanismus dar, der die Ca-Regulation von Kardiomyozyten beeinflussen kann und somit einen Beitrag zu einem kardialen Remodeling leisten kann. Die Rolle des SOCE im Herzen könnte daher ein wichtiges Untersuchungsziel in der Pathogenese der Herzhypertrophie darstellen. Die pathophysiologischen Mechanismen der Herzhypertrophie werden im nächsten Kapitel erläutert.

Der SOCE wurde im Herzen zuerst in embryonalen Kardiomyozyten der Maus, später auch in neonatalen Myozyten der Ratte charakterisiert (Uehara et al., 2002). Schließlich wurden SOCE-Experimente auch an adulten Herzmuskelzellen durchgeführt (Hunton et al., 2004; Voelkers et al., 2010). Die Expression der molekularen Komponenten des SOCE (STIM, Orai- und TRPC-Kanäle) wurde in neonatalen und adulten Kardiomyozyten nachgewiesen, wobei eine Beteiligung an der Entwicklung und der Gentranskription bereits demonstriert werden konnte (Avila-Medina et al., 2018; Hulot et al., 2011; Ohba et al., 2009; Voelkers et al., 2010).

## 1.5 Pathogenese der Hypertrophie

Die Herzhypertrophie bezeichnet die kompensatorische Größenzunahme des Herzens durch erhöhte Belastungen. Sie kann als Folge physiologischer oder pathologischer Ereignisse auftreten (McMullen & Jennings, 2007). Dabei tritt eine Vergrößerung einzelner Herzmuskelzellen auf, in Folge dessen es zu einer Vergrößerung des gesamten Organs kommt.

Die pathologische Herzhypertrophie ist ein wichtiger Risikofaktor für schwerwiegende kardiale Ereignisse und wird durch Erkrankungen wie Bluthochdruck, der koronaren Herzkrankheit, durch einen Myokardinfarkt oder eine Aortenstenose ausgelöst, wohingegen die physiologische Hypertrophie eine Reaktion des Körpers auf vermehrte Belastungen durch z.B. erhöhte körperliche Aktivität („Sportlerherz“) darstellt. In beiden Fällen kommt es zu einer mechanischen Belastung des Herzens, die in eine Druck- oder Volumenüberlastung unterteilt werden kann. Eine Drucküberlastung entsteht vor allem durch die arterielle Hypertonie oder durch eine Aortenstenose. Der linke Ventrikel muss dabei dauerhaft erhöhte Drücke generieren, was mit einer erhöhten systolischen Wandspannung einhergeht. Als Antwort darauf hypertrophieren die Ventrikelwände bei gleichbleibendem Ventrikelvolumen. Diese Form der Hypertrophie wird konzentrische Hypertrophie genannt. Im Gegensatz dazu führt eine Volumenüberlastung, die bei Krankheiten wie der Aorten- oder der Mitralinsuffizienz entsteht, zu einer exzentrischen Hypertrophie, bei der das Ventrikelvolumen und die diastolische Wandspannung erhöht ist (You et al., 2017). Der Umbau (Remodeling) der Ventrikelwände kann neben der Hypertrophie mit einem vermehrten Absterben von Myozyten, einem fibrotischen Umbau und einer verminderten systolischen und diastolischen Funktion einhergehen, was wiederum zu einer Herzinsuffizienz führen kann.

Zu Beginn der Herzhypertrophie kommt es zu einer Aktivierung von neurohumoralen Systemen mit ihren Mediatoren (Katecholamine, Angiotensin II, Endothelin-1), so dass die Pumpleistung des Herzens an die erhöhten Anforderungen angepasst werden kann (Moravec et al., 1989, 1990; Salas et al., 2001). Es steigen die Herzfrequenz und die Kontraktilität der Kardiomyozyten. Die erhöhte Kontraktilität beruht zum einen auf größeren Calciumtransienten und zum anderen auf dem Wachstum einzelner Kardiomyozyten. Das Wachstum der Kardiomyozyten führt zur Wandverdickung und damit zu einer Verringerung der Wandspannung (Brooksby et al., 1993; Chen-Izu et al., 2007; Plačičić et al., 2016). Diese initialen Kompensationsreaktionen können sich in einem maladaptiven Remodeling manifestieren, wenn die Stimuli chronisch auftreten (Berridge et al., 2003; Heineke & Molkentin, 2006).

Mehrere wichtige Signalwege tragen zu den initialen Kompensationsreaktionen bei und sind damit an der Pathogenese der Hypertrophie von Kardiomyozyten während des kardialen

Remodelings beteiligt. Mechanismen, die durch einen erhöhten Sympathikustonus, durch die erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) oder die durch die Signaltransduktion durch Mechanosensoren aktiviert werden, sind dabei als wichtigste zu nennen (Berridge et al., 2003; Bisping et al., 2014). Gleichzeitig gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass auch der speichergesteuerte Ca-Einstrom einen Beitrag zum kardialen Remodeling leisten kann. Die Rolle des SOCE in der Pathogenese der Herzhypertrophie wird in Kapitel 1.5.3 erläutert.

Erhöhte Anforderungen an das Herz führen zu einer Sympathikusaktivierung, die zur Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin und damit zu einer Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren führt. In Ventrikelmyozyten werden sowohl  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-Rezeptoren exprimiert, wobei  $\beta$ 1-Rezeptoren den überwiegenden Anteil ausmachen (Brodde et al., 2006). Die  $\beta$ -Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und sind  $G_s$ -gekoppelt. Nach Aktivierung durch einen Agonisten kommt es zu einer Steigerung der Enzymaktivität der membranständigen Adenylatzyklase, was zu einem Konzentrationsanstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats führt. Dadurch wird die Proteinkinase A aktiviert, die verschiedene Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind (z.B. PLB, LTCC, RyR, Troponin I), phosphoryliert (Bers, 2002). Die stärkere Kontraktion der Kardiomyozyten (positive Inotropie) wird dabei durch einen erhöhten Ca-Einstrom durch die LTCC und eine erhöhte SR-Ca-Freisetzung verursacht (Bers, 2002).

Andere Mediatoren, wie das Angiotensin II (AT-II) oder das Endothelin-1 (ET-1) aktivieren  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren. Die Stimulation dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung der PLC und zur Spaltung des membranständigen  $PIP_2$  in DAG und  $IP_3$ . Das gebildete  $IP_3$  sorgt für eine Ca-Freisetzung aus dem SR, indem es an die  $IP_3$ -Rezeptoren, die sich in der SR-Membran oder in der Kernhülle befinden, bindet (Heineke & Molkentin, 2006).

Die neurohumorale Stimulation induziert zunächst eine kompensatorischen Antwort des Herzens, die die Herzfunktion aufrechterhält, während eine anhaltende Stimulation letztlich zu maladaptiven Umstrukturierungen des Herzens führt (Berridge et al., 2003). Während der kardialen Umbauprozesse kommt es zu Änderungen der cytoplasmatischen Ca-Regulierung, die maßgeblich für die Pathogenese der Hypertrophie verantwortlich ist. Neben dem cytoplasmatischen Ca wird auch dem nucleären Ca eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hypertrophie zugeordnet. Die Mechanismen, die der akuten Anpassung des Herzens an erhöhte Belastungen dienen, sind heute bereits umfänglich erforscht. Dahingegen ist die langfristige Anpassung, die zu maladaptiven Umbauprozessen führt, im Detail noch nicht ausreichend verstanden (Berridge et al., 2003). Die komplexen zellulären Mechanismen, die an der Regulierung der kardialen Genexpression im Nucleus beteiligt sind und zum molekularen Umbau des Herzens beitragen, werden im folgenden Kapitel erläutert.

### 1.5.1 Die nucleäre Calciumregulation in Ventrikelmyozyten

Ca ist der wichtigste cytoplasmatische Botenstoff in Kardiomyozyten und spielt eine fundamentale Rolle für die Funktion des Herzens. Ca ist essentiell für die elektromechanische Kopplung und damit für die regelmäßige Kontraktion der Herzmuskelzellen (Bers, 2002). Daneben ist Ca aber auch an der Entstehung der pathologischen Hypertrophie beteiligt. Dabei ist Ca in wichtige Signaltransduktionsprozesse involviert, die durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Veränderung der Genexpression führen (Roderick et al., 2007).

Kardiomyozyten verfügen über eine Vielzahl von Ionenkanälen, Transportern und Pumpen (ATPasen), die direkt oder indirekt an der Regulation der intrazellulären Ca-Konzentration beteiligt sind. Das Zusammenspiel von Mechanismen, die zur Ca-Erhöhung (z.B. durch LTCC, RyR) und zur Ca-Erniedrigung (z.B. durch SERCA, NCX) beitragen, führt in Kardiomyozyten zu periodischen Schwankungen der cytosolischen Ca-Konzentration (Berridge et al., 2003; Bers, 2008). Der während der elektromechanischen Kopplung entstehende cytoplasmatische CaT löst zeitlich verzögert einen nucleoplasmatischen CaT aus (Genka et al., 1999; Ljubojević et al., 2011). Erhöhungen der nucleoplasmatischen Ca-Konzentration können ein breites Spektrum von Transkriptionsfaktoren aktivieren und dadurch die Genexpression modulieren (Dolmetsch et al., 1998), wodurch auch das Kerncalcium zur Entwicklung der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz maßgeblich beiträgt (Domínguez-Rodríguez et al., 2012; T. Zhang & Brown, 2004). Das Kerncalcium ist im Rahmen der sogenannten Erregungs-Transkriptions-Kopplung (*excitation-transcription coupling*, ETC) an der Regulierung der Transkription beteiligt (Dewenter et al., 2017).

Der Zellkern ist vom umgebenden Cytoplasma durch die Kernhülle (*nuclear envelope*, NE) getrennt. Die Kernhülle dient als Ca-Speicher und verfügt über eine innere Membran, die das Nucleoplasma umgibt sowie über eine äußere Membran, die Kontakt zum Cytoplasma hat (X. Wu & Bers, 2006). Ähnlich wie die Oberflächenmembran der Kardiomyozyten, verfügt auch die Kernhülle über tiefe Einstülpungen, die bis in das Zentrum des Zellkerns reichen. Sie werden als nucleoplasmatisches Retikulum oder Kerntubuli bezeichnet (Bootman et al., 2009; Echevarría et al., 2003; Ljubojevic et al., 2014). In der Kernhülle befinden sich Proteine, die eine Rolle für die nucleäre Ca-Signalübertragung spielen. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem der RyR und IP<sub>3</sub>-Rezeptoren sowie die SERCA und der NCX. Dabei ist die SERCA im Wesentlichen in der äußeren Membran und der NCX in der inneren Membran lokalisiert (Bootman et al., 2009; Gensburger et al., 2003; Ledeen & Wu, 2007; Marius et al., 2006).

Die Kernhülle ist von Kernporen perforiert, die das Nucleoplasma und das Cytoplasma miteinander verbinden (M. A. Lee et al., 1998). Bei den Kernporen handelt es sich um Proteinkomplexe, die aus mehreren sogenannten Nucleoporinen aufgebaut sind. Sie werden

daher auch als Kernporenkomplexe bezeichnet (M. A. Lee et al., 1998). Da Zellkern und Cytoplasma räumlich voneinander getrennt sind, erfolgt der Transport von Molekülen über die Kernporen (Capelson et al., 2010; M. A. Lee et al., 1998). Kleine Moleküle gelangen dabei durch passive Diffusion in den Zellkern, wohingegen größere Moleküle ( $\approx 50$  kDa) aktiv transportiert werden müssen (Allen et al., 2000; Bootman et al., 2009; Talcott & Moore, 1999). So diffundiert bei jedem Herzschlag cytoplasmatisches Ca passiv durch die Kernporenkomplexe in den Zellkern, was den verzögerten Kern-CaT verursacht (Ljubojević et al., 2011). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass der Nucleus auch über ein Ca-Regulierungssystem verfügen könnte, das unabhängig vom Einfluss des cytoplasmatischen Ca das nucleäre Ca erhöhen kann. So wurde bereits gezeigt, dass Endothelin-1 über  $IP_3$  eine Ca-Freisetzung aus der Kernhülle bewirkt, was eine präferentielle Erhöhung des nucleären Ca zur Folge hat (Kockskämper, Zima, et al., 2008; X. Wu et al., 2006).

Zusammengefasst resultiert die Ca-Erhöhung im Nucleoplasma aus dem Calcium, das passiv aus dem Cytoplasma durch die Kernporen in den Zellkern diffundiert und dem Calcium, das aktiv aus der Kernhülle freigesetzt wird. Der Anstieg der Ca-Konzentration im Nucleoplasma beeinflusst die Regulierung der Transkription und ist daher ein wichtiger Faktor für die Entstehung der Hypertrophie. Aus diesem Grund stellt das Kerncalcium einen wichtigen neuen Ansatzpunkt für das bessere Verständnis der grundlegenden Prozesse dar, die zur Pathogenese der Herzhypertrophie beitragen.

### 1.5.2 Prohypertrophe Signalwege

An der Ca-abhängigen Regulation der Genexpression in Herzmuskelzellen sind im Wesentlichen zwei hypertrophe Signalwege beteiligt (Bers, 2008). Beide werden durch Calmodulin (CaM) aktiviert. Calmodulin ist ein Ca-bindendes regulatorisches Protein, das als intrazellulärer Botenstoff Ca-Signale in praktisch allen Zelltypen vermittelt. Durch die Bindung von Ca an CaM kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Bindung an Zielproteine ermöglicht wird (Maier & Bers, 2002). Beide Signalwege beginnen mit erhöhten cytoplasmatischen und/oder nucleären Ca-Konzentrationen und enden mit der Aktivierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren. Daher spielt der Ca-CaM-Komplex eine wichtige Rolle für hypertrophe Umbauprozesse im Herzen (Molkentin et al., 1998).

Im Folgenden werden die zwei Ca-CaM-abhängigen Signalwege, die zur Aktivierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren führen, erläutert. Dies sind (1) der Ca/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (CaN)-NFAT-GATA4/6 Weg und (2) der Ca/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)-HDAC-MEF2-Weg (Backs & Olson, 2006; Molkentin, 2000; Molkentin et al., 1998; Passier et al., 2000; T. Zhang & Brown, 2004).

(1) *Calcineurin-NFAT-GATA4/6-Signalweg*: der Ca-CaM-Komplex aktiviert die Ca/CaM-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2B (Calcineurin, CaN). Calcineurin ist ein Heterodimer, das aus der katalytischen CnA-Untereinheit sowie der regulatorischen CnB-Untereinheit besteht (Olivares-Florez et al., 2018; Vega et al., 2003). Sobald Calcineurin durch den Ca-CaM-Komplex aktiviert wurde, dephosphoryliert dieses den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), der im phosphorylierten (inaktiven) Zustand im Cytosol vorliegt. Die Dephosphorylierung durch Calcineurin führt zur Translokation von NFAT in den Zellkern. Im Zellkern bindet NFAT an den herzspezifischen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA4/6, wodurch die Transkription prohypertropher Gene aktiviert wird (Molkentin, 2000, 2004). Der Signalweg ist in Abbildung 1-7 schematisch dargestellt.

(2) Der *CaMKII-HDAC-MEF2-Signalweg* (Abb. 1-7) wird über den Ca-CaM-Komplex durch die Aktivierung der Ca-CaM-abhängigen Proteinkinase-II (CaMKII), einer Serin/Threonin-Proteinkinase, aktiviert. Die CaMKII ist an der Regulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt (Bers, 2008). Dabei ist die Aktivierung des Myozyten-Enhancer-Faktors 2 (MEF2) wesentlich an der Entstehung der Herzhypertrophie beteiligt (Passier et al., 2000). Es existieren vier verschiedene CaMKII-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), wobei die  $\gamma$ - und  $\delta$ -Isoform ubiquitär exprimiert werden, während die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen in neuronalen Geweben vorzufinden sind. Im Herzen ist die  $\delta$ -Isoform vorherrschend. Die CaMKII-Isoformen bestehen alle aus drei Domänen: einer katalytischen Domäne am N-Terminus, einer zentralen regulatorischen und einer C-terminalen Assoziations-Domäne. Die regulatorische Domäne enthält Autophosphorylierungsstellen und die Bindestelle für Calmodulin (Anderson et al., 2011). Im inaktiven Zustand wird die Substratbindestelle von CaMKII durch die autoinhibitorische Region blockiert. Bindet der Ca-CaM-Komplex an die CaMKII, kommt es zu einer Konformationsänderung und die autoinhibitorische Domäne wird verdrängt, wodurch das Enzym aktiviert wird. Die Kinase kann sich nach der Aktivierung durch den Ca-CaM-Komplex auch selbst in den aktivierten Zustand durch eine Autophosphorylierung an T286 versetzen (Maier & Bers, 2002; Mattiazzi et al., 2015). Durch die Autophosphorylierung der CaMKII zeigt diese eine erhöhte Affinität zum Ca-CaM-Komplex, weshalb der aktive Zustand der CaMKII auch bei sinkenden Ca-Konzentrationen (z.B. während der Diastole) länger aufrechterhalten bleibt (Mattiazzi et al., 2015).

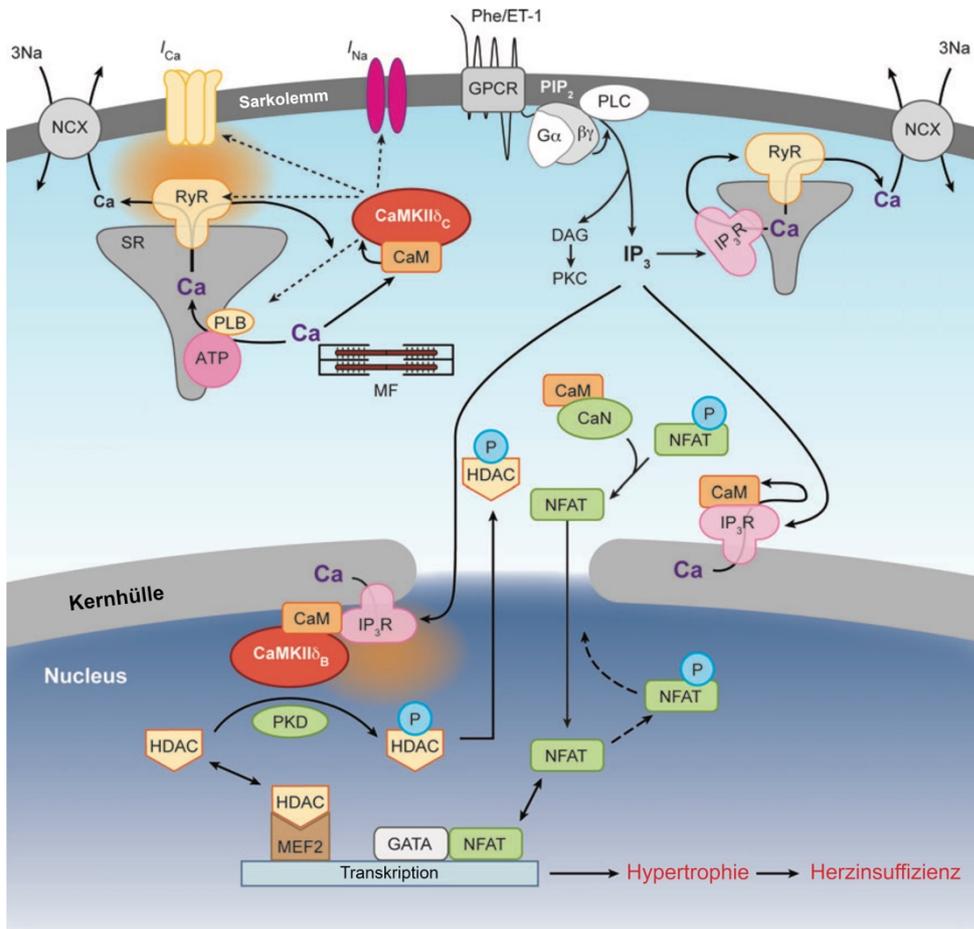
Es wurden bislang mehrere Spleißvarianten der CaMKII $\delta$  identifiziert, wobei die Spleißvarianten  $\delta_B$  und  $\delta_C$  im adulten Säugetiermyokard exprimiert werden (T. Zhang & Brown, 2004). Die CaMKII $\delta_B$  enthält eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localisation signal*, NLS) und ist daher vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Die CaMKII $\delta_C$  trägt hingegen kein NLS und ist daher hauptsächlich im Cytoplasma vorzufinden. Daraus ergeben sich unterschiedliche Funktionalitäten dieser Spleißvarianten. Im Cytoplasma sind Zielproteine der CaMKII $\delta_C$

überwiegend verschiedene Ca-regulierende Proteine (z.B. LTCC, RyR, PLB), im Zellkern wirkt die CaMKII $\delta_B$  hingegen auf Proteine, die an der Regulierung der Transkription beteiligt sind (Bers, 2002; Maier & Bers, 2002). Dazu zählen z.B. die Klasse II Histondeacetylasen (HDAC), von denen die HDAC 4, 5, 7 und 9 in Kardiomyozyten exprimiert werden. Sie regulieren im gesamten Organismus eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie dem kardialen Wachstum, der Spezifikation von Skelettmuskelfasertypen oder der Knochenentwicklung (Bacs et al., 2006).

Histone sind basische Proteine, die eine bedeutende Rolle für die Verpackung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) spielen. Die kleinste Verpackungseinheit eines Chromosoms wird als Nucleosom bezeichnet. In einem Nucleosom wickelt sich der DNA-Strang spiralförmig um die Histone. Die ionische Bindung erfolgt über die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA mit den positiv geladenen Histonen. Die Histone bestehen aus je zwei Kopien H2A, H2B, H3 und H4 und bilden einen Proteinkomplex aus acht Histonen (Bacs & Olson, 2006). Die DNA ist um diesen Komplex etwa 1,65-mal auf einer Länge von 146 Basenpaaren gewickelt. Zwei benachbarte Nucleosomen werden durch die Linker-DNA miteinander verbunden. Ein weiteres Histon, das H1, bindet als sogenanntes Linker-Histon die DNA neben den Nucleosomen und trägt zur nächsthöheren Verpackungsebene der DNA bei (Robinson & Rhodes, 2006).

Die HDAC sind Proteine, die als Histonmodifikatoren fungieren. Sie fördern die Chromatin-Kondensation und unterdrücken dadurch die Transkription, indem sie Acetylgruppen von Lysinresten am Histonende entfernen. Dadurch bekommt das Lysin eine positive Ladung, was die Bindung zwischen dem Phosphat-Gerüst der DNA und den Histonen verstärkt. Die DNA ist in Folge dessen für Transkriptionsfaktoren blockiert und die Gentranskription wird reprimiert. Die HDAC der Klasse II besitzen eine spezifische Bindungsdomäne für MEF2 sowie zwei konservierte Serinreste am N-Terminus. Durch das Binden der HDAC an MEF2 wird die Genexpression unterdrückt. Wenn die Serinreste allerdings von der CaMKII phosphoryliert werden, binden die HDAC an das Chaperon 14-3-3 und der Komplex wird aus dem Zellkern exportiert und die Genexpression prohypertropher Gene ist möglich (Bers, 2008).

Als Gegenspieler der HDAC acetylieren die Histonacetyltransferasen (HAT) die Lysinreste, was eine Neutralisierung der positiven Ladung zur Folge hat. Dadurch wird die Bindung der Histone an die DNA geschwächt und die Transkription in diesen Bereichen erleichtert. Die Histonmodifikationen durch HAT oder HDAC haben daher einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Genexpression (Bacs & Olson, 2006; Heineke & Molkentin, 2006; Verdin et al., 2003).



**Abbildung 1-7 Schematische Darstellung Ca-abhängiger prohypertropher Signalwege in Kardiomyozyten**

Ca-abhängige Aktivierung prohypertropher Signalwege: Agonisten, wie Endothelin-1 (ET-1) oder Phenylephrin (Phe) am GPCR aktivieren eine Signalkaskade, bei der DAG und IP<sub>3</sub> gebildet werden. IP<sub>3</sub> bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor am SR oder auf der Kernhülle, was zu einer Ca-Freisetzung führt. Erhöhte Ca-Konzentrationen aktivieren Calmodulin (CaM), wodurch es zur Aktivierung von Calcineurin (CaN) und der CaMKII kommt. Calcineurin dephosphoryliert NFAT, woraufhin NFAT in den Zellkern wandert und es zur Aktivierung von GATA4/6 und damit zur prohypertrophen Genexpression kommt. Die CaMKII oder die Proteinkinase D (PKD) phosphorylieren HDAC, was zu deren Export aus dem Zellkern führt. Dadurch wird die MEF2-abhängige Transkription aktiviert.

(Abbildung modifiziert nach (Bers, 2008))

Die Veränderungen der cytoplasmatischen Ca-Signale sind ein wesentlicher Aspekt beim hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten. Beim Betrachten der Ca-abhängigen Pathogenese der Hypertrophie muss berücksichtigt werden, dass Kardiomyozyten ständig schwankenden periodischen Ca-Signalen unterliegen, wobei nicht jedes Ca-Signal zu einem hypertrophen Effekt führt (Berridge et al., 2003; Heineke & Molkentin, 2006). Die Ca-Signale, die zum hypertrophen Wachstum beitragen, stammen aus verschiedenen Quellen, wobei vor allem lokale Ca-Signale zum hypertrophen Wachstum beitragen. Daher können Veränderungen der Ca-Signale auch durch den SOCE-vermittelten Ca-Einstrom verursacht werden, weshalb es zunehmend Hinweise gibt, dass auch der SOCE einen Beitrag zum hypertrophen Wachstum von Kardiomyozyten leisten könnte (Bootman & Rietdorf, 2017; Collins et al., 2013).

Neben den cytoplasmatischen Veränderungen tragen auch erhöhte Ca-Konzentrationen im Nucleus zum kardialen Remodeling bei (T. Zhang & Brown, 2004). Die Mechanismen, die das Kerncalcium regulieren, sind bis heute nicht ausreichend verstanden. So gibt es bislang nur wenige Studien, die sich mit Veränderungen des Kerncalciums befassen. Es wurde bereits beschrieben, dass es während des kardialen Remodelings zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Kernhülle und der nucleären Ca-Regulierung kommen kann, die im Zellkern mit erhöhten (diastolischen) Ca-Konzentrationen einhergehen (Ljubojevic et al., 2014). Der Zellkern verfügt auf der Kernhülle über verschiedene Rezeptoren und Transporter (z.B. IP<sub>3</sub>-Rezeptoren), die zu lokalen Ca-Erhöhungen führen können (Hohendanner et al., 2014; Lipp et al., 2000). Der Anstieg der nucleären Ca-Konzentration kann wiederum die Aktivität der CaMKII und von Calcineurin im Kern stimulieren und damit die MEF2- und NFAT-abhängige Transkription hypertropher Gene weiter anregen (Dolmetsch et al., 1998; T. Zhang & Brown, 2004). Die Expression von Rezeptoren und Kanälen, die an der nucleären Ca-Homöostase beteiligt sind, ist beim kardialen Remodeling ebenfalls verändert. So wurde eine erhöhte perinucleäre Expression der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren beschrieben sowie eine verminderte Expression von RyR und SERCA (Ljubojevic et al., 2014). Auch auf struktureller Ebene wurden Veränderungen des Zellkerns beschrieben. Diese beinhalten eine Vergrößerung des Zellkerns und eine Verringerung der Kerntubuli-Dichte (Ljubojevic et al., 2014; Plačičić et al., 2016). Die Untersuchungen zeigen, dass während des kardialen Remodelings die funktionellen und strukturellen Veränderungen des Zellkerns zu einer veränderten nucleären Ca-Regulierung führen können und geben damit einen Hinweis darauf, dass auch das Kerncalcium einen Einfluss auf das kardiale Remodeling haben kann. Neuere Studien beschäftigen sich auch zunehmend mit der Rolle des SOCE bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie. Ob der SOCE ebenfalls einen Einfluss auf die nucleäre Ca-Regulation hat, ist hingegen bis heute nicht bekannt.

### 1.5.3 Die Rolle des speichergesteuerten Calcium-Einstroms in der Hypertrophie

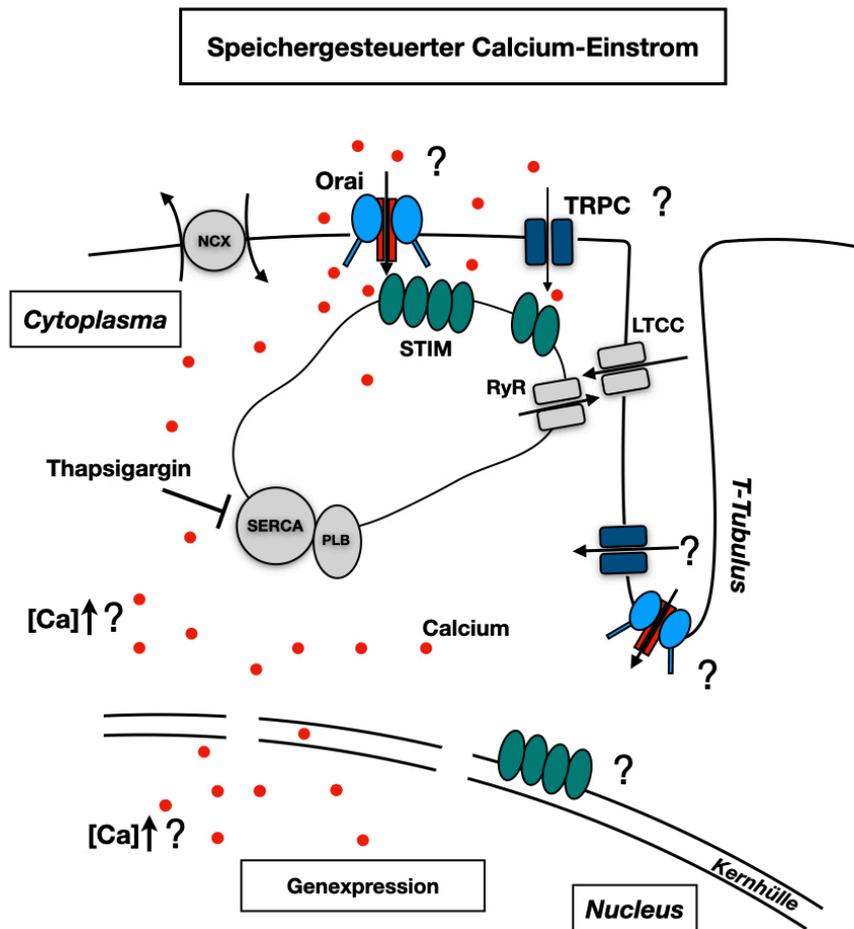
Die Untersuchungen, die sich mit der Bedeutung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms im Herzen beschäftigen, liefern erste Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen der Expression der SOCE-Proteine und dem Vorhandensein von pathologischen Zuständen, insbesondere der Hypertrophie im Herzen. Der durch den SOCE vermittelte Ca-Einstrom stellt eine Ca-Quelle dar, die zu erhöhten Ca-Konzentrationen in Kardiomyozyten führen und damit zu einem hypertrophen Remodeling beitragen kann (Eder & Molkentin, 2011; Kuwahara et al., 2006). Untersuchungen zeigen, dass die Expression und Aktivität von TRPC-Kanälen (insbesondere TRPC1, 3, 4 und 6) bei der pathologischen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz erhöht sind (Bush et al., 2006; Freichel et al., 2017; Kuwahara et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Seth et al., 2009). Dabei ist unter anderem NFAT für die erhöhte Aktivierung des SOCE in Kardiomyozyten bei hypertropher Stimulation verantwortlich (Hunton et al., 2002). NFAT wird durch Calcineurin aktiviert, das wiederum durch die Aktivierung von TRPC-Kanälen mit folgendem Ca-Einstrom aktiviert werden kann. Weiterhin führt die Stimulation von Kardiomyozyten mit AT-II zusammen mit einer intrazellulären Speicherentleerung in adulten transgenen Mauskardiomyozyten, die TRPC3 überexprimieren, zu einem erhöhten Ca-Einstrom. Dieser Ca-Einstrom kann durch den TRPC-Blocker SKF 96365 gehemmt werden, während Inhibitoren des NCX (KB-R7943) und der LTCC (Verapamil) keinen Einfluss auf diesen Ca-Einstrom haben. Durch den erhöhten Ca-Einstrom wird sekundär die NFAT-Aktivität gesteigert, wodurch es zur Aktivierung hypertropher Signalwege kommt (Nakayama et al., 2006). Im Mausmodell führt das Abschnüren der Aorta (*transverse aortic constriction*, TAC) zu einer druckinduzierten Hypertrophie und zu einem signifikant erhöhten, nicht-selektiven Kationeneinstrom in den Ventrikelmyozyten. TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse, die der gleichen Operation unterzogen wurden, zeigen hingegen keine hypertrophe Größenzunahme des Herzens und keine erhöhte Aktivierung des NFAT-Signalwegs (Seth et al., 2009). Darüber hinaus sind TRPC1, 4 und 6 in einem SOCE-unabhängigen Mechanismus für einen sogenannten Hintergrund-Ca-Einstrom verantwortlich und tragen dadurch zum maladapten kardialen Remodeling bei (Camacho Londoño et al., 2015; Hutchings et al., 2022). Nicht nur TRPC-Kanälen wird eine Rolle im kardialen Remodeling zugeschrieben. Auch für STIM gibt es bedeutende Hinweise darauf, dass es eine Rolle für die Pathogenese der Hypertrophie, z.B. durch Aktivierung des NFAT-Signalwegs, spielen kann (Correll et al., 2015; Heineke & Molkentin, 2006; Luo et al., 2012). Die Durchführung einer TAC führt in neonatalen Ratten zu einer signifikant erhöhten Expression von STIM1. Außerdem aktiviert der SOCE-vermittelte Ca-Einstrom den Calcineurin-NFAT-Signalweg, wohingegen die Hemmung von STIM1 eine durch Agonisten verursachte Hypertrophie verhindert (Luo et al., 2012). In neonatalen Rattenkardiomyozyten aktiviert ET-1 den SOCE, was mit einer NFAT-Aktivierung

und Hypertrophie einhergeht und mit einem STIM-Knockout verhindert werden kann (Ohba et al., 2009). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Befund, dass ein Knockdown von Orai und STIM eine Phenylephrin-induzierte Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten verhinderte (Voelkers et al., 2010). Andere Untersuchungen in neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten, dass die chronische Behandlung von Zellen mit Aldosteron zu erhöhten Expressionen von TRPC1 und 5 sowie von Orai führen. Dieser Befund korreliert mit einem ebenfalls erhöhten SOCE. Der Einsatz der Orai-Inhibitoren Synta66 (S66) oder BTP-2 oder des TRPC-Inhibitors SKF 96365 reduzierte den SOCE und verhinderte den Aldosteron-induzierten diastolischen Ca-Anstieg (Sabourin et al., 2016a). Der SOCE kann ebenfalls als Folge der Reaktivierung des fetalen Genprogramms auftreten, in dem es zur erhöhten Expression von SOCE-Kanälen und einer erhöhten Kanalaktivität während der Entwicklung der Hypertrophie kommt (Avila-Medina et al., 2018; Eder & Molkentin, 2011; Hulot et al., 2011; Luo et al., 2012). Die zunehmenden experimentellen Hinweise auf eine Beteiligung der SOCE-Proteine an der Pathophysiologie der Herzhypertrophie zeigen, dass diese Proteine vielversprechende therapeutische Ziele darstellen könnten. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Expression von SOCE-Proteinen in der Kernhülle beschäftigen. Aus diesem Grund ist bis heute nicht bekannt, ob der SOCE auch einen Einfluss auf das Kerncalcium hat. In den Kerntubuli von kultivierten neonatalen und adulten Mauskardiomyozyten wurde die Expression von STIM1 bereits bestätigt (S.-H. Lee et al., 2018). Ist der Nucleus mit Proteinen des SOCE ausgestattet, könnte die Aktivierung des SOCE im Nucleus zu einer Erhöhung des Kerncalciums führen und die prohypertrophe Genexpression beeinflussen.

Viele der genannten Untersuchungen zur Beteiligung der SOCE-Proteine an der Pathogenese der Herzhypertrophie wurden in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Dabei muss beachtet werden, dass sich sowohl neonatale als auch kultivierte Kardiomyozyten im Allgemeinen von frisch isolierten adulten Ventrikelkardiomyozyten unterscheiden. So zeigen frisch isolierte Ventrikelmyozyten beispielsweise ein intaktes ausgeprägtes T-tubuläres System, während dieses in neonatalen und kultivierten Kardiomyozyten fehlt oder weniger stark ausgeprägt ist (Delcarpio et al., 1989; Mitcheson et al., 1998). Daraus ergeben sich wichtige funktionelle Unterschiede in der Ca-Signalübertragung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die SOCE-Experimente daher frisch isolierte adulte Kardiomyozyten eingesetzt.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom (SOCE) spielt eine wichtige Rolle für die Ca-Regulation in elektrisch nicht-erregbaren Zellen. Es ist bekannt, dass auch Herzmuskelzellen die Proteine des SOCE exprimieren, deren Rolle und Funktion wird allerdings bis heute kontrovers diskutiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, den SOCE in frisch isolierten adulten Kardiomyozyten zu charakterisieren. Die Ziele der Charakterisierung und die Arbeitshypothese sind in Abbildung 1-8 zusammengefasst. Da der SOCE die intrazellulären Ca-Konzentrationen verändern kann und dabei nicht bekannt ist, ob diese Ca-Erhöhung einen Einfluss auf das Kerncalcium hat, war ein Schlüsselaspekt dieser Arbeit die Untersuchung des SOCE im Nucleus. Bei funktionellen Messungen wurde daher sowohl der Einfluss des SOCE auf das cytoplasmatische Ca als auch auf das nucleäre Ca betrachtet. Die Charakterisierung des SOCE wurde in Ventrikel- und Vorhofzellen durchgeführt. Durch den Einsatz verschiedener Pharmaka wurde die Beteiligung von Orai- und TRPC-Kanälen am SOCE bestimmt. Außerdem wurde die Lokalisation dieser Kanäle in Ventrikelmyozyten mithilfe von Detubulierungsversuchen untersucht. Schließlich wurde in einem pathologischen Tiermodell die Rolle des SOCE zu Beginn einer Herzhypertrophie beleuchtet.



**Abbildung 1-8 Arbeitshypothese des SOCE in adulten Kardiomyozyten**

Schematische Darstellung des Modells des speichergesteuerten Calcium-Einstroms. Der SOCE wurde in adulten Kardiomyozyten charakterisiert. Dabei wurde die Beteiligung der SOCE-Kanäle am Ca-Einstrom, die Lokalisation der SOCE-Kanäle und der Einfluss auf das Kerncalcium untersucht. Ca-regulierende Proteine (NCX, RyR, LTCC; SERCA, PLB) sind in grau dargestellt, SOCE-Proteine sind farbig hinterlegt (hellblau/rot: Orai; dunkelblau: TRPC, grün: STIM). Rote Punkte stellen Ca-Ionen dar. Die Fragezeichen zeigen die zu untersuchenden Aspekte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Für die Zell- und Gewebeisolierungen wurden männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan-hypertensive Ratten (SHR) verwendet (Gewicht: 250-350 g). Die WKY wurden im Rahmen dieser Arbeit als physiologisches Modell verwendet, während die SHR als Krankheitsmodell für die Herzhypertrophie fungierten. SHR entwickeln im Alter 8-12 Wochen spontan eine Hypertonie, die nach 12-20 Wochen zu einer kompensatorischen linksventrikulären (LV) Hypertrophie führt. Nach 15-25 Monaten Lebenszeit entwickeln die Tiere schließlich eine Herzinsuffizienz (Doggrell & Brown, 1998).

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Zell- und Gewebeisolierungen 12-16 Wochen alt und wurden vom Züchter Janvier in Frankreich bezogen. Alle Experimente mit den Versuchstieren sowie die Erlaubnis zur Tötung mit anschließender Organentnahme nach §4 (3) Tierschutzgesetz wurden den Tierschutzbeauftragten angezeigt und von diesen genehmigt (AK-4-2018-Kockskämper). Sie standen in Übereinstimmung mit der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tiere. Die Tiere wurden in der Tierhaltung zu zweit in einem Käfig untergebracht und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser. In den Räumen der Tierhaltung herrschte eine konstante Temperatur von 22°C sowie eine Luftfeuchtigkeit von 55 %. Die Tiere waren einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Vor der Herzentnahme wurden die Ratten mit Isofluran betäubt und die Betäubung durch Überprüfung der nicht mehr vorhandenen Reflexe bestätigt. Mit einer Guillotine wurden die Tiere schließlich dekapitiert.

## 2.2 Zellisolierung

Die Zellisolierung mittels der Langendorff-Apparatur stellt einen wesentlichen Teil der Methoden dieser Arbeit dar. Hierbei wurden die Kardiomyozyten gewonnen, die schließlich in allen Zellexperimenten genutzt wurden. Die Methode ist im Labor der AG Kockskämper etabliert und wird daher als Standardtechnik verwendet (Plačkić & Kockskämper, 2018). Im Folgenden wird die retrograde Herzperfusion nach Langendorff vorgestellt.

### 2.2.1 Die retrograde Herzperfusion an der Langendorff-Apparatur

Die retrograde Herzperfusion hat ihren Ursprung im 19. Jahrhundert. Im Jahr 1866 isolierte Elias von Cyon am Carl-Ludwig-Institut in Leipzig erstmalig ein Froschherz. Der deutsche Physiologe Oscar Langendorff stellte 1895 schließlich die Methode der retrograden Herzperfusion an Säugetierherzen vor und legte damit den Grundstein für die nach ihm benannte Langendorff-Technik (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Sie stellt seitdem eine wichtige Methode der Grundlagenforschung am Herzen dar, da sowohl verschiedene physiologische als auch pathophysiologische Vorgänge unabhängig von anderen Organsystemen untersucht werden können. Außerdem kann mit dieser Methode der Effekt pharmakologischer Substanzen auf das Herz untersucht werden. Daher zählt diese Methode noch heute zu einer der wichtigsten Standardtechniken in der kardiovaskulären Forschung.

Die Langendorff-Technik beruht darauf, dass die *Aorta ascendens* des isolierten Herzens kanüliert wird. Über ein Perfusionssystem wird eine physiologische Pufferlösung (Tyrode-Lösung) appliziert, die in gegensätzliche Richtung (retrograd) zum physiologischen Blutfluss strömt. Der so aufgebaute Perfusionsdruck führt zum Schließen der Aortenklappe. Folglich strömt der Puffer in die Koronararterien, die das Herz selbst mit Blut versorgen (*Vasa privata*) und kann dadurch tief in kardiales Gewebe gelangen. Der Puffer strömt letztlich über die Koronarvenen in den rechten Vorhof. Von dort verlässt er über die Hohlvenen oder über den rechten Ventrikel und die abgetrennten Lungenarterien das Herz (Bell et al., 2011).

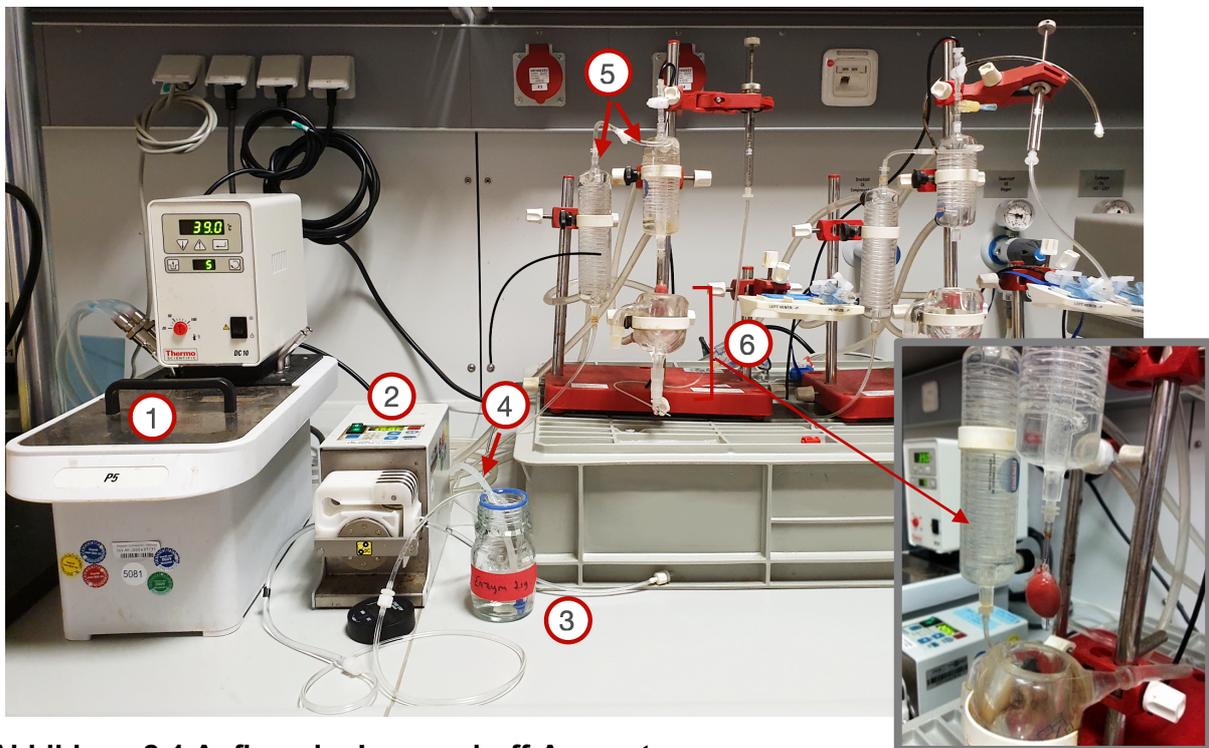
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Langendorff-Methode zum enzymatischen Verdau des Herzgewebes und damit zur Isolierung lebensfähiger Vorhof- und Ventrikelkardiomyozyten angewendet.

### 2.2.2 Ablauf der Zellisolierung

Die Ratten wurden zuerst durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (FORENE ® 100 % (V/V), AbbVie, Deutschland) anästhesiert und die tiefe Narkose durch Kontrolle des Zwischenzehenreflexes überprüft. Dabei wurde mit einer Pinzette in den Mittelfuß der Ratte gekniffen. War der Reflex noch vorhanden, zog die Ratte in Folge dessen das Bein an. Das Ausbleiben dieser Reaktion bestätigte eine ausreichend tiefe Narkose. Die anästhesierten Tiere wurden danach gewogen, mit einer Guillotine dekapitiert und in Rückenlage fixiert. Schließlich wurde der Thorax eröffnet. Dabei wurden die Rippen durchtrennt und das Herz zunächst von umliegendem mediastinalem Gewebe (z.B. Lungenflügel) befreit und das Perikard entfernt. Das Herz wurde zuletzt durch das Abtrennen der arteriellen und venösen Gefäße aus dem Mediastinum befreit und das isolierte Herz in eine eisgekühlte Kardioplegielösung gegeben. Diese Lösung wurde zuvor mit Sauerstoff angereichert. Eine Kanüle wurde schließlich wie oben beschrieben in die *Aorta ascendens* des nun funktionell gelähmten Herzens eingeführt und anschließend mit einem chirurgischen Faden an der Kanüle fixiert. Hierüber wurden etwa zehn Milliliter einer Kanülierungslösung appliziert. Damit wurde das Blut aus den Koronararterien gespült und durch zugesetztes Heparin die Thrombenbildung unterdrückt. Die Herzlähmung wurde durch die Applikation der Kanülierungslösung wieder aufgehoben, so dass Kontraktionen wieder möglich waren. Das Herz wurde schließlich, an der Kanüle hängend, an die Langendorff-Apparatur überführt (Abb. 2-1).

Das Langendorff-System wurde im Vorhinein mit oxygenierter Kanülierungslösung befüllt. Eine peristaltische Pumpe sorgte für einen konstanten Fluss der verschiedenen Lösungen, während ein Wasserbadsystem die Lösungen beim Durchlaufen kontinuierlich auf 37°C erwärmte. Alle Lösungen wurden vor Durchlaufen der Langendorff-Apparatur mit Sauerstoff angereichert. Am System wurde das Herz zuerst weiter mit der Kanülierungslösung perfundiert, um restliches Blut zu entfernen. Es folgte eine Ca-freie Lösung, die für drei Minuten mit einer Durchflussrate von 4 ml/min durch das System gespült wurde. Danach wurde die Enzym-Lösung für weitere 45-60 Minuten durch das System gespült. Die Flussrate wurde dabei auf 3,5 ml/min reduziert und das Organbad von unten verschlossen. Dadurch füllte sich das Organbad langsam mit der Enzymlösung, wodurch das Herz schließlich im Ganzen von der Lösung umgeben war. Die abfließende Lösung wurde aufgefangen und anschließend erneut durch das System gepumpt. Während des enzymatischen Verdaus wurde das Herz allmählich weich, blass und verlor seine Form. Ein Tropfen der abfließenden Lösung wurde entnommen und auf eine Petrischale gegeben und anschließend mit einem Lichtmikroskop der Firma Olympus untersucht. Zeigten sich hier isolierte, lebende Kardiomyozyten, so galt der Verdau als erfolgreich. Der Status des Verdaus ist entscheidend für die Zellqualität und wurde daher in

regelmäßigen Abständen wie oben beschrieben überprüft. Während bei einer zu kurzen Verdauzeit noch nicht ausreichend viele Zellen aus ihrem Zellverband gelöst wurden, kann ein zu langer Verdau mit Qualitätsverlusten der Myozyten einhergehen, da hier die Enzyme bereits die Zellmembranen beschädigt haben könnten. Nach dem Verdau wurden die rechten und linken Vorhöfe abgetrennt und jeweils in eine Stopp-Lösung gegeben. Ebenso wurde der Ventrikel in eine Stopp-Lösung gegeben. Das Gewebe wurde vorsichtig zerkleinert und auf eine Schüttelplattform gestellt. Anschließend wurde die Suspension durch ein Sieb mit 300 µm Porengröße gegeben (Kobe, Marburg). Die extrazelluläre Ca-Konzentration wurde anschließend sukzessive bis zum Erreichen der physiologischen Konzentration von 1,5 mM erhöht. Die Vorhofmyozyten wurden nach einem anderen Schema adaptiert, so dass eine Endkonzentration von 1,3 mM erreicht wurde (Tabelle 2-1). Die einzelnen Lösungen, die für die Zellisolierung verwendet wurden, werden im Folgenden im Detail vorgestellt und erläutert.



**Abbildung 2-1 Aufbau der Langendorff-Apparatur**

1. Wasserbad mit Temperaturanzeige, 2. Peristaltikpumpe, 3. Perfusionslösung (hier: Enzymlösung), 4. Sauerstoffzufuhr, 5. Spiralwärmetauscher, 6. Organbad mit Herz an der Kanüle

## 2.3 Lösungen

Alle Lösungen, die für die Zellisolierung zum Einsatz kamen, wurden mit demineralisiertem Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Milli-Q™ Reference A+ Wasseraufbereitungsanlage (Merck Millipore, Darmstadt) hergestellt.

### 2.3.1 Tyrode-Lösung

Die Tyrode-Lösung ist nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Tyrode benannt und stellt eine physiologische Lösung von Elektrolyten mit definierter Zusammensetzung dar. Für die Lösungen der Zellisolierung wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung hergestellt (Tabelle 2-1). Diese physiologische Lösung wurde auf den Blut-pH-Wert von 7,4 mit einer 1 M NaOH-Lösung eingestellt und durch den Zusatz von NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure, Best.-Nr.: HN78.4, Roth) gepuffert.

Die Lösung wurde im Vorhinein hergestellt und bei +4°C für maximal zwei Wochen gelagert. Die Tyrode-Lösung diente als Ausgangslösung für alle zur Zellisolierung (Tabelle 2-2) benötigten Lösungen. Alle während der Zellisolierung verwendeten Lösungen wurden vor ihrem Einsatz oxygeniert.

Substanz	Einwaage/ Menge	Konzentration (mM)	Hersteller
NaCl	7,597 g	130	Roth
1 M KCl	5,4 ml	5,4	Roth
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,5 ml	0,5	Sigma
0,33 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1 ml	0,33	Roth
Glucose x H <sub>2</sub> O	4,356 g	22	Roth
HEPES	5,958 g	25	Roth
NaOH	q.s. zur Einstellung des pH	1000	Roth

**Tabelle 2-1 Standard Tyrode-Lösung (1000 ml, pH 7,4)**

## 2.3.2 Lösungen für die Zellisolierung

Lösung	Menge Tyrode-Lösung	Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
<b>Kanülierungslösung</b>	250 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>	37,5 µl	0,15 mM	Sigma
		5000 I.E./ml Heparin-Na <sup>+</sup>	100 µl	2 I.E./ml	Roth
<b>Kardioplegielösung</b>	147 ml Kanülierungslösung	1 M KCl	3 ml	20 mM	Roth
<b>Ca-freie Lösung</b>	50 ml	100 mM EGTA	200 µl	0,4 mM	Roth
		BDM	50 mg	1 mg/ml	Roth
		5000 I.E./ml Heparin-Na <sup>+</sup>	20 µl	2 I.E./ml	Roth
<b>Enzymlösung</b>	50 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>	10 µl	0,2 mM	Sigma
		BDM	50 mg	1 mg/ml	Roth
		Collagenase Typ 2 (~300 U/mg)	25 mg	150 U/ml	Worthington, USA
		Protease Typ XIV	2,5 mg	0,005 mg/ml	Sigma
<b>Stopplösung</b>	15 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>	7,5 µl	0,5 mM	Sigma
		BDM	15 mg	1 mg/ml	Roth
		BSA	30 mg	2 mg/ml	Roth
<b>1 mM Ca-Lösung</b>	15 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>	15 µl	1 mM	Sigma
		BSA	30 mg	2 mg/ml	Roth
<b>1,5 mM Ca-Lösung</b>	100 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>	150 µl	1,5 mM	Sigma
<b>2 mM Ca-Lösung</b>	10 ml 1,5 mM Ca-Lösung	1 M CaCl <sub>2</sub>	5 µl	2 mM	Sigma

Tabelle 2-2 Lösungen für die Zellisolierung

### 2.3.3 Kardioplegielösung

Das Ruhemembranpotenzial einer Herzmuskelzelle wird hauptsächlich von Kaliumionen bestimmt. Daher liegt das Ruhemembranpotenzial nahe dem Kaliumgleichgewichtspotenzial (Kapitel 1.3.1). Die physiologische extrazelluläre Kaliumkonzentration liegt im Bereich zwischen 3,5 und 5 mM. Die verwendete Kardioplegielösung weist hingegen eine sehr hohe Kaliumkonzentration von 20 mM auf und liegt damit deutlich über der physiologischen Kaliumkonzentration.

Durch diese hohe Kaliumkonzentration ändert sich das Kaliumgleichgewichtspotenzial, in Folge dessen es zu einer Anhebung des Ruhemembranpotenzials der Zelle kommt. Daraus resultiert eine permanente Depolarisation und das Myokard wird unerregbar. Kontraktionen bleiben aus und das Herz ist funktionell gelähmt (*Kardioplegie*). Dieser Effekt wurde für das Einführen der Kanüle in die Aorta genutzt (Melrose et al., 1955).

### 2.3.4 Kanülierungslösung

Während das Herz in der Kardioplegielösung lag, wurde eine Kanüle in die *Aorta ascendens* eingeführt, mit einem chirurgischen Faden fixiert und die Koronararterien mit der calciumhaltigen Kanülierungslösung gespült. Dabei wurde restliches Blut aus den Koronargefäßen entfernt. Der Lösung wurde Heparin zugesetzt, das die Thrombenbildung in den Gefäßen verhinderte. Die Kardioplegie wurde durch diesen Schritt wieder aufgehoben und das Herz begann zu kontrahieren. An der Kanüle hängend wurde das Herz an das Langendorff-System angeschlossen, das ebenfalls mit der oxygenierten Kanülierungslösung im Vorhinein befüllt wurde. An der Apparatur schlug das Herz so lange weiter, bis die Ca-freie Lösung appliziert wurde. Durch die Kontraktionen an der Apparatur wurde ebenfalls die Blutentleerung gefördert.

### 2.3.5 Calcium-freie Lösung

Nachdem das Herz mit der Kanülierungslösung am Langendorff-System durchgespült wurde, folgte die Applikation von Ca-freier Lösung. Diese ist nominell Ca-frei, das heißt, dass bei der Herstellung kein Calcium hinzugegeben wurde. Je nach Wasserquelle und -reinheit kann nominell Ca-freies Wasser Ca im mikromolaren Bereich enthalten. Daher wurde der Ca-Chelatbildner EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) der Lösung zugesetzt. Zusätzlich enthielt die Lösung Heparin.

Erreichte die Ca-freie Lösung das Herz, so hörte es auf zu kontrahieren, da der Calciumspiegel im Gewebe so niedrig wurde, dass keine Kontraktionen mehr möglich waren. Der Lösung

wurde außerdem BDM (2,3-Butandionmonoxim, Synonym: Diacetylmonoxim, Roth) zugesetzt, das reversibel die Myosin-ATPase hemmt (Louch et al., 2011). Durch die Hemmung wurden die Kontraktionen ebenfalls reduziert und der Energieverbrauch des Herzens niedrig gehalten. Durch die Ca-freie Lösung kam es zur Auflösung der Glanzstreifen, den Zell-Zell-Verbindungen zwischen zwei benachbarten Kardiomyozyten (Plačičić & Kockskämper, 2018). Die Ca-freie Lösung wurde für drei Minuten durch das System gespült. Diese Zeit sollte nicht überschritten werden, da es bei der anschließenden Ca-Erhöhung zu massiver Schädigung des Herzens kommen kann. Dieses Phänomen wird als Calcium-Paradoxon bezeichnet (Chapman & Tunstall, 1987)

### 2.3.6 Enzymlösung

Nachdem die Ca-freie Lösung für drei Minuten durch das System gepumpt wurde, wurde die Enzymlösung appliziert. Diese Lösung enthielt die beiden Enzyme Kollagenase Typ 2 und Protease Typ XIV. Die Kollagenase Typ 2 stammt aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* und beinhaltet verschiedene proteolytische Enzyme, während die Protease Typ XIV aus *Streptomyces griseus* stammt und eine Mischung aus mindestens drei verschiedenen Proteasen darstellt. Die Enzyme lösten die Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband. Beide Enzyme benötigen Ca als Cofaktor, weshalb die Lösung eine Calciumkonzentration von 0,2 mM aufwies. Auch die Enzymlösung enthielt BDM. Der enzymatische Verdau des Gewebes dauerte durchschnittlich 45-60 Minuten und war abhängig von der Herzgröße.

### 2.3.7 Stopplösung Ventrikel

Nach erfolgreichem Verdau wurden die Ventrikel von den Vorhöfen getrennt. Das Ventrikelgewebe wurde in ein Becherglas mit der auf 37°C erwärmten Stopplösung gegeben. Diese enthielt neben BDM auch Rinderserumalbumin (BSA), das im Überschuss zugegeben wurde und dafür sorgte, dass die Enzyme das Gewebe nicht weiter verdauten.

Vorsichtig wurde das Gewebe zerschnitten und das Becherglas auf einer Schüttelplattform platziert, um die Zellen weiter aus dem Gewebeverband zu lösen. Anschließend wurde es durch ein Sieb mit einer Porengröße von 300 µm gegeben (Kobe, Deutschland). Ab diesem Zeitpunkt wurde den Zellen 15 Minuten Zeit gegeben, um zu sedimentieren. Dies war der erste Schritt in der sukzessiven Anhebung der Calcium-Konzentrationen.

### 2.3.8 Calcium-Lösungen (1 mM und 1,5 mM)

Nach 15 Minuten wurde der Überstand abgenommen und eine 1 mM Ca-Lösung vorsichtig auf die Zellen gegeben. Diese Lösung enthielt ebenfalls BSA. Nach weiteren 15 Minuten wurde die Lösung durch die 1,5 mM Ca-Lösung ersetzt. Durch diese schonende, schrittweise Anhebung der Calciumkonzentration konnte eine große Ausbeute intakter Kardiomyozyten erreicht werden. Die Zellsuspension mit der finalen Ca-Konzentration von 1,5 mM wurde bei Raumtemperatur gelagert und konnte einige Stunden verwendet werden (Plačičić & Kockskämper, 2018)

### 2.3.9 Stopplösung und Ca-Adaptation Vorhöfe

Die linken und rechten Vorhöfe wurden getrennt in kleine Bechergläser gegeben, in denen sich 500 µl einer Lösung mit 0,2 mM Ca und BDM befand. Das Gewebe wurde mit Pinzetten vorsichtig zertrennt. Nach einem definierten Schema (Tabelle 2-3) wurden die Zellen anschließend schrittweise an physiologische Ca-Konzentrationen adaptiert. Durch dieses Schema wird eine Ca-Überladung und das damit verbundene Absterben der Zellen verhindert und gleichzeitig eine große Ausbeute erreicht (Louch et al., 2011). Die Lösungen mit steigenden Ca-Konzentrationen wurden alle zwei Minuten vorsichtig zu der Zellsuspension pipettiert.

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
<b>Stopp-Lösung (0,5 mM Ca)</b>	5x 0,1 ml
<b>1 mM Ca-Lösung</b>	4x 0,1 ml
	3x 0,2 ml
<b>1,5 mM Ca-Lösung</b>	5x 0,2 ml
<b>2 mM Ca-Lösung</b>	4x 0,1 ml
	3x 0,2 ml

**Tabelle 2-3 Schema Vorhofadaptation**

### 2.3.10 Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten

Nach der Ca-Adaptation wurden die Zellen noch für weitere 10 Minuten ruhen gelassen, ehe die Zellsuspension auf die gewünschte Zelldichte verdünnt wurde.

Zum Ausplattieren wurden Kulturschälchen mit Glasboden (WillCo Wells, Niederlande; Durchmesser Schälchen/Glasboden: 35/22 mm, Glasdicke: 0,17 mm, Best.-Nr.: HBST- 3522) vorbereitet. Diese wurden zuvor für eine Stunde mit einer Lamininlösung (50 µg/ml) benetzt. Laminin (Sigma-Aldrich, München) ist ein Glykoprotein, das an Zellmembranen bindet und damit die Zellen an die Kulturschälchen heften kann. Überschüssiges Laminin wurde von den Kulturschälchen entfernt und die Zellen ausplattiert. Da während der Messungen mit einem Perfusionssystem gearbeitet wurde, war dieser Schritt besonders wichtig, damit die Zellen bei laufenden Messungen nicht verrutschen konnten und die Messungen dadurch unbrauchbar wurden. Die Zellen verblieben etwa zehn Minuten auf dem Laminin, bevor die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte.

## 2.4 Lösungen für die Calciummessungen am LSM 510

### 2.4.1 Messlösung (ML)

Die Messlösung (ML, Tabelle 2-4) ist eine modifizierte Tyrode-Lösung mit einer 1,5 mM Ca-Konzentration. Diese Lösung wurde für die Zellexperimente am LSM 510 verwendet und stellt die Grundlage der anderen verwendeten Lösungen dar. Außerdem wurden die Farbstoffe in der Messlösung gelöst.

Substanz	Menge	Endkonzentration (mM)	Hersteller
NaCl	7,597 g	130	Roth
1 M KCl	5,4 ml	5,4	Roth
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,5 ml	0,5	Sigma
1 M CaCl <sub>2</sub>	1,5 ml	1,5	Sigma
Glucose x H <sub>2</sub> O	1,982 g	10	Roth
HEPES	2,383 g	10	Roth
NaOH	q.s. zur pH-Wert Einstellung		Roth

**Tabelle 2-4 Messlösung (1000 ml, pH 7,4)**

### 2.4.2 Ca-freie Messlösung

Bei der Ca-freien Messlösung (Tabelle 2-5), handelt es sich um die Messlösung, bei der kein Calcium während der Herstellung zugesetzt wurde. Sie ist daher zunächst nur nominell Ca-frei. Um die Calciumfreiheit sicherzustellen, wurde EGTA zugesetzt, das eventuell noch vorhandenes Ca abfängt. Die Ca-freie Messlösung wurde während des SOCE-Protokolls genutzt und hierin wurden alle wichtigen Inhibitoren gelöst.

Substanz	Menge	Endkonzentration (mM)	Hersteller
NaCl	7,597 g	130	Roth
1 M KCl	5,4 ml	5,4	Roth
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,5 ml	0,5	Sigma
Glucose x H <sub>2</sub> O	1,982 g	10	Roth
HEPES	2,383 g	10	Roth
EGTA (100 mM)	4 ml	0,4	Roth
NaOH	q.s. zur pH-Wert Einstellung		Roth

**Tabelle 2-5 Ca-freie Messlösung (1000 ml, pH 7,4)**

### 2.4.3 2 mM Ca-Messlösung

Diese ebenfalls modifizierte Tyrode-Lösung enthielt 2 mM Ca und wurde im Rahmen des SOCE-Protokolls zur Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration genutzt.

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Messlösung	50 ml	1,5 mM Ca	-
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	25 µl	2 mM Ca	Sigma

**Tabelle 2-6 2 mM Ca-Messlösung**

## 2.5 Pharmakologische und chemische Substanzen

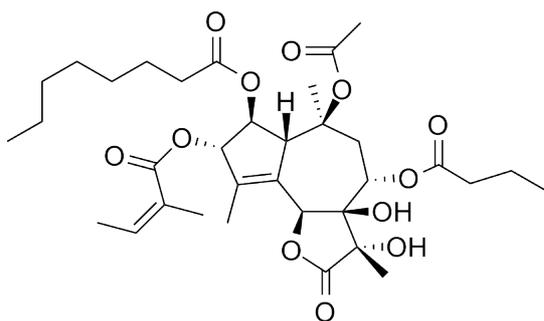
### 2.5.1 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Naturstoff, der aus der Pflanze *Thapsia garganica* L. gewonnen wird. Die im Mittelmeerraum heimische Pflanze gehört zur Familie der *Apiaceae* (Doldenblütler). *Thapsia garganica* ist eine ausdauernde, krautige Pflanze mit variierenden Wuchshöhen zwischen 30-200 cm und leuchtend gelben Blüten (Andersen et al., 2015).

Chemisch gesehen ist Thapsigargin ein Sesquiterpenlacton der Untergruppe der Guajanolide. Thapsigargin ist membrangängig und hemmt irreversibel als nicht-kompetitiver Hemmstoff die SERCA. Dadurch wird die Wiederaufnahme von Ca ins SR gehemmt, wodurch es zu einer passiven Entleerung der intrazellulären Speicher kommt. Thapsigargin gilt heute als Modellsubstanz zur Untersuchung der Calciumregulation in Kardiomyozyten (Christensen et al., 1997; Hänsel & Sticher, 2010). Darüber hinaus gibt es heute zahlreiche Forschungen über die zytostatische Wirkung von Thapsigargin (Jaskulska et al., 2020).

In dieser Arbeit wurde der inhibitorische Effekt von Thapsigargin (CAS-Nr.:67526-95-8; Best.-Nr.: AG-CN2-0003, Biomol) auf die SERCA-Pumpe genutzt. Dazu wurde zunächst eine Thapsigargin-Stammlösung hergestellt (Tabelle 2-7), von der am Tag des Experiments 100 µl frisch in die Ca-freie-Messlösung gegeben wurde (Tabelle 2-8).

Thapsigargin blockiert die SERCA bereits in nanomolaren Konzentrationen (Sagara & Inesi, 1991). Aus diesem Grund wurde die Arbeitslösung mit einer Konzentration von 0,5 µM gewählt.



**Abbildung 2-2 Strukturformel Thapsigargin**

Thapsigargin	ddH <sub>2</sub> O	Konzentration
5 mg	15,38 ml	0,5 mM

Tabelle 2-7 Thapsigargin-Stammlösung

Thapsigargin-Stammlösung	Ca-freie Messlösung	Konzentration
100 µl	100 ml	0,5 µM

Tabelle 2-8 Thapsigargin-Messlösung

### 2.5.2 Verapamil

Verapamil ist ein Arzneistoff, der zur Wirkstoffgruppe der Calciumantagonisten bzw. Calciumkanalblocker vom Phenylalkylamintyp gehört. Daneben gibt es weitere Calciumkanalblocker, wie das Amlodipin oder das Diltiazem, die zum 1,4-Dihydropyridin- bzw. Benzothiazepintyp zählen. Alle Calciumkanalblocker hemmen den Calciumeinstrom durch spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle, indem sie an die porenbildende  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des Kanals binden. Verapamil wird klinisch zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, supraventrikulären Tachykardien oder der koronaren Herzkrankheit eingesetzt (Mutschler et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde Verapamil (Verapamilhydrochlorid; CAS-Nr.: 152-11-4; Best. Nr.: V4629-1G; Sigma) in einer Konzentration von 5 µM zur Hemmung des Ca-Einstroms durch die LTCC eingesetzt. Dazu wurde an jedem Messtag eine 5 mM Verapamil-Stammlösung (Tabelle 2-9) frisch hergestellt. Verapamil ist als Hydrochlorid wasserlöslich, daher konnte zur Herstellung der Stammlösung ddH<sub>2</sub>O verwendet werden. Hieraus wurden schließlich 100 µl entnommen und zu 100 ml der calciumfreien Messlösung hinzugegeben.

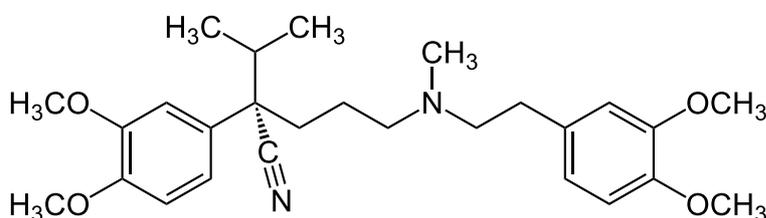


Abbildung 2-3 Strukturformel Verapamil

Verapamil	ddH <sub>2</sub> O	Konzentration
1 mg	407 µl	5 mM

Tabelle 2-9 Verapamil-Stammlösung

### 2.5.3 KB-R7943

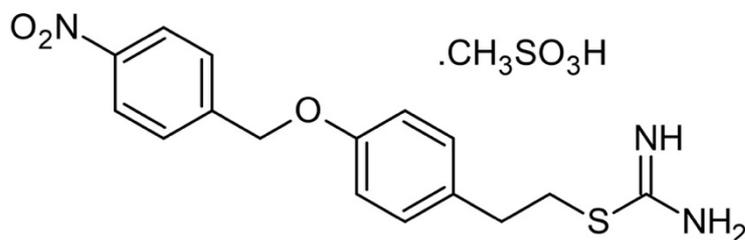
Der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) ist ein Transportprotein, das jeweils drei Na<sup>+</sup>-Ionen gegen ein Ca<sup>2+</sup>-Ion austauscht und damit elektrogen ist (Reeves & Hale, 1984). Er kommt in hoher Dichte in atrialen und ventrikulären Myozyten vor (Gaborit et al., 2007). Dabei ist die Aktivität des NCX abhängig von den intra- und extrazellulären Konzentrationen der Na- und Ca-Ionen und dem Membranpotenzial. Die Hauptaufgabe des NCX besteht in der Entfernung cytoplasmatischen Calciums nach einer Kontraktion (Bers, 2002). Dieser Modus wird Vorwärtsmodus genannt (*forward mode*, Na-Influx, Ca-Efflux). Der NCX arbeitet überwiegend in diesem Modus. Zu Beginn eines Aktionspotenzials, wenn das Membranpotenzial depolarisiert, Na-Kanäle öffnen und Natrium in die Zelle strömt, arbeitet der NCX für einige Millisekunden hingegen im Rückwärtsmodus (*reverse mode*) und bringt damit Calcium in die Zelle, was zu einem repolarisierenden Auswärtsstrom führt (Bers, 2002). Unter ischämischen Bedingungen steigt die intrazelluläre Na-Konzentration an und beeinflusst damit die Aktivität des NCX, so dass die treibende Kraft für einen Ca-Einstrom steigt und auch hier der Rückwärtsmodus aktiviert wird.

KB-R7943 (KBR; CAS-Nr.: 182004-65-5; Bestell-Nr.: Cay16352-10, Cayman Chemical) blockiert bevorzugt den *reverse-mode* des NCX (IC<sub>50</sub>: 1,2-2,4 µM) (Iwamoto et al., 1996). Während der Messung des SOCE wurde eine Ca-freie Messlösung appliziert und diese am Ende des SOCE-Protokolls durch eine 2 mM Ca-Lösung ersetzt. Diese Bedingungen könnten dazu führen, dass der NCX für einen Ca-Einstrom in die Zelle sorgt. Mit dem Zusatz von KBR sollte eine Beteiligung des NCX am Ca-Einstrom verhindert werden, so dass der Ca-Einstrom nur durch SOCE-Kanäle verursacht wird.

KBR wurde als Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Tabelle 2-10), anschließend aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am Versuchstag wurde die aliquotierte Substanz frisch in die Ca-freie Messlösung gegeben. KB-R wurde in einer Arbeitskonzentration von  $10\ \mu\text{M}$  verwendet, so dass die Aktivität des NCX nahezu vollständig blockiert wurde.

KB-R7943	DMSO	Konzentration
10 mg	2,339 ml	10 mM

**Tabelle 2-10 KB-R7943-Stammlösung**



**Abbildung 2-4 Strukturformel KB-R7943**

#### 2.5.4 Koffein

Koffein ist ein Purinalkaloid, bei dem es sich chemisch um ein 1,3,7-Trimethylxanthin handelt. Koffein kommt natürlich in einer Reihe von Nutzpflanzen vor und ist Bestandteil vieler Genussmittel, wie etwa Kaffee, Tee oder Mate. Es ist eines der ältesten vom Menschen genutzten Stimulantien und zählt heute zu den am häufigsten eingesetzten zentralerregenden Substanzen weltweit. Innerhalb der Gruppe der Xanthin-Derivate, die natürlich in Pflanzen vorkommen (Koffein, Theophyllin und Theobromin), hat Koffein die stärkste zentral stimulierende Wirkung (Mutschler et al., 2013).

In hohen Konzentrationen von 10-20 mM bindet Koffein an die RyR2. Dadurch werden die Ca-Freisetzungskanäle geöffnet und Ca wird aus den intrazellulären Speichern freigesetzt (Kong et al., 2008).

Das Koffein wurde in dieser Arbeit als Bolus-Applikation zwei Mal direkt in die Messkammer mittels einer Pipette appliziert. Dazu wurde eine 20 mM Koffeinlösung (Tabelle 2-11) hergestellt (Koffein, CAS-Nr.: 58-08-2, Best.-Nr.:27600-100G, Sigma). Das applizierte Bolusvolumen entsprach dem Kammervolumen, so dass die Zellen einer Endkonzentration von 10 mM ausgesetzt waren. Zur Herstellung der Koffeinlösung wurden 38,83 mg Koffein in 10 ml der Ca-freien Messlösung gelöst.

Substanz	Menge in 10 ml Ca-freier Messlösung	Konzentration
Koffein	38,83 mg	20 mM

Tabelle 2-11 Koffeinlösung

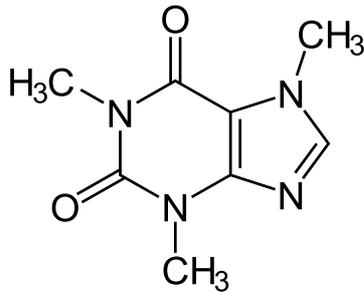


Abbildung 2-5 Strukturformel Koffein

### 2.5.5 Formamid

Formamid (CAS Nr.: 75-12-7; Best. Nr.: 2140-1L-GL; Chemsolute) ist das Amid der Ameisensäure (Synonym: Methansäure). Bei Raumtemperatur ist die Substanz eine farblose Flüssigkeit mit glycerinartiger Konsistenz. Durch seine hygroskopischen Eigenschaften ist es osmotisch aktiv und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit in einer 1,5 M Konzentration zur Detubulierung ventrikulärer Myozyten verwendet. Die Substanz wurde in der Messlösung gelöst und für 15 Minuten auf die Zellen gegeben. Formamid ist membrangängig und reicherte sich während dieser Zeit in den Zellen an. Durch das Auswaschen mit Messlösung gelangte Wasser aufgrund der osmotischen Wirkung des Formamids in die Zelle, was zu einer Zunahme des Zellvolumens führte. Dabei wurden die T-Tubuli physikalisch von der Oberflächenmembran abgetrennt und die Plasmamembran ohne die Einstülpungen geschlossen (Brette et al., 2002; Kawai et al., 1999).

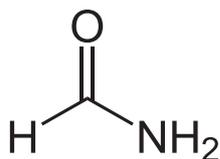


Abbildung 2-6 Strukturformel Formamid

## 2.5.6 Pharmakologische SOCE-Inhibitoren

Der Anteil der am SOCE beteiligten Kanäle (TRPC und Orai) wurde unter Verwendung verschiedener Inhibitoren untersucht. Dazu kamen Inhibitoren zum Einsatz, die unterschiedlich spezifisch die SOCE-Kanäle hemmen. In einer ersten Versuchsreihe wurde zunächst der Ca-Einstrom unspezifisch mit Gadolinium blockiert, ohne dabei zwischen TRPC- und Orai-Kanälen zu unterscheiden. Darauf folgten verschiedene Versuchsreihen, in denen spezifische Orai- oder TRPC-Kanal-Blocker zum Einsatz kamen, um den Anteil der Beteiligung dieser Kanäle in adulten Kardiomyozyten zu charakterisieren. Heute sind viele unterschiedliche SOCE-Inhibitoren erhältlich (Sweeney et al., 2009).

### 2.5.6.1 Gadolinium

Gadolinium (Gd) gehört zu den Lanthanoiden und ist ein polyvalentes Kation, das unselektiv Kationenkanäle inhibiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es (Gadolinium (III)-chlorid Hydrat; CAS Nr.: 19423-81-5; Best.-Nr.: 450855-10G; Sigma Aldrich) eingesetzt, um den SOCE durch Orai- sowie TRPC-Kanäle unspezifisch zu inhibieren.

An jedem Messtag wurde eine Gd-Stammlösung hergestellt (Tabelle 2-12), die anschließend auf die Arbeitskonzentration von 1 mM in der Ca-freien Messlösung verdünnt wurde (Tabelle 2-13).

Substanz	Einwaage	ddH <sub>2</sub> O	Konzentration
Gadolinium (III)-chlorid Hydrat	265 mg	1000 µl	1 M

**Tabelle 2-12 Gd-Stammlösung**

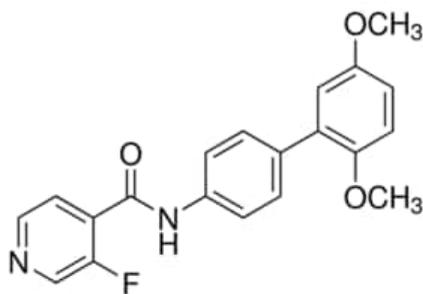
Gd-Stammlösung	Ca-freie Messlösung	Konzentration
100 µl	100 ml	1 mM

**Tabelle 2-13 Gd-Messlösung**

## 2.5.6.2 Synta 66

Synta 66 (S66) ist eine von Synta Pharmaceuticals Corporate entwickelte Substanz, die selektiv Orai-Kanäle ( $I_{CRAC}$ ) hemmt. Dieser spezifische inhibitorische Effekt für S66 wurde zuerst in Immunzellen charakterisiert. Dabei wurden keine weiteren inhibitorischen Effekte auf andere Rezeptoren oder Ionenkanäle (z.B. L-Typ-Ca Kanal, PMCA) beschrieben (Di Sabatino et al., 2009; Ng et al., 2008). Diese Effekte konnten in Versuchen an Gefäßmuskelzellen bestätigt werden. In diesen Zellen wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) im unteren nanomolaren Bereich nachgewiesen (Li et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind Immunzellen weniger sensitiv für S66 ( $IC_{50}$ :  $\approx 1,5 \mu\text{M}$ ) (Ng et al., 2008).

S66 weist eine Strukturähnlichkeit zum Pyrazol Pyr6 auf und soll selektiv CRAC-Kanäle (Orai) hemmen (Schleifer et al., 2012; Tian et al., 2016). Der genaue Mechanismus, wie S66 CRAC-Kanäle inhibiert, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.



**Abbildung 2-7 Strukturformel S66**

Zunächst wurde eine 2 mM S66-Stammlösung (S66, CAS-Nr.: 835904-51-4; Best.-Nr.: SML1949-5MG, Sigma) mit DMSO hergestellt (Tabelle 2-14) und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. An jedem Messtag wurde ein Aliquot sowohl in 100 ml Messlösung als auch in 100 ml Ca-freie Messlösung hinzugegeben, so dass in beiden Lösungen eine Arbeitskonzentration von 1  $\mu\text{M}$  vorlag (Tabelle 2-15). Die Messlösung, die während der Esterhydrolyse des Farbstoffs auf die Zellen gegeben wurde, enthielt zusätzlich 1  $\mu\text{M}$  S66. Die Zellen wurden daher bereits für mindestens 20 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert. Da Immunzellen weniger sensitiv als Gefäßmuskelzellen auf S66 reagieren, müssen diese Zellen für mindestens eine Stunde mit dem Inhibitor inkubiert werden, wohingegen die Inkubationszeit für die Hemmwirkung auf Gefäßmuskelzellen nicht beschrieben wurde (G. S. Bird & Putney, 2017; Li et al., 2011). Für die durchgeführten Experimente mit adulten Kardiomyozyten erwies sich eine Arbeitskonzentration von 1  $\mu\text{M}$  und eine Inkubationszeit von  $> 20$  Minuten als effektiv, um den SOCE-vermittelten Ca-Einstrom zu hemmen.

Substanz	DMSO	Konzentration
5 mg S66	7,1 ml	2 mM

Tabelle 2-14 S66-Stammlösung

2 mM S66	Messlösung (1,5 mM Ca und Ca-frei)	Konzentration
50 µl	100 ml	1 µM

Tabelle 2-15 S66-Messlösung

### 2.5.6.3 BTP-2

BTP-2 ist chemisch betrachtet ein Bis(trifluoromethyl)-Pyrazol-Derivat, das ebenfalls Orai-Kanäle hemmt. Auch für BTP-2 wurde eine selektive Hemmung auf diese Kanäle in Versuchen mit Immunzellen beschrieben (He et al., 2005; J. Ishikawa et al., 2003). Für diese Arbeit wurde der Inhibitor daher dazu genutzt, den Anteil von Orai am SOCE zu bestimmen. Nach einer Inkubationszeit von >10 Minuten und bei einem  $IC_{50}$  von 0,1-0,3 µM blockiert BTP-2 effektiv den Ca-Einstrom durch Orai-Kanäle (He et al., 2005).

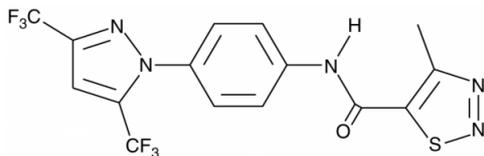


Abbildung 2-8 Strukturformel BTP-2

Zunächst wurde eine 6 mM BTP-2-Stammlösung hergestellt. Dazu wurde die Substanz (BTP-2; CAS-Nr.: 223499-30-7; Best.-Nr.: 203890, Sigma-Aldrich) in 1,98 ml DMSO gelöst und anschließend in 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert (Tabelle 2-16). An jedem Messtag wurde ein Aliquot in jeweils 100 ml Messlösung sowie 100 ml Ca-freie Messlösung gegeben, so dass eine Arbeitskonzentration von 3 µM vorlag (Tabelle 2-17). He et al. wiesen für diese Konzentration eine vollständige Inhibition der Orai-Kanäle in HEK293-Zellen nach (He et al., 2005). Der Inhibitor wurde der Messlösung zugesetzt, die während der Esterhydrolyse des Farbstoffs auf die Zellen gegeben wurde. Daher wurden die Zellen ebenfalls für mindestens 20 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert. Die eingesetzte Arbeitskonzentration von 3 µM und eine Inkubation des Inhibitors für 20 Minuten bewirkte in den durchgeführten Versuchsreihen eine effektive Inhibition des Ca-Einstroms.

Substanz	DMSO	Konzentration
5 mg BTP-2	1,98 ml	6 mM

Tabelle 2-16 BTP-2-Stammlösung

6 mM BTP-2	Messlösung (1,5 mM Ca und Ca-frei)	Konzentration
50 µl	100 ml	3 µM

Tabelle 2-17 BTP-2- Messlösung

## 2.5.6.4 SKF 96365

SKF 96365 (SKF) ist ein TRPC-Kanal-Blocker, dessen Struktur sich vom Imidazol ableitet. Außer der hemmenden Wirkung auf TRPC-Kanäle wurde für SKF auch eine inhibitorische Wirkung auf LTCC beschrieben (Merritt et al., 1990; Singh et al., 2010). Zu Beginn des Versuchsprotokolls wurden elektrisch-stimulierte Calciumtransienten (CaT) aufgezeichnet, die durch die Inhibition von LTCC deutlich kleiner ausfallen würden. Aus diesem Grund wurde SKF in den Experimenten nicht in die Messlösung gegeben. Die Substanz (SKF 96365; CAS-Nr.:130495-35-1; Best.-Nr.: Cay10009312-10, Biomol) wurde erst mit der Ca-freien Lösung auf die Zellen appliziert. SKF blockiert TRPC-Kanäle mit  $IC_{50}$ -Werten, die zwischen  $\approx 0,6$ - $14 \mu\text{M}$  liegen (Prakriya & Lewis, 2002). In Untersuchungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  erfolgreich eingesetzt, weshalb diese Konzentration auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Gao et al., 2012).

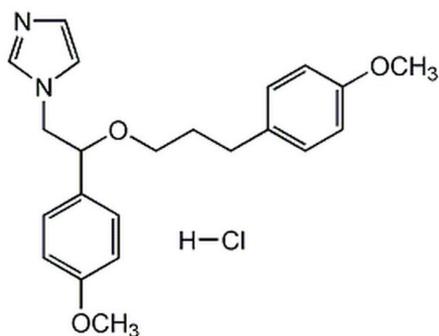


Abbildung 2-9 Strukturformel SKF 96365

Auch für SKF wurde zuerst eine Stammlösung hergestellt, die aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde (Tabelle 2-18). An jedem Versuchstag wurde ein Aliquot in die Ca-freie Messlösung gegeben (Tabelle 2-19).

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Konzentration</b>
10 mg SKF 96365	2,48 ml	10 mM

**Tabelle 2-18 SKF-Stammlösung**

<b>10 mM SKF</b>	<b>Ca-freie Messlösung</b>	<b>Konzentration</b>
50 $\mu\text{l}$	100 ml	5 $\mu\text{M}$

**Tabelle 2-19 SKF-Messlösung**

#### 2.5.6.5 DMSO-Kontrollzellen

An jedem Messtag, an dem mit einem Inhibitor gearbeitet wurde, wurden auch Kontrollzellen ohne Inhibitoren gemessen. Dafür wurde zu allen Lösungen der Anteil DMSO ergänzt, der sich auch als Lösungsmittel in den Inhibitoraliquots befand. Dieser Anteil lag immer unter 1 Vol. %, da bei dieser DMSO-Konzentration keine Effekte auf die Morphologie oder Kontraktilität der Zellen zu erwarten sind. Die so gemessenen Zellen wurden als Kontrollzellen ausgewertet und mit den Zellen, die mit Inhibitoren behandelt wurden, verglichen.

## 2.6 Konfokalmikroskopie

Die Entwicklung der Konfokalmikroskopie geht auf den amerikanischen Forscher Marvin Minsky zurück, der in den 1950er Jahren an der Harvard Universität das erste konfokale Mikroskop entwickelte (Minsky, 1988). Bei der konventionellen Lichtmikroskopie wird der gesamte Probenbereich beleuchtet und das Gesamtbild auf den Detektor reflektiert. Das führt vor allem bei Proben, die dicker als die Schärfentiefe des Objektivs sind, dazu, dass Licht aus Bereichen oberhalb und unterhalb der Fokusebene vom Detektor registriert wird, das dann das scharfe Licht aus der Fokusebene überlagert und so zu einem unscharfen Bild führt. Dahingegen wird bei Konfokalmikroskopen nur ein Punkt des Präparates beleuchtet und das Licht außerhalb der Fokusebene durch eine Lochblende (engl.: *pinhole*) vor dem Detektor zurückgewiesen, so dass es nicht vom Detektor aufgenommen werden kann. Durch diese Technik sind Aufnahmen mit hoher Auflösung auch von dickeren Proben/ Zellen möglich. Für ein vollständiges Bild muss der Laserstrahl über das Präparat bewegt werden, wobei das vollständige Bild aus den einzelnen Punktaufnahmen konstruiert werden kann.

Nach der Entwicklung des ersten Konfokalmikroskops wurde in den folgenden Jahrzehnten an der Optimierung des Mikroskops gearbeitet. Die ersten Laser-Scanning-Mikroskope wurden schließlich in den 1980er Jahren vorgestellt. Alle modernen Konfokalmikroskope verwenden das konfokale Prinzip, das Minsky 1957 patentieren ließ.

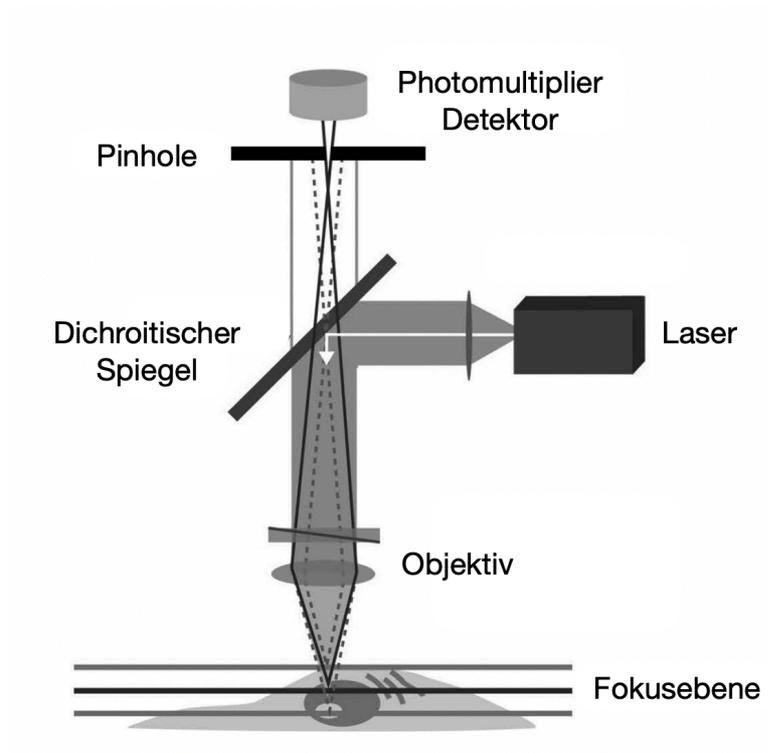
Ein Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 510) kam bei den Messungen in dieser Arbeit im sogenannten Line-Scan-Modus oder im 2D-Modus zum Einsatz und wird im Folgenden erläutert.

### 2.6.1 Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

In einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop tritt das durch einen Laser erzeugte kurzwellige Anregungslicht zuerst durch eine Lochblende und wird danach an einem dichroitischen Spiegel reflektiert. Das reflektierte Licht wird dann auf einen Punkt im zu untersuchenden Objekt fokussiert. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff auf dem Präparat durch das Laserlicht angeregt. Das entstehende Emissionslicht ist langwelliger (wellenlängenverschoben) und kann den dichroitischen Spiegel passieren. Die Lichtstrahlen werden hinter dem Spiegel in einem Fokuspunkt erneut vereint. Über eine weitere Lochblende kann schließlich nur das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht durchtreten (Abb. 2-10).

Das Laserlicht, das auf einen Punkt in der Probe fokussiert wird, ist in der gleichen Ebene (konfokal) mit dem Fokuspunkt, der durch die Lochblende das Emissionslicht zum Detektor mit Photomultiplier zur Signalverstärkung führt (Elliott, 2020; Paddock, 1999). Dadurch wird das Licht außerhalb der konfokalen Fokusebene blockiert. Über eine Größenänderung der

Lochblende kann die Menge an Fluoreszenzlicht variiert werden, die detektiert wird. Das hat zur Folge, dass bei einer weiter gestellten Lochblende mehr Fluoreszenzlicht am Detektor ankommt, was mit einer Abnahme der Auflösung einhergeht (Paddock, 1999).



**Abbildung 2-10 Schematischer Aufbau eines Laser-Scanning-Konfokalmikroskops**

Anregungslicht gelangt über den dichroitischen Spiegel auf die Probe, nicht-fokussierte Emissionsstrahlen gelangen nicht zum Detektor, Emissionsstrahlen aus der Fokusebene werden durch das *Pinhole* zum Detektor geführt.

(Abbildung modifiziert nach (Elliott, 2020))

## 2.6.2 Fluoreszenzindikatoren

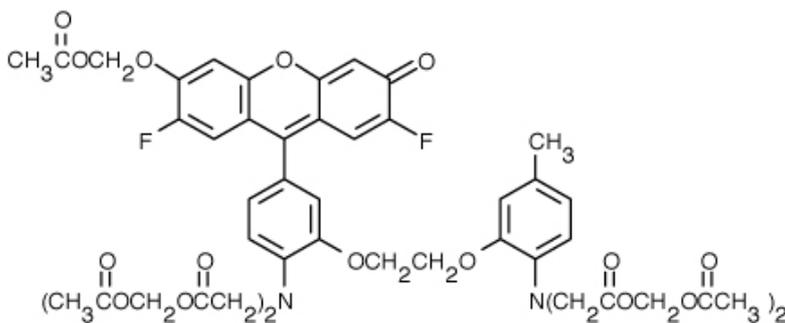
Ca ist als wichtiger universaler sekundärer Botenstoff an der Regulation vieler Zellfunktionen in unterschiedlichen Zellen beteiligt. Heute werden verschiedene Calciumindikatoren verwendet, um die Rolle des Ca in zellulären Prozessen zu untersuchen. Calciumindikatoren wurden in den 1980er Jahren entwickelt, woran maßgeblich der amerikanische Wissenschaftler Roger Y. Tsien beteiligt war. Tsien und Kollegen wurden 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Fluoreszenzindikatoren sind Moleküle, die durch das Binden von Ca fluoreszierende Eigenschaften entfalten. Die heute am meisten verwendeten Indikatoren leiten sich von der Struktur des BAPTA (1,2-bis (o-aminophenoxy) ethan-N, N, N, N' tetraacetat) ab. BAPTA ist ein Ca-affiner Chelatbildner. Calciumindikatoren, die auf der Struktur von BAPTA beruhen, sind unter anderem die Fluo-X-Farbstoffe (z.B. Fluo-3/Fluo-4). Bei diesen Farbstoffen ist die BAPTA-Grundstruktur mit einem auf Fluoreszenz beruhenden Strukturelement verknüpft (Gee et al., 2000; Minta et al., 1989). Dieses trägt unterschiedliche Substituenten und dient als fluoreszierendes Chromophor. Die Fluo-X-Farbstoffe sind nicht-ratiometrische (Einzelwellenlängen) Farbstoffe und zeigen nach der Bindung von Ca eine starke Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Calciumindikatoren haben unterschiedliche physikochemische Eigenschaften, die bei der Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffs für die eigenen Experimente berücksichtigt werden müssen. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  beschreibt die Bindungsaffinität, das bedeutet, wie fest ein Indikator Ca-Ionen binden kann. Der  $K_d$ -Wert entspricht dabei der Ca-Konzentration, bei der die Hälfte der Indikator-moleküle Ca gebunden haben. Die Dissoziationskonstante des verwendeten Calciumindikators sollte daher im Bereich der zu messenden Ca-Konzentrationen liegen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Dissoziationskonstante von einigen Faktoren, wie etwa dem pH-Wert, der Temperatur, der Viskosität, der Ionenstärke oder dem Vorhandensein anderer Ionen beeinflusst wird. Daher können sich die *in vitro* von den *in vivo*  $K_d$ -Werten unterscheiden (Paredes et al., 2008).

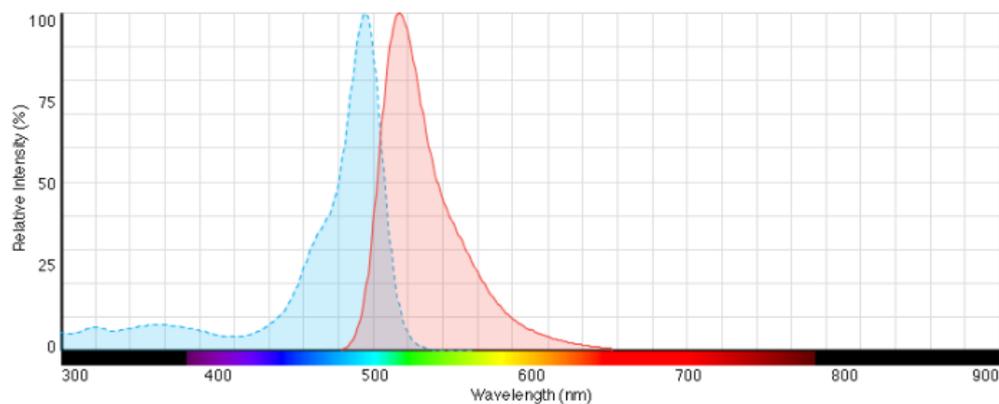
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren Fluo-4 und di-8-ANEPPS. Sie werden im Folgenden vorgestellt.

## 2.6.2.1 Fluo-4:

Der Calciumindikator Fluo-4 (Abb. 2-11) ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff und hat seine Maxima des Absorptions- und Emissionsspektrums ( $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$ ) im Bereich des sichtbaren Lichts (Abb. 2-12). Die Anregung des Farbstoffs erfolgte im Rahmen dieser Arbeit daher durch einen Argon-Laser bei 488 nm und die Detektion der Fluoreszenz bei  $>505 \text{ nm}$ . Fluo-4 weist eine hohe Calciumaffinität mit einem  $K_d$ -Wert von 345 nM (in vitro, 22°C) auf (Gee et al., 2000). In vivo liegt der  $K_d$ -Wert höher ( $\approx 1000 \text{ nM}$ ) als der in vitro gemessene (Ljubojević et al., 2011; Paredes et al., 2008). Durch seinen  $K_d$ -Wert eignet sich der Farbstoff hervorragend für die cytoplasmatischen als auch für die nucleären Calciummessungen am LSM 510, da mit ihm der gesamte Bereich physiologischer Ca-Konzentrationen abgedeckt werden kann ( $\approx 100 \text{ nM}$  bis  $> 2 \mu\text{M}$ ).



**Abbildung 2-11 Strukturformel Fluo-4-AM**



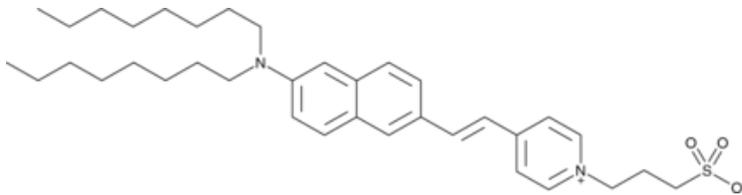
**Abbildung 2-12 Fluoreszenzspektrum von Fluo-4**

Darstellung des Ca-abhängigen Absorptionsspektrums (blaue Kurve) von Fluo-4, Maximum bei 494 nm sowie des Emissionsspektrums (rote Kurve), Maximum bei 516 nm.

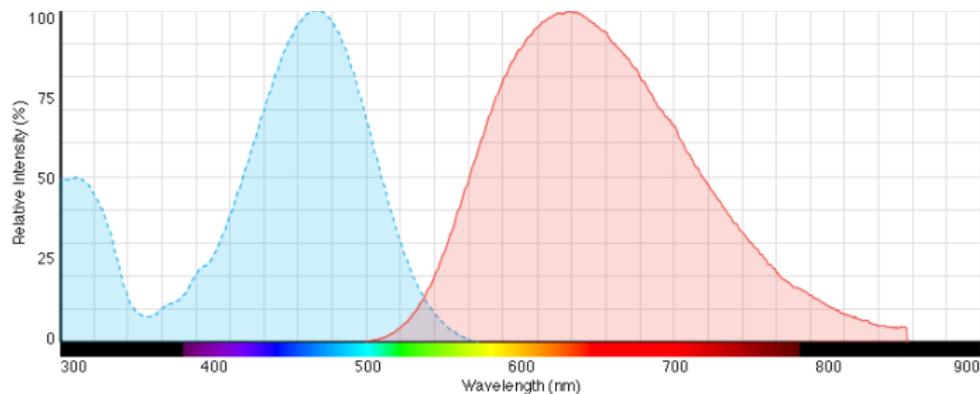
(übernommen aus Molecular Probes Handbuch- Kapitel 19-3)

## 2.6.2.2 Di-8-ANEPPS

Di-8-ANEPPS (Abb. 2-13) gehört zur Klasse der ANEP (Amino Naphthyl Ethenyl Pyridinium)-Farbstoffe. Diese Farbstoffe zeigen in wässrigen Medien nur eine schwache Fluoreszenz. Durch das Binden an lipophile Membranen entwickelt sich eine starke Fluoreszenz. Dadurch eignet sich der Farbstoff zum Abbilden der Zellmembran. Das Absorptionsmaximum liegt bei 467 nm und das Emissionsmaximum bei 631 nm (Abb. 2-14) (Johnson & Spence, 2010). Der Farbstoff wurde mit den gleichen Einstellungen des Argonlasers wie bei Fluo-4 angeregt und zur Darstellung des Sarkolems und der T-Tubuli in den Ventrikelmyozyten genutzt. Dafür wurde das LSM 510 im 2D-Modus betrieben. Außerdem wurden Vorhofmyozyten mit di-8-ANEPPS gefärbt und ebenfalls im 2D-Modus des LSM 510 dargestellt.



**Abbildung 2-13 Strukturformel di-8-ANEPPS**



**Abbildung 2-14 Fluoreszenzspektrum von di-8-ANEPPS**

Absorptionsspektrum (blaue Kurve) von di-8-ANEPPS mit Maximum bei 467 nm und Emissionsspektrum (rote Kurve) mit Maximum bei 631 nm.

(übernommen aus Molecular Probes Handbuch- Kapitel 22-2)

### 2.6.3 Beladen der Zellen mit Fluo-4

Nach dem Ausplattieren der Zellen auf den mit Laminin beschichteten Kulturschälchen wurden die Zellen mit 40 µl Fluo-4-AM-haltiger Lösung (Invitrogen) beladen. In der anionischen Salzform ist Fluo-4 hydrophil und kann folglich die Zellmembran nicht passieren. Aus diesem Grund werden die Carboxylgruppen mit Acetoxymethylestern (AM) maskiert und das Molekül dadurch lipophil. In diesem Zustand kann Fluo-4 die Zellmembran passieren (Paredes et al., 2008). Zunächst wurden die Zellen mit der Farbstofflösung für mindestens 20 Minuten inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Farbstofflösung abpipettiert und durch die Messlösung ersetzt, die für weitere 20 Minuten auf den Zellen verblieb. Während dieser Zeit wurden innerhalb der Zelle die Ester von zelleigenen Esterasen hydrolysiert, so dass das Molekül wieder in seiner Salzform vorlag und die Zellmembran nicht mehr überwinden konnte (Paredes et al., 2008).

Für die Herstellung des Farbstoffs wurde zunächst eine 1 mM Fluo-4-AM-Stammlösung hergestellt. Dazu wurde der Farbstoff in 20 % Pluronic® F-127/DMSO (Invitrogen) gelöst und in 4 µl Aliquots im -20°C Gefrierschrank gelagert. Pluronic ist ein nicht-ionisches Tensid und erhöht die Löslichkeit des Farbstoffes in wässrigen Medien (Johnson & Spence, 2010). Am Messtag wurde die aliquotierte Stammlösung durch die Zugabe von 600 µl Messlösung auf eine Konzentration von 6,6 µM verdünnt und anschließend auf die Zellen gegeben. Der Farbstoff wurde stets unter Ausschluss von Licht gelagert.

### 2.6.4 Beladen der Zellen mit di-8-ANEPPS

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben auf den mit Laminin beschichteten Kulturschälchen ausplattiert. Nach zehn Minuten wurden die Zellen mit di-8-ANEPPS (CAS-Nr.: 157134-53-7; Cayman Chemical) beladen. Dazu wurden 40 µl der Farbstofflösung für zwei Minuten auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurde der Farbstoff abpipettiert und durch die Messlösung ersetzt.

Eine 1 mM di-8-ANEPPS-Stammlösung wurde im Vorhinein hergestellt. Dazu wurde die Substanz in DMSO gelöst und in 5 µl Aliquots im -20°C-Gefrierschrank gelagert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurde diese Stammlösung mit 500 µl Messlösung auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt.

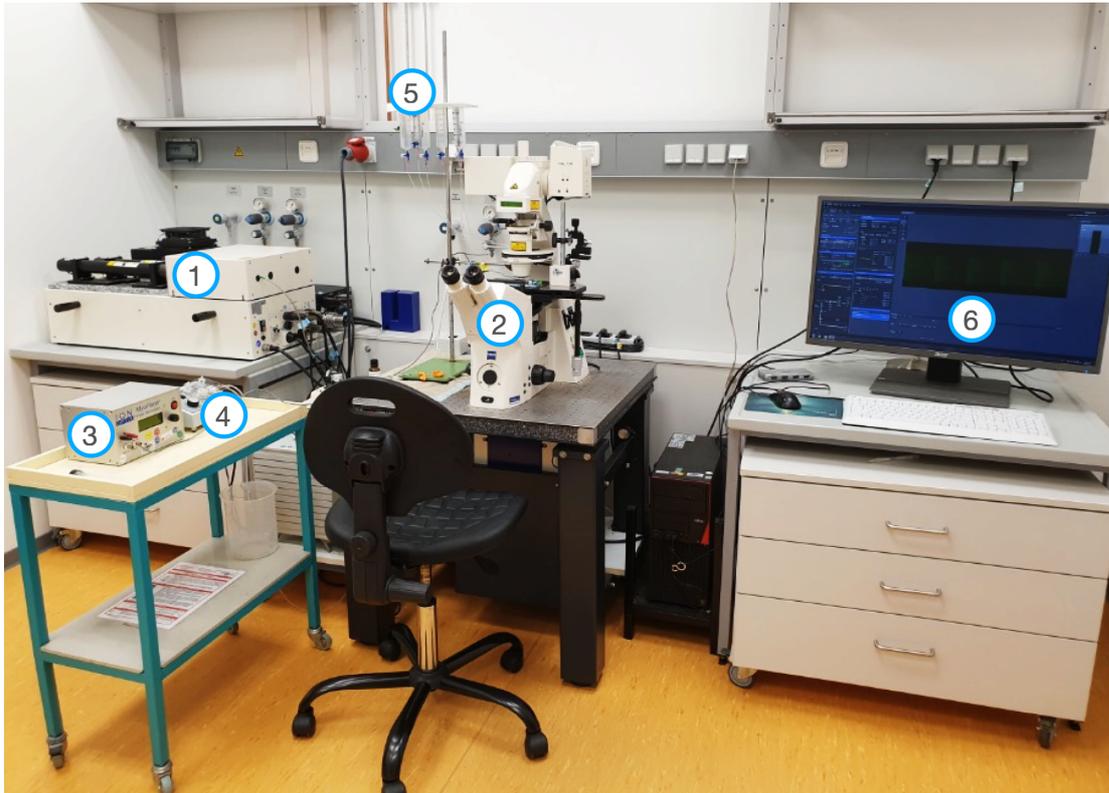
## 2.6.5 Calciummessungen am LSM 510

### 2.6.5.1 Konfokales Linescan-Imaging von cytoplasmatischen und nucleären Calciumtransienten

Subzelluläre Calciumtransienten (CaT), Koffeintransienten sowie der Ca-Einstrom im Rahmen des speichergesteuerten Calciumeinstroms wurden mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 der Carl Zeiss AG aufgenommen (Abb. 2-15). Zur Aufnahme der CaT wurden die Fluo-4-beladenen Zellen mit einem Stimulator (MyoPacer, IonOptix) elektrisch stimuliert. In dem Kulturschälchen, auf dem sich die Zellen befanden, wurden dazu zwei Platinelektroden platziert, an die eine Spannung von 40 V angelegt wurde. Das Kulturschälchen mit den Elektroden wurde schließlich auf dem Mikroskoptisch platziert und über einen Schlauch, der sich ebenfalls am Kulturschälchen befand, mit einem Superfusionssystem (Abb. 2-15) verbunden. Die Zellen konnten hierüber permanent mit Messlösung umspült werden. Eine Pumpe am anderen Ende des Schälchens saugte kontinuierlich die Lösung ab. Je nach Verwendung von Ventrikel- oder Vorhofmyozyten wurden die Zellen mit 1 Hz (Ventrikel) oder 0,5 Hz (Vorhof) zu Beginn der Messungen stimuliert.

Das Mikroskop wurde im Linescan-Modus betrieben. Hierbei wurde die Laserlinie transversal durch die Zelle gelegt. Um cytoplasmatische und nucleäre Transienten gleichzeitig aufzunehmen, wurde diese Linie gezielt durch einen Nucleus gelegt (s. Abb. 3-2). Für die Messungen wurde ein Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Apochromat, 63x/1.4 Oil DIC M27) und ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Detektiert wurde die Fluo-4-Fluoreszenz bei  $>505$  nm.

Im Linescan-Modus wurde die Zelle über eine vorgegebene Zeit bei einer Bildtiefe von 12 bit gescannt. Jede Linie wurde für 3,07 ms gescannt, wobei die Gesamtanzahl der Linien von 1.600 bis 30.000 Linien je nach Protokollabschnitt variierte. Der Durchmesser der Lochblende wurde stets auf  $140 \mu\text{m}$  eingestellt, um eine konfokale Ebene mit einer Schichtdicke von  $1,0 \mu\text{m}$  zu erreichen.



**Abbildung 2-15 Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 der Firma Zeiss**

1. Lasermodul, 2. Axiovert-Lichtmikroskop, 3. Stimulator, 4. Peristaltikpumpe,  
5. Perfusionssystem, 6. Computermonitor mit LSM-Software

#### 2.6.5.2 Messung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (SOCE)

Zunächst wurden die Zellen wie oben beschrieben elektrisch stimuliert. Die Ventrikelzellen wurden mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert, während Vorhofzellen mit 0,5 Hz stimuliert wurden. Nachdem sich ein Gleichgewichtszustand (*steady state*) eingestellt hatte, wurde eine Aufnahme gestartet. Die Stimulation wurde anschließend für eine Minute gestoppt. Am Ende dieser Minute wurde erneut eine Aufnahme mit einer Länge von 1600 Linien (=5 s) gestartet. Aus dieser Aufnahme wurde die Ruhefluoreszenz ( $F_{\text{rest}}$ ) ermittelt. Alle gemessenen Fluoreszenzwerte ( $F$ ) wurden auf diese normalisiert ( $F/F_{\text{rest}}$ ).

Die Stimulation wurde wieder angeschaltet und die Zellviabilität überprüft. Nur Zellen, die hier regelmäßige Ca-Transienten zeigten, wurden für das weitere SOCE-Protokoll verwendet. Als nächstes wurde die Ca-freie Messlösung (Tabelle 2-5) über das Perfusionssystem appliziert und die Zellen damit kontinuierlich umspült. Diese Lösung enthielt stets EGTA, Thapsigargin, KB-R und Verapamil. Für verschiedene Versuchsreihen wurden dieser Lösung die SOCE-Inhibitoren zugesetzt. Die Ca-freie Messlösung wurde für insgesamt drei Minuten appliziert und alle 60 Sekunden wurde jeweils eine Aufnahme über 1600 Linien (=5 s) gestartet. Im Anschluss wurde die Stimulation für eine weitere Minute gestoppt und die Anzahl der Linien

auf 8000 (=24 s) erhöht. Nach Anschalten der Stimulation wurde die Aufnahme gestartet und sofort ein Koffein Bolus in die Messkammer gegeben. Dieser Schritt wurde in einer erneuten Aufnahme über 8000 Linien (=24 s) wiederholt und diente der vollständigen Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher. Nach diesem Schritt wurde die Stimulation für den Rest der Messung gestoppt und nach einer weiteren Pause eine Aufnahme von 1600 Linien begonnen. Direkt im Anschluss wurde die 2 mM Ca-Messlösung über das Perfusionssystem für 90 Sekunden appliziert und der durch SOCE vermittelte Ca-Einstrom aufgenommen. Abschließend wurde eine kurze Aufnahme über 1600 Linien (=5 s) registriert, die zur Auswertung der SOCE-Amplitude herangezogen wurde (Abb. 2-16).

#### 2.6.5.3 Detubulierung von Ventrikelmyozyten

In einer der durchgeführten Versuchsreihen wurde die Lokalisierung der am SOCE-beteiligten Kanäle untersucht. Dazu wurden Ventrikelmyozyten detubuliert. Die isolierten, ausplattierten Ventrikelmyozyten wurden zunächst wie oben beschrieben mit Fluo-4-AM für 20 Minuten beladen. Der Farbstoff wurde im Anschluss abpipettiert und durch Messlösung ersetzt. Danach wurde eine 1,5 M Formamidlösung für 15 Minuten auf die Zellen gegeben, gefolgt von einem Wechsel auf die Messlösung. Die Detubulierung von Ventrikelmyozyten erfolgt aufgrund einer Volumenzunahme der Zellen, die durch die osmotische Wirkung des Formamids zustande kommt. Dabei werden die T-Tubuli physikalisch von der Plasmamembran abgetrennt (Kawai et al., 1999). Die erfolgreiche Detubulierung wurde mittels di-8-ANEPPS-Färbung verifiziert. Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom wurde in detubulierten Zellen mit dem gleichen Messprotokoll wie in den unbehandelten Kontrollzellen gemessen.

#### 2.6.5.4 Konfokale 2D-Aufnahmen des T-tubulären Systems

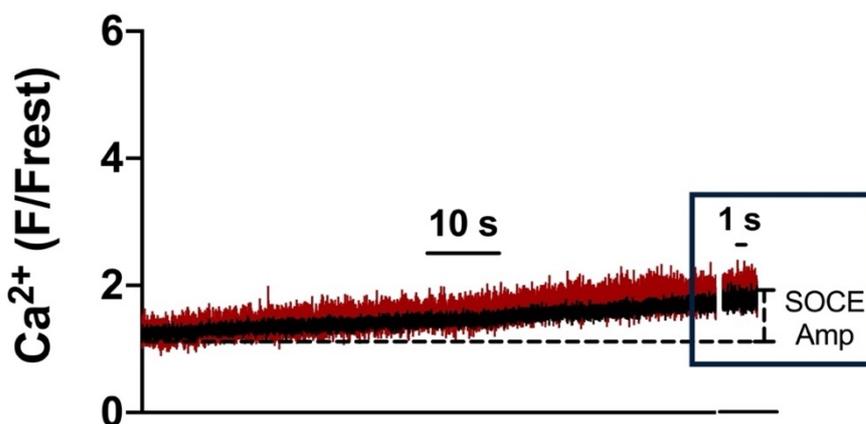
Kontrollzellen sowie detubulierte Ventrikelmyozyten wurden mit 10  $\mu$ M di-8-ANEPPS-Lösung für zwei Minuten beladen und anschließend in Messlösung für weitere zwei Minuten gewaschen. Di-8-ANNEPS ist ein lipophiler Farbstoff, der sich in der Zellmembran anreichert. Die gefärbten Zellen wurden am Konfokalmikroskop im 2D-Modus dargestellt. Ebenso wurden Vorhofzellen dargestellt, die kein regelmäßiges T-tubuläres System aufweisen.

## 2.7 Auswertung der Messungen

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FIJI (ImageJ, Bethesda, USA). Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden zuerst hintergrundkorrigiert. Dazu wurde die Hintergrundfluoreszenz ermittelt und der Wert vom Bild subtrahiert (Process-Subtract Background).

Die zu Beginn des Messprotokolls aufgenommenen Calciumtransienten wurden wie folgt ausgewertet: innerhalb eines Bildes wurde von vier bis fünf Transienten die systolische Fluoreszenz und die diastolische Fluoreszenz des Cytoplasmas und des Nucleus ermittelt und anschließend ein Mittelwert gebildet. Das systolische Calcium entspricht dabei dem Maximum (*peak*) eines Transienten, wohingegen das diastolische Calcium die Grundlinienfluoreszenz, das heißt das basale Fluoreszenzsignal darstellt. Die Differenz bildet die Amplitude des Calciumtransienten. Sowohl die diastolische als auch die systolische Fluoreszenz wurde auf die Ruhefluoreszenz ( $F_{rest}$ ) normalisiert, die während der einmütigen Stimulationspause aufgenommen wurde. Auch für den Koffein-Transienten wurde der Peak ermittelt und die Amplitude (Differenz Peak-Grundlinie) ermittelt.

Zur Auswertung des SOCE wurde die Ruhefluoreszenz vor Umschaltung auf die 2 mM Messlösung bestimmt. Die Zugabe der 2 mM Messlösung erfolgte für 90 Sekunden. Direkt im Anschluss wurde erneut ein Bild mit einer Länge von 1600 Linien (=5 s) aufgenommen. Dieses stellt den Endpunkt der Messung dar. Die cytoplasmatische und nucleäre Fluoreszenz wurde auch hier ermittelt. Die Differenz dieser Fluoreszenz zu der vorher ermittelten Ruhefluoreszenz ergibt das Delta für die SOCE-Amplitude (SOCE Amp, Abb. 2-16).



**Abbildung 2-16 Auswertung der SOCE-Amplitude**

Fluoreszenzspur von Beginn der Zugabe der 2 mM Messlösung (Dauer: 90 s) mit Fluoreszenzspur mit einer Länge von 5 s, die zur Auswertung herangezogen wurde. Die Differenz bildet das Delta für die SOCE-Amplitude (SOCE Amp).

rot= Nucleus, schwarz= Cytoplasma

### 2.7.1 Bildbearbeitung

Die in dieser Arbeit gezeigten Original-Linescan-Abbildungen wurden ebenfalls mit FIJI bearbeitet. Alle Fluoreszenzspuren wurden wie oben beschrieben zuerst hintergrundkorrigiert und anschließend wurde eine Helligkeitsanpassung durchgeführt. Dazu wurde für alle gezeigten Abbildungen der Abbildungsbereich (*Display Range*) modifiziert (*Image-Adjust-Brightness/Contrast-Set Display Range*). Der Display-Bereich ist in der Legende der jeweiligen Abbildungen angegeben. Für alle gezeigten Fluoreszenzspuren wurden die Original-Abbildungen einmal geglättet (*Process-Smooth*).

## 2.8 Western Blot

Western Blot ist eine biochemische Methode, die dem Nachweis sowie der Quantifizierung von Proteinen dient. Dabei werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen (engl.: *blotting*) und anschließend durch eine Antikörperreaktion sichtbar gemacht (Kurien & Scofield, 2006). Zunächst werden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts durch eine Gelelektrophorese (1) aufgetrennt, gefolgt vom Transfer (2) auf eine Nitrozellulosemembran und der anschließenden Detektion (3).

Mittels Western Blot-Untersuchungen wurde die Expression verschiedener Proteine bestimmt. Zum einen wurden die am SOCE-beteiligten Proteine und zum anderen Ca-regulierende Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, untersucht.

Die Western Blot-Untersuchungen wurden mit Ventrikel- und Vorhofmyokard von WKY durchgeführt. Außerdem wurde die Expression von SOCE-Proteinen in WKY- und SHR-Ventrikelmyokard untersucht.

### 2.8.1 Gewebeisolierung

Für die Western Blot-Untersuchungen an Vorhof- und Ventrikelgewebe wurden die linken Vorhöfe und die linken Ventrikel von insgesamt acht WKY isoliert. Das Herz wurde wie zuvor beschrieben aus dem Thorax des Tieres freipräpariert und anschließend kurz in eine Tyrode-Lösung getaucht, um das verbliebene Blut weitestgehend auszuspülen. In einer Petrischale wurden die linken Vorhöfe abgetrennt und in Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden sofort in flüssigen Stickstoff gegeben, so dass das Gewebe schockgefroren wurde. In gleicher Weise wurde mit dem rechten Vorhof verfahren, der im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Das verbliebene Ventrikelgewebe wurde ebenfalls in rechts und links getrennt, in Kryo-Röhrchen überführt und schockgefroren. Die Proben wurden anschließend im -80°C-

Gefrierschrank gelagert. Für die Western Blot-Untersuchungen wurden die linken Vorhöfe und die linken Ventrikel verwendet.

Für die Untersuchungen der linken Ventrikel von WKY und SHR wurde Gewebe verwendet, das bereits durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe isoliert worden war. Dieses Gewebe wurde daher nur noch homogenisiert.

## 2.8.2 Gewebehomogenisierung

Bereits vor der Homogenisierung wurde der Homogenisierungspuffer (Tabelle 2-20) hergestellt. Dieser wurde anschließend in 9,22 ml Aliquots in einem -20°C-Gefrierschrank gelagert.

Während der Homogenisierung können Enzyme (u.a. endogene Proteasen) freigesetzt werden, die zum Abbau oder zur Dephosphorylierung der zu untersuchenden Proteine führen können. Zum Schutz der Proteine wurden daher am Tag der Homogenisierung verschiedene Protease-Inhibitoren (PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A) und Phosphatase-Inhibitoren (NaF, Na-Pyrophosphat,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\beta$ -Glycerolphosphat) in den Puffer gegeben (Tabelle 2-21). Die Inhibitoren der Metalloproteasen, EGTA und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), waren bereits im Homogenisierungspuffer enthalten (Tabelle 2-20).

Die Gewebehomogenisierung wurde von Hand durchgeführt. Dazu wurden die gefrorenen Vorhöfe in die Mörser (Micro tissue grinder, Wheaton UK Limited, Rochdale, Großbritannien) in jeweils 50  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer gegeben. Etwa gleich große gefrorene Stücke des linken Ventrikels wurden in 100  $\mu\text{l}$  Puffer gegeben. Für die Homogenisierung der WKY- und SHR-Ventrikelpuben wurden etwa gleich große Gewebestücke in 100  $\mu\text{l}$  Puffer gegeben.

Mit einem Glaspistill wurde das Gewebe gründlich homogenisiert und anschließend bei 3000 Umdrehungen pro Minute (engl.: *revolutions per minute, rpm*) für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zu dem verbliebenen Gewebe wurde erneut Homogenisierungspuffer gegeben, dieses ebenfalls gründlich gemörsert und anschließend zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde in das gleiche Eppendorfgefäß wie zuvor gegeben. Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis das Gewebe blass und aufgelöst erschien. Alle Schritte der Homogenisierung fanden kontinuierlich auf Eis statt.

Die gesammelten Überstände wurden für drei Minuten bei 13000 rpm erneut zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die folgende Proteinbestimmung wurde hieraus bereits Homogenat entnommen und die Eppendorfgefäße wurden anschließend in den -80°C-Gefrierschrank überführt und dort gelagert.

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
NP-40	1 ml	1 %	Sigma-Aldrich
Glycerol	10 ml	10 %	Roth
NaCl	0,8 g	137 mM	Roth
1 M Tris-HCl	2 ml	20 mM	Roth
$\beta$ -Glycerolphosphat	1,53 g	50 mM	Sigma-Aldrich
EDTA (pH 8)	10 ml	10 mM	Sigma-Aldrich
EGTA (pH 7,4)	1 ml	1 mM	Sigma-Aldrich

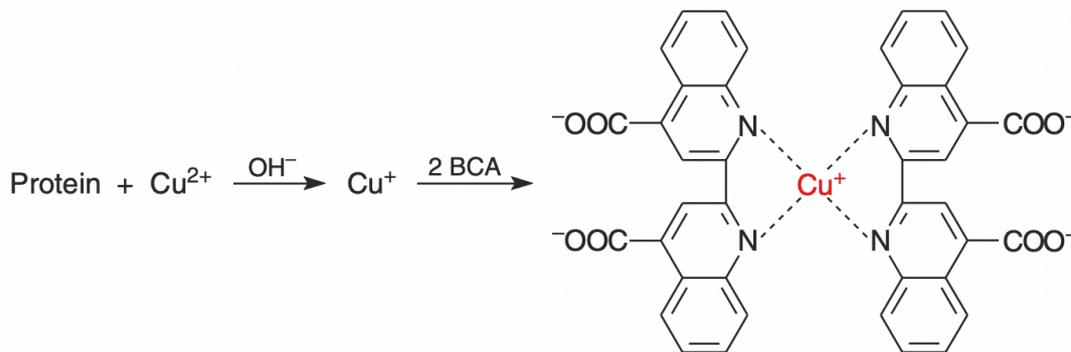
Tabelle 2-20 Homogenisierungspuffer (Lysepuffer), 100 ml

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Aprotinin (4 mg/ml)	10 $\mu$ l	4 $\mu$ g/ml	Roth
Leupeptin (4 mg/ml)	10 $\mu$ l	4 $\mu$ g/ml	Roth
NaF (20 mM)	400 $\mu$ l	20 mM	Sigma-Aldrich
Na-Pyrophosphat (1 mM)	100 $\mu$ l	1 mM	Sigma-Aldrich
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 $\mu$ l	1 mM	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	60 $\mu$ l	4 $\mu$ g/ml	Roth
PMSF	100 $\mu$ l	1 mM	Sigma-Aldrich

Tabelle 2-21 Inhibitoren für den Homogenisierungspuffer, zugegeben zu 9,22 ml Homogenisierungspuffer

### 2.8.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der homogenisierten Proben wurden mittels eines BCA-Assays (Pierce™ BCA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Im BCA-Assay wird die Biuret-Reaktion mit dem selektiven kolorimetrischen Nachweis von Kupfer (Cu)-Ionen durch Bicinchoninsäure (BCA) kombiniert. Der BCA-Test wurde erstmals von Smith et al. (1985) beschrieben. Die Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Die Peptidbindungen des Proteins bilden unter alkalischen Bedingungen einen Komplex mit Kupfer-Ionen (Biuret-Reaktion). Dabei wird  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Im zweiten Schritt bilden zwei BCA-Moleküle mit dem reduzierten  $\text{Cu}^+$  einen violetten Komplex (Abb. 2-17). Der Komplex ist wasserlöslich und kann bei einer Wellenlänge von 562 nm, dem Absorptionsmaximum des Komplexes, nachgewiesen werden (Kurreck et al., 2022; Smith et al., 1985)



**Abbildung 2-17 BCA-Reaktion**

$\text{Cu}^{2+}$  wird zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und bildet mit zwei BCA-Molekülen einen violetten Komplex

(Abbildung übernommen aus (Kurreck et al., 2022), Bioanalytik 4. Auflage, Kapitel 3)

Zu Beginn wurde die BSA-Verdünnungsreihe (Tabelle 2-22) hergestellt. Dazu wurden zunächst 50 µl eines Albuminstandards (2 mg/ml) (Thermo Scientific) mit 50 µl Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Anschließend wurde daraus die BSA-Standardkurve hergestellt.

<b>BSA</b>	<b>BSA (1mg/ml)</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O (µl)</b>	<b>Homogenisierungspuffer (µl)</b>
0	0	18	2
0,1	2	16	2
0,2	4	14	2
0,4	8	10	2
0,6	12	6	2
0,9	18	0	2
1	20	0	0

**Tabelle 2-22 BSA-Standardkurve**

Für die Proteinbestimmung wurden die Homogenate zunächst mit Homogenisierungspuffer um den Faktor 50 verdünnt. Dazu wurde zu 1 µl Homogenat 49 µl Homogenisierungspuffer gegeben. Für das BCA-Assay wurden die 1:50 verdünnten Proben anschließend mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O und 200 µl BCA-Reagenz zusammengegeben. Ebenso wurde mit der BSA-Standardkurve verfahren. Das BCA-Reagenz wurde zuvor hergestellt, wobei das Reagenz A mit dem Reagenz B im Verhältnis 1:50 vermischt wurde. Die Proben und die BSA-Standardkurve wurden im Anschluss für 30 Minuten bei 60°C inkubiert, wobei sich die violetten Komplexe entwickelten. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben auf Eis gegeben wurden. 100 µl der Probe wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte (Roche, Applied Science, Deutschland) pipettiert und die Absorption mit dem FluoStar OPTIMA Plate Reader (BMG Labtech, Offenbach) bei 562 nm bestimmt. Die BSA-Standardkurve wurde gemeinsam mit den Proben vermessen, so dass hieraus anschließend die Proteinkonzentration berechnet werden konnte. Alle Proben und die BSA-Standardkurve wurden in doppelter Ausführung vermessen und der Mittelwert für die Berechnungen herangezogen.

Die Proben wurden schließlich mit Homogenisierungspuffer auf eine Endkonzentration von 2,5 µg/µl verdünnt und bis zur Verwendung im -80°-Gefrierschrank gelagert.

## 2.8.4 Probenvorbereitung und Beladung der Geltaschen

Zur Probenvorbereitung wurden die auf 2,5 µg/µl verdünnten Homogenate aus dem -80°C-Gefrierschrank entnommen und weiter auf Eis gekühlt. In jede Tasche der Gradientengele (4-20 %, Mini-Protean TGX, Biorad, München) wurden 20 µg Probe gegeben. Dazu wurden 8 µl Homogenat mit 8 µl Homogenisierungspuffer und 4 µl Lämmli-Puffer (Tabelle 2-23) vermischt und im Anschluss zentrifugiert. Der Lämmli-Puffer wurde bereits im Voraus hergestellt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Das im Lämmli-Puffer enthaltene anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) überdeckt die Eigenladungen der Proteine und sorgt für eine konstante negative Ladungsverteilung. Vor dem Zusammenmischen mit dem Homogenat wurde dem Lämmli-Puffer 5% β-Mercaptoethanol zugesetzt. Dieses ist ebenso wie Dithiothreitol (Tabelle 2-23) ein Reduktionsmittel und reduziert die Disulfidbrücken im Protein. Die Gradientengele wurden aus dem Kühlschrank entnommen und die Taschen mit Elektrophoresepuffer (engl.: *running buffer*; Tabelle 2-24) luftblasenfrei aufgefüllt. In die erste Tasche eines Gels wurde ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific), auch Proteinleiter genannt, gegeben. Durch diesen kann das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins abgeschätzt werden und der Fortschritt der Auftrennung kontrolliert werden. Für die Untersuchungen an Vorhof- und Ventrikelgewebe wurden im Wechsel je eine Ventrikel- und eine Vorhofprobe in die Taschen gegeben. Durch diese Auftragsweise, konnten jeweils vier Vorhof- und vier Ventrikelproben auf einem Gel abgebildet werden.

Für den Vergleich zwischen WKY- und SHR-Ventrikelgewebe wurden jeweils vier WKY-Proben neben vier SHR-Proben in die Gele gegeben.

Substanz	Menge	Endkonzentration
EGTA	3,2 ml	16 mM
20 % SDS-Lösung	4 ml	4 %
1 M Tris HCl (pH 6,8)	800 µl	40 mM
1 M Dithiothreitol (DTT)	320 µl	16 mM
Glycerol	9,4 ml	47 %
1 % Bromphenolblau	1 ml	0,05 %
Vor der Zugabe von Glycerol und Bromphenolblau wurden 1,28 ml ddH <sub>2</sub> O hinzugegeben.		

**Tabelle 2-23 4 x Lämmli Puffer, 20 ml**

### 2.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, die der Auftrennung von denaturierten Proteinen dient (Laemmli, 1970).

Die mit den Proben befüllten Gele wurden in einen Tank (Mini-Trans Blot Cell, BioRad, Deutschland) gegeben, der bis zur Markierung mit dem Elektrophoresepuffer (Tabelle 2-24) aufgefüllt wurde. Eine Spannung von 90 V wurde für 30 Minuten angelegt, gefolgt von einer Spannung von 120 V für weitere 50 Minuten. Die Auftrennung wurde in regelmäßigen Abständen optisch kontrolliert. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde die Elektrophorese gestoppt und die Gele vorsichtig aus den Glasplatten befreit.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris-Base	30,2 g	0,25 M
Glycin	144 g	1,9 M
SDS	10 g	1 %
1 x Elektrophoresepuffer: 100 ml 10 x Elektrophoresepuffer + 900 ml ddH <sub>2</sub> O		

**Tabelle 2-24 10 x Elektrophoresepuffer, 1000 ml**

### 2.8.6 Transfer

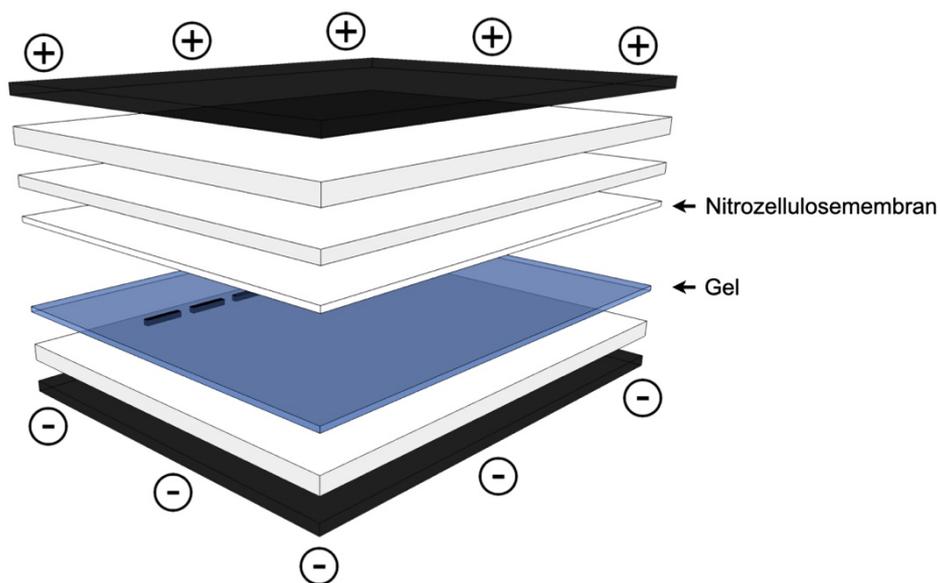
Mittels des Nass-Elektrotransferverfahrens wurden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (BioRad) übertragen. Dazu wurde eine Nass-Elektroblotkammer von BioRad verwendet.

Aus dem 10 x Transferpuffer (Tabelle 2-25), der bereits im Vorhinein hergestellt wurde, wurde zunächst ein 1 x Transferpuffer hergestellt. Diesem wurde 20% Ethanol zugesetzt, um eine effektive Bindung der Proteine an die Membran zu erreichen. Der Puffer wurde bis zur Verwendung bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Die Nitrozellulosemembranen wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zehn Minuten in kaltem Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde dann luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Eingebettet zwischen zwei Schwämmen wurde das Gel mit der Membran auf ein dickes Filterpapier platziert und auf die Nitrozellulosemembran wurde ein dünnes Filterpapier, gefolgt von einem weiteren dicken Filterpapier gelegt (Abb. 2-18). Dieses sogenannte Sandwich wurde dann in einem Gehäuse in der Blotkammer befestigt. Die Schwämme und Filterpapiere wurden ebenfalls zuvor in Transferpuffer getränkt. In die Kammer wurde ein Kühlelement sowie ein Rührfisch gegeben und anschließend mit Transferpuffer bis zur Markierung aufgefüllt. Der Elektrotransfer fand in

einer Kühlkammer (4°C) statt. Dazu wurde zuerst ein Stromfluss von 100 mA/Gel angelegt und dieser nach zwei Stunden auf 20 mA/Gel über Nacht reduziert.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris-Base	39,4 g	0,33 M
Glycin	144 g	1,92 M
<b>1 x Transferpuffer:</b> 100 ml 10 x Transferpuffer + 200 ml Ethanol + 700 ml ddH <sub>2</sub> O		

**Tabelle 2-25 10 x Transferpuffer, 1000 ml**



**Abbildung 2-18 Schematischer Aufbau eines Western Blots**

Darstellung des Sandwich-Blots: das Gel und die Nitrozellulosemembran liegen eingebettet zwischen dünnen und dicken Filterpapieren sowie zwei Schwämmen. Die Proteine im Gel folgen dem elektrischen Feld und werden auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

### 2.8.7 Proteindetektion

Nach dem Transfer wurden am nächsten Tag die Membranen aus dem Sandwich befreit und in Ponceau-Rot gegeben. Dadurch kann die Effektivität des Transfers beurteilt werden. Danach wurde die Membran auf einer Höhe von  $\approx 55\text{-}60$  kDa auf der Proteinleiter geschnitten, damit mehrere Proteine unterschiedlicher Größe mit einem Western Blot-Durchlauf detektiert werden konnten. Dieser Schritt ermöglichte es, die Ladekontrolle (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) und das zu untersuchende Proteine gleichzeitig zu detektieren (GAPDH  $\approx 35$  kDa, unterer Teil der geschnittenen Membran; TRPC-Isoformen  $\approx 100$  kDa, STIM1  $\approx 100$  kDa oder RyR  $\approx 565$  kDa, oberer Teil der geschnittenen Membran). Die Membranen wurden anschließend dreimal für zehn Minuten in TBST (*Tris-buffered saline Tween*; Tabelle 2-26) gewaschen. In der Zwischenzeit wurde eine Lösung aus 5% Milchpulver in TBST hergestellt, die nach dem Waschen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membranen gegeben wurde. Dabei wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert, so dass es zu keinen unspezifischen Bindungen der Antikörper auf die Membran kommen konnte. Nach dem Blocken wurden die primären Antikörper auf die Membranen gegeben (Tabelle 2-27). Diese wurden unter stetigem Schwenken über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen erneut dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen, ehe der Zweitantikörper (Tabelle 2-28) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Membranen inkubiert wurden. Die Zweitantikörper waren Meerrettich-Peroxidase konjugiert (engl.: *horseradish-peroxidase*, HRP). Nach der Sekundärantikörperinkubation wurde abschließend  $3 \times 10$  Minuten mit TBST gewaschen.

Zur Detektion wurden die Membranen mit dem Chemolumineszenz-Reagenz (HRP Juice Plus, PJK GmbH, Deutschland) für ca. eine Minute inkubiert. Für einige Proteine wurde das sensitivere Reagenz Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde am Chemidoc-XRS-System (BioRad, Deutschland) dargestellt. Dabei wurden die Proteine bei unterschiedlichen Belichtungszeiten sichtbar gemacht. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Substanz	Menge (20x TBS)	Endkonzentration (1x TBST)
NaCl	198,2 g	170 mM
Tris Base	24,2 g	10 mM
6 M HCl	q.s. zur pH-Wert-Einstellung	
<b>TBST-Puffer:</b> 50 ml 20 x TBS, 950 ml ddH <sub>2</sub> O + 1 ml Tween 20		

**Tabelle 2-26 20 x TBS-Puffer (1000 ml, pH 7,5)**

Protein	Bezeichnung Antikörper	Hersteller, Katalognummer	Wirtsspezies	Verdünnung
GAPDH (≈35 kDa)	Anti-GAPDH Mouse mAB (6c5)	Calbiochem, #CB1001	Maus	1:50000
TRPC1 (≈100 kDa)	Anti-TRPC1 Antibody	Alomone, #ACC-010	Kaninchen	1:1000
TRPC3 (≈100 kDa)	Anti-TRPC3 Antibody	Alomone, #ACC-016	Kaninchen	1:1000
TRPC4 (≈100 kDa)	Anti-TRPC4 Antibody	Alomone, #ACC-018	Kaninchen	1:500
TRPC6 (≈100 kDa)	Anti-TRPC6 Antibody	Alomone, #ACC-017	Kaninchen	1:500
STIM1 (≈100 kDa)	Anti-STIM1 Antibody	Thermo Scientific, #MA1-19451	Maus	1:1000
RyR (≈565 kDa)	Anti-RyR mAB (C3-33)	Thermo Scientific, #MA3-916	Maus	1:5000

Tabelle 2-27 Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung Antikörper	Hersteller, Katalognummer	Verdünnung
Immunopure Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated	Thermo Scientific, #31430	1:5000
Immunopure Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated	Thermo Scientific, #31460	1:5000

Tabelle 2-28 Verwendete Sekundärantikörper

### 2.8.8 Auswertung der Western Blots

Die Bilder der Blots wurden mit FIJI (ImageJ) ausgewertet. Dazu wurde für die einzelnen Banden die Intensität bestimmt. Für die Untersuchungen zwischen Vorhof- und Ventrikelproben wurden die gemittelten Intensitäten der Banden der Ventrikelproben, die vorher auf GAPDH normalisiert wurden, auf einen Wert von 1 gesetzt. Die Vorhofbanden wurden ebenfalls auf GAPDH normalisiert und anschließend in Relation zu den Ventrikelproben ausgewertet. Für die Bestimmung der Expression eines Proteins wurden jeweils acht Ventrikel- und acht Vorhofproben zusammen analysiert.

Bei den Untersuchungen der Ventrikelproben von WKY und SHR wurden die gemittelten Intensitäten der WKY-Proben auf GAPDH normalisiert und auf einen Wert von 1 gesetzt. Die Intensitäten der SHR-Proben (ebenfalls auf GAPDH normalisiert) wurden dazu in Relation betrachtet. Auch hier wurden jeweils acht WKY-Proben und acht SHR-Proben analysiert.

## 2.9 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung geprüft und, sofern die Daten normal verteilt waren, wurden die Unterschiede zwischen zwei Datensätzen mit einem gepaarten oder ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Test bewertet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Wilcoxon- oder Mann Whitney-Test verglichen. Bei Mehrfachvergleichen wurde die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-hoc-Test durchgeführt. Die Korrelationsanalysen wurden mithilfe des Spearman-Tests durchgeführt. Im Falle einer signifikanten Korrelation zwischen zwei Parametern wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die verwendeten statistischen Tests sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

Da die Daten der funktionellen Ca-Messungen überwiegend nicht normalverteilt waren, sind diese als Scatter-Dot-Plots und als Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Statistik wird als Median mit den 25/75% Perzentilen (Interquartilsabstand, IQR) angegeben. Unterschiede wurden als statistisch signifikant (\*) angesehen, wenn  $P < 0,05$ . Die Anzahl der Zellen ist als "n" und die Anzahl der Tiere als "N" angegeben.

Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen sind als Balkendiagramme mit Scatter-Dots dargestellt und die Daten werden mit Angabe des Mittelwertes  $\pm$  Standardfehler (SEM) präsentiert.

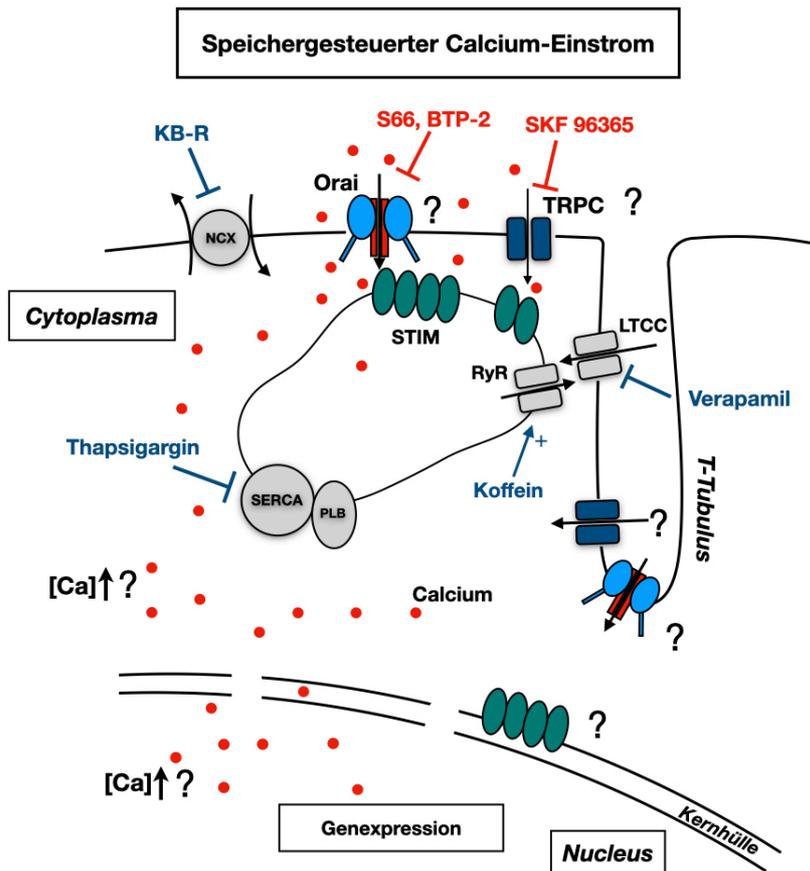
### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den speichergesteuerten Calcium-Einstrom (SOCE) und dessen Einfluss auf das Kerncalcium in adulten Kardiomyozyten zu charakterisieren. Dazu wurden isolierte Ventrikel- und Vorhofmyozyten von WKY im Alter von 12-16 Wochen verwendet. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der SOCE in isolierten Ventrikelmyozyten von SHR untersucht. Diese dienten als pathologisches Modell für eine linksventrikuläre Hypertrophie. Außerdem wurde Vorhof- und Ventrikelgewebe von WKY sowie Ventrikelgewebe von WKY und SHR verwendet, um die Expression der am SOCE beteiligten Proteine zu bestimmen. Die Charakterisierung des SOCE wurde in sechs Abschnitte gegliedert.

(1) Zu Beginn wurde ein Messprotokoll in Ventrikelmyozyten von WKY etabliert. Dieses diente als Grundlage für alle folgenden Versuchsteile. Die mit Hilfe dieses Messprotokolls erhobenen Daten wurden zur (2) Charakterisierung der Regulation des cytoplasmatischen und des nucleären Calciums durch den SOCE in Ventrikelmyozyten herangezogen.

(3) Anschließend wurde in einer weiteren Versuchsreihe der SOCE im Cytosol und im Nucleus von Ventrikelmyozyten aus SHR untersucht. (4) Danach kamen verschiedene Inhibitoren zur pharmakologischen Charakterisierung der am SOCE beteiligten Proteine (Orai, TRPC) zum Einsatz. (5) Um die zelluläre Lokalisation der SOCE-Kanäle in Ventrikelmyozyten zu beurteilen, wurde der SOCE in detubulierten Ventrikelmyozyten untersucht. (6) Schließlich wurde der SOCE auch im Cytoplasma und Nucleus von Vorhofmyozyten charakterisiert und ebenfalls pharmakologisch untersucht.

Die zu untersuchenden Aspekte sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Die Abbildung zeigt schematisch einen Ventrikelmyozyten mit Proteinen, die zur elektromechanischen Kopplung (z.B. LTCC, SERCA) beitragen, neben den mutmaßlich am SOCE beteiligten Proteinen. Außerdem sind alle eingesetzten pharmakologischen Substanzen abgebildet, deren Einsatz im Folgenden erläutert wird.



**Abbildung 3-1 Schematische Darstellung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms, der mutmaßlich beteiligten Proteine und der eingesetzten Pharmaka**

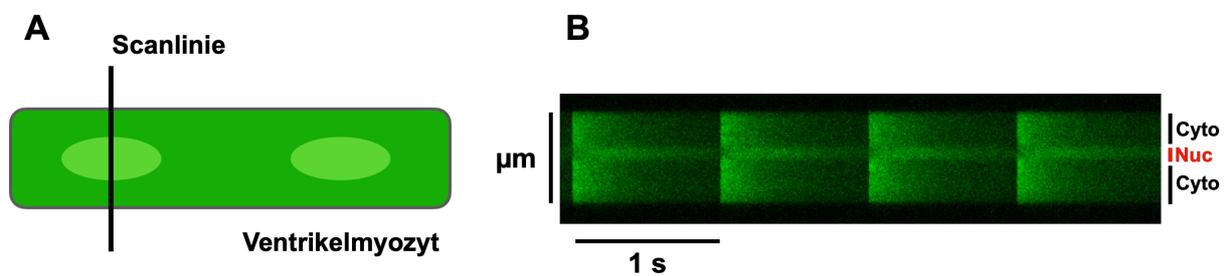
Ca-regulierende Proteine (LTCC, RyR, SERCA, PLB, NCX) sind grau hinterlegt, Proteine des SOCE sind farblich markiert (Orai: hellblau/rot, TRPC: dunkelblau, STIM: grün). Calcium-Ionen sind rot dargestellt. Außerdem sind alle eingesetzten pharmakologischen Substanzen (KB-R, Thapsigargin, Koffein, Verapamil, S66, BTP-2, SKF) und deren Zielproteine abgebildet. Die Fragezeichen zeigen die zu untersuchenden Aspekte.

### 3.1 Charakterisierung des SOCE in adulten Ventrikelmyozyten

#### 3.1.1 Die Erhöhung des extrazellulären Ca löst nach Entleerung der Ca-Speicher in Ca-freier Messlösung den SOCE in Ventrikelmyozyten aus

Zur Messung des SOCE in Ventrikelmyozyten wurde zunächst ein Messprotokoll entwickelt und etabliert. Im Folgendem wird dieses Versuchsprotokoll beschrieben, das zur Charakterisierung des SOCE genutzt wurde und als Grundlage für alle weiteren Versuchsteile diente. Die Ventrikelmyozyten wurden zuerst mit Fluo-4-AM (6,6  $\mu$ M) für 20 Minuten beladen und nach erfolgter Deesterifizierung mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 der Firma Carl Zeiss untersucht. Das Mikroskop wurde dazu im Linescan-Modus betrieben. Die Scanlinie

wurde transversal durch die Zelle gelegt, wobei ein Zellkern geschnitten wurde, so dass eine simultane Aufnahme des cytoplasmatischen und des nucleären Ca möglich war (Abb. 3-2 A). Zu Beginn des Versuchsprotokolls wurden die Zellen mit der Messlösung (ML; 1,5 mM Ca) superfundiert und elektrisch mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. In einem aufgezeichneten CaT korreliert eine erhöhte Fluoreszenz mit einem Konzentrationsanstieg von Ca, so dass das systolische Ca deutlich heller als das diastolische Ca erscheint (Abb. 3-2 B). Die elektrisch stimulierten CaT vom Cytoplasma (Cyto, schwarz) und vom Nucleus (Nuc, rot) unterscheiden sich in wesentlichen Punkten voneinander (Kiess & Kockskämper, 2019). Der nucleäre Transient tritt sowohl verzögert als auch mit einer kleineren Amplitude auf. Dies ist gleichermaßen in der Linescan-Spur (Abb. 3-2 B) und der dazugehörigen normalisierten Fluoreszenzspur ( $F/F_{rest}$ ) zu erkennen (Abb. 3-3 B (a)).



**Abbildung 3-2 Linescan-Modus**

(A) Schematische Darstellung eines Ventrikelmyozyten mit zwei Nuclei. Die Scanlinie wurde transversal durch die Zelle gelegt und dabei ein Zellkern geschnitten. (B) Resultierende Fluoreszenzspur im Linescan-Modus mit zwei cytoplasmatischen Bereichen (Cyto, schwarz) und dem Zellkern (Nuc, rot).

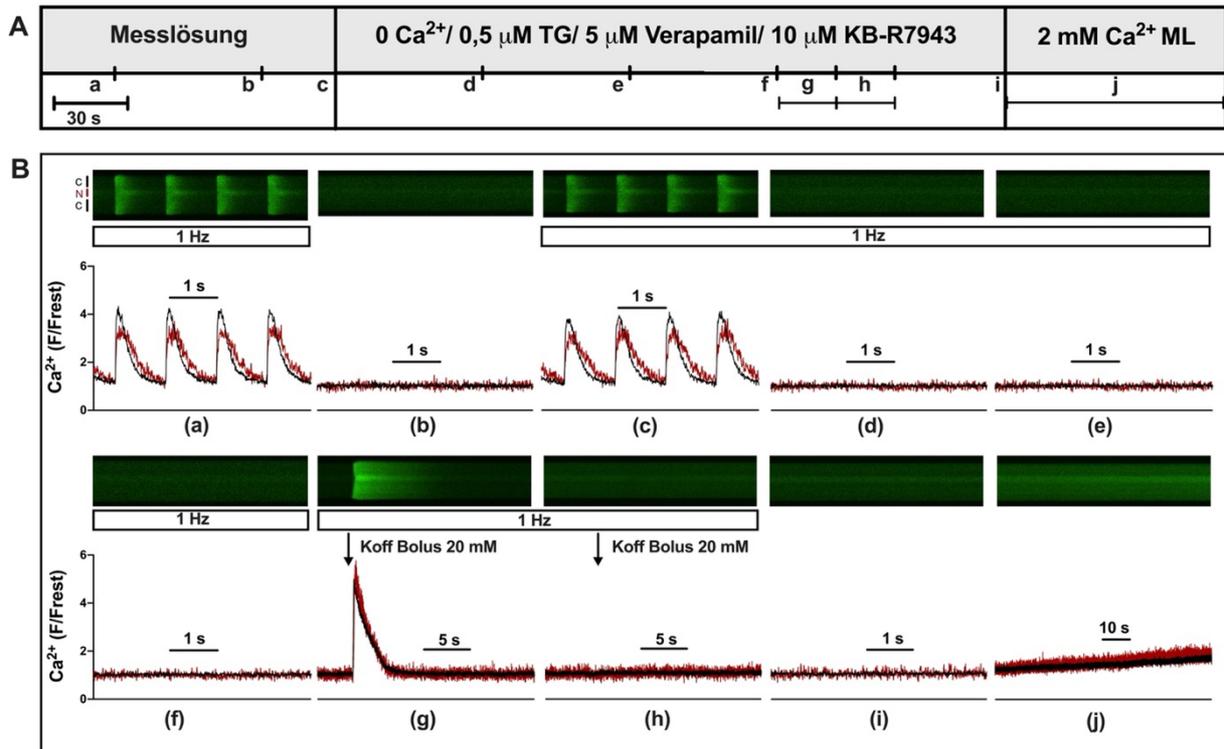
Die Abbildung 3-3 zeigt das gesamte Messprotokoll. In Abbildung 3-3 B sind die Linescan-Aufnahmen mit den zugehörigen Fluoreszenzspuren der einzelnen Protokollabschnitte zu sehen. Zu Beginn wurden elektrisch-stimulierte CaT aufgenommen (Abb. 3-3 B (a)), danach wurde die Stimulation für eine Minute gestoppt (Abb. 3-3 B (b)) und anschließend wieder angeschaltet (Abb. 3-3 B (c)). Mit diesem Schritt wurde die Qualität der Myozyten überprüft. Zeigten sich dort oder schon während der Stimulationspause spontane, arrhythmogene Ca-Erhöhungen, so wurde eine andere Zelle ausgewählt. Außerdem wurde mit dieser Aufnahme die Ruhefluoreszenz ( $F_{rest}$ , Grundfluoreszenz ohne elektrische Stimulation) bestimmt. Die diastolischen und systolischen Fluoreszenzwerte wurden auf  $F_{rest}$  normalisiert und anschließend die CaT-Amplitude berechnet.

Um die intrazellulären Ca-Speicher zur Aktivierung des SOCE zu entleeren, wurden die Zellen nach der Messlösung mit einer Ca-freien Messlösung überspült (Abb. 3-3 B (d-i)). Dieser Lösung war in allen Versuchsteilen der SERCA-Inhibitor Thapsigargin (TG; 0,5  $\mu$ M) zugesetzt

(Abb. 3-1, Abb. 3-3 A). Nach Umschalten auf die Ca-freie Messlösung wurden in einem Abstand von jeweils 60 Sekunden Linescan-Bilder aufgenommen. Während dieser Aufnahmen wurden die Zellen weiter mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Durch die Ca-freie Messlösung sowie die Hemmung der Ca-Wiederaufnahme in das SR verschwanden die cytoplasmatischen und nucleären CaT (Abb. 3-3 B (d-f)). Nach insgesamt drei Minuten wurde die Stimulation gestoppt. Mit dem erneuten Anschalten der Stimulation wurde Koffein (20 mM) als Bolus direkt in die Messkammer gegeben (Abb. 3-1, Abb. 3-3 B (g)). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt (Abb. 3-3 B (h)). Der erste Koffeinbolus führte dabei zur Freisetzung des gesamten verbliebenen SR-Ca-Gehalts. Der zweite Koffeinbolus löste keine weitere Ca-Erhöhung aus.

Um einen möglichen Einfluss der nicht am SOCE-beteiligten Proteine, wie dem LTCC oder dem NCX, auszuschließen, wurden Hemmstoffe dieser Proteine während des Versuchsprotokolls appliziert (Abb. 3-1). Zusätzlich zum Thapsigargin war der Ca-freien Messlösung daher 5  $\mu$ M Verapamil und 10  $\mu$ M KB-R7943 zugesetzt (Abb. 3-3 A, B (d-i)). Beide Proteine können unter bestimmten Bedingungen einen Ca-Einstrom durch eine Erhöhung der extrazellulären Ca-Konzentration fördern. Unter physiologischen Bedingungen arbeitet der NCX überwiegend im Vorwärtsmodus (Na-Influx, Ca-Efflux). Bei einer niedrigen extrazellulären Ca-Konzentration und/ oder einer hohen intrazellulären Na-Konzentration kann der NCX aber auch im Rückwärtsmodus (Na-Efflux, Ca-Influx) arbeiten und Ca bei einem folgenden Anstieg der extrazellulären Konzentration in die Zelle pumpen. Der Inhibitor KB-R7943 blockiert vorzugsweise den Rückwärtsmodus und wurde aus diesem Grund der Ca-freien Messlösung zugesetzt (Satoh et al., 2000).

Nach erfolgreicher Speicherentleerung wurde die Stimulation abgestellt und nach einer Minute eine erneute Aufnahme gestartet (Abb. 3-3 B (i)). Im Anschluss wurden die Myozyten mit der 2 mM Ca-Messlösung superfundiert. Die Erhöhung der extrazellulären Ca-Konzentration löste schließlich eine langsame Ca-Erhöhung aus, die als stetiger Fluoreszenzintensitäts-Anstieg gemessen werden konnte (Abb. 3-3 B (j)). Diese Ca-Erhöhung war sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus quantifizierbar und diente als Maß für den SOCE.



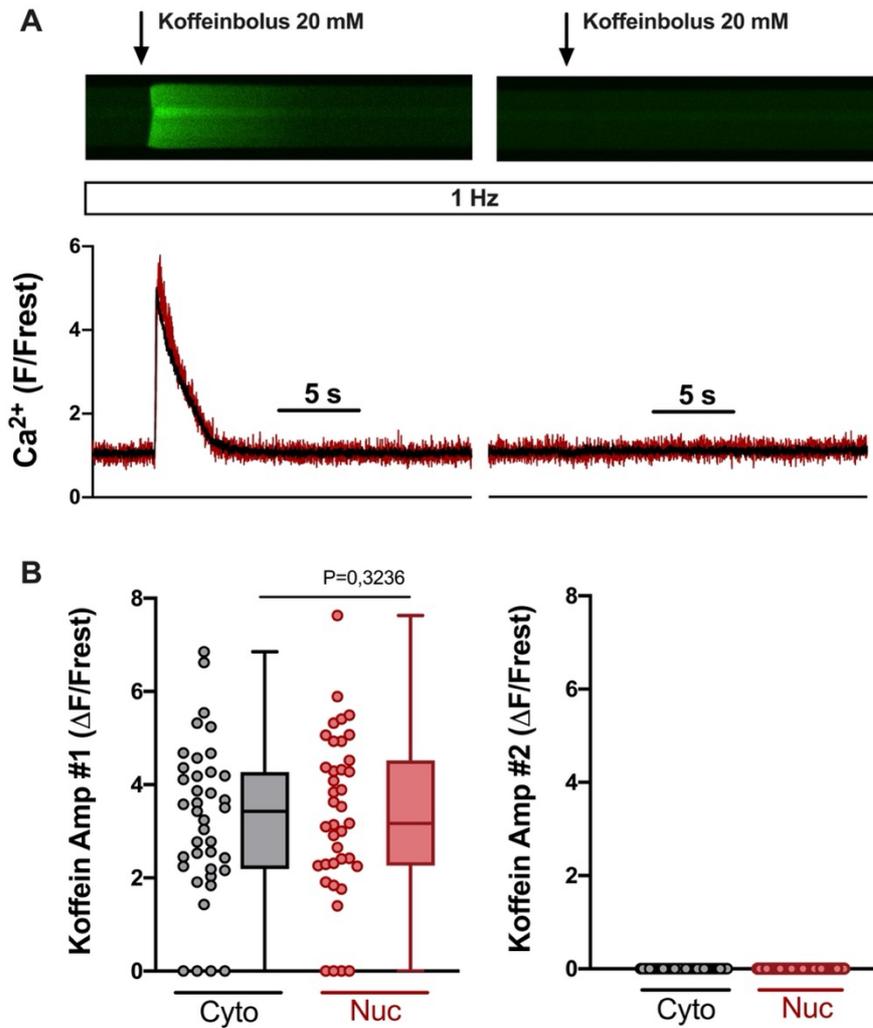
**Abbildung 3-3 Experimentell genutztes Messprotokoll zur Auslösung und Quantifizierung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (SOCE) in Ventrikeldmyozyten**

**(A)** Messprotokoll mit den verschiedenen Lösungen und pharmakologischen Substanzen, die zum Einsatz kamen. **(B)** Repräsentative Original-Linescan-Bilder von cytoplasmatischen (schwarz) und nucleären (rot) CaT bei 1 Hz Stimulation (a, c, d, e, f, g, h) oder bei ausgeschalteter elektrischer Stimulation (b, i, j) mit den zugehörigen, normalisierten Fluoreszenzspuren. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur für die Original-Linescan-Bilder (a), (c) und (g) 0-1200. Für die anderen Original-Bilder beträgt der Display-Bereich 0-800. **(a)** 1 Hz Stimulation, **(b)** Stimmulationspause mit **(c)** folgender Stimulation. **(d-f)** Applikation der Ca-freien-Messlösung mit 0,5 μM Thapsigargin, 5 μM Verapamil und 10 μM KB-R7943 durch das Superfusionssystem. **(g, h)** Zweifache Bolusapplikation von 20 mM Koffein. **(i)** Stimmulationspause. **(j)** Applikation der 2 mM Ca-Messlösung (ML) und Aktivierung des SOCE.

### 3.1.2 SR-Ca-Beladung in Ca-freier Messlösung mit Thapsigargin ermittelt durch Koffein

Zur vollständigen Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher wurde während der Durchführung des Messprotokolls, neben der Gabe von Thapsigargin in einer Ca-freien Messlösung, eine Koffeinelösung (20 mM) als Bolusapplikation auf die Zellen gegeben. Koffein führt zum Öffnen der RyR, wodurch die Freisetzung des gesamten verbliebenen SR-Ca-Gehalts folgt. Daraus resultierte in den meisten Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus eine messbare Ca-Erhöhung. Die Koffein-Bolusapplikation wurde einmal wiederholt. Durch die zweite Applikation wurde überprüft, ob das SR völlig entleert wurde und der SOCE folglich ausgelöst werden konnte. Der Bolus wurde direkt in die Messkammer appliziert, während die Zellen weiter mit der Ca-freien Messlösung umspült und elektrisch mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert wurden. Die Original-Linescan-Bilder der zweifachen Bolusapplikation von Koffein eines Ventrikelmyozyten sind in Abbildung 3-4 A mit den zugehörigen Fluoreszenzspuren abgebildet. In 35 von 39 Zellen führte die erste Koffeingabe zu einer sichtbaren Ca-Erhöhung, wohingegen die zweite Bolusgabe in allen Zellen keinen weiteren Koffeintransienten auslöste. Während die Zellen mit der Ca-freien Messlösung, die Thapsigargin und Verapamil enthielt, überspült wurden, verschwanden die CaT (Abb. 3-3 B (d-f)). Die Bolusgabe von Koffein zeigte, dass trotzdem noch Ca im SR vorhanden war, das mit der ersten Koffeingabe freigesetzt wurde.

Der Median der Amplitude betrug im Cytoplasma für den Koffein-Transienten  $3,43 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,19-4,27  $\Delta F/F_{rest}$ ) und  $3,17 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,26-4,52  $\Delta F/F_{rest}$ ) im Nucleus (Abb. 3-4 B, links). Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Amplituden der cytoplasmatischen und der nucleären Koffeintransienten ( $P=0,3236$ ). Die zweite Bolusapplikation (Abb. 3-4 B, rechts) führte zu keinem weiteren messbaren Koffein-Transienten in allen gemessenen Zellen. Durch die wiederholte Koffeinapplikation war sichergestellt, dass die SR-Ca-Speicher nach der zweiten Koffeingabe vollständig entleert waren.



**Abbildung 3-4 SR-Ca-Beladung in Ca-freier Messlösung mit Thapsigargin ermittelt durch zweimalige Koffeingabe**

**(A)** Repräsentative Original LineScan-Bilder und zugehörige, normalisierte Fluoreszenzspuren während der ersten (links) und der zweiten (rechts) Bolusapplikation von 20 mM Koffein. Dargestellt ist dieselbe Zelle wie in Abb. 3-3 B. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-1200. **(B)** Vergleich der Mediane der cytoplasmatischen (schwarz) und nucleären (rot) Koffein-Amplituden ( $\Delta F/F_{rest}$ ). Die Daten sind als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots dargestellt. Wilcoxon Test; n=39, N=16.

### 3.2 Der cytoplasmatische Calcium-Einstrom durch SOCE erhöht das nucleäre Calcium

Auf Grundlage des zuvor beschriebenen Protokolls wurde der Effekt des SOCE auf das Kerncalcium bestimmt. Aus der Beziehung zwischen cytoplasmatischen und nucleärem Ca können wichtige Rückschlüsse auf die nucleäre Ca-Regulation gezogen werden.

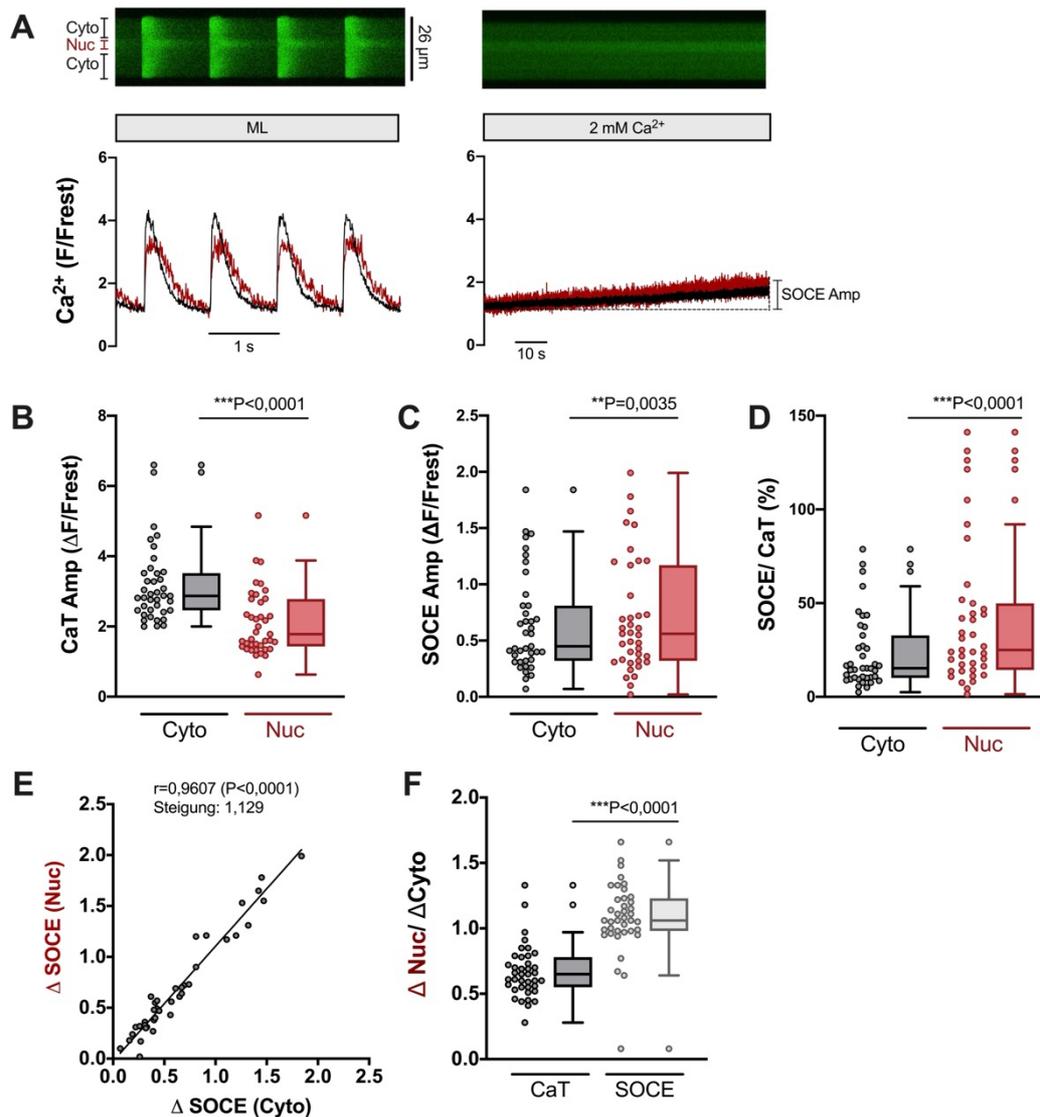
Für die Versuche wurde die Scanlinie wie zuvor gezeigt transversal durch die Zelle platziert und dabei ein Zellkern geschnitten. Folglich wurden cytoplasmatische und nucleäre Regionen simultan aufgenommen. In Abbildung 3-5 A (links) ist ein Original-Linescan-Bild mit der zugehörigen, normalisierten Fluoreszenzspur dargestellt, die cytoplasmatische und nucleäre CaT bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigt. Rechts ist ein Original-Linescan-Bild mit normalisierter Fluoreszenzspur des SOCE dargestellt. Der Anstieg des nucleären Fluoreszenzsignals im Original-Linescan-Bild der CaT und der normalisierten, nucleären Fluoreszenz ( $F/F_{rest}$ ) traten mit einer Verzögerung auf. Der nucleäre CaT war kleiner als der cytoplasmatische CaT, wohingegen die nucleäre SOCE-Amplitude größer als die cytoplasmatische war.

Die Ergebnisse von 39 Zellen sind in Abbildung 3-5 B-D dargestellt. Die Daten werden als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots präsentiert. Es wurden die Mediane der CaT-Amplituden ( $\Delta F/F_{rest}$ ), der SOCE-Amplituden ( $\Delta F/F_{rest}$ ) und der relativen SOCE-Amplituden normiert auf den CaT derselben Zelle (im Folgenden normierte SOCE-Amplitude genannt) jeweils im Cytoplasma (Cyto, schwarz) und im Nucleus (Nuc, rot) verglichen. Bei diesem Vergleich waren die CaT-Amplituden im Zellkern signifikant kleiner als im Cytoplasma ( $P < 0,0001$ ), wohingegen die SOCE-Amplituden im Nucleus signifikant größer waren als im Cytoplasma ( $P = 0,0035$ ). In insgesamt 39 Zellen betrug der Median der CaT-Amplitude (Abb. 3-5 B) im Cytoplasma  $2,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,46-3,52 \Delta F/F_{rest}$ ) und im Nucleus  $1,78 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,43-2,78 \Delta F/F_{rest}$ ). Der Median der SOCE-Amplitude (Abb. 3-5 C) betrug  $0,45 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32 - 0,81 \Delta F/F_{rest}$ ) im Cytoplasma vs.  $0,56 \Delta F/F_{rest}$  ( $0,32-1,17 \Delta F/F_{rest}$ ) im Nucleus oder  $15,3 \%$  (IQR  $10,1-32,8 \%$ ) im Cytoplasma vs.  $25,0 \%$  (IQR  $14,3-49,9 \%$ ) im Nucleus ( $P < 0,0001$ ), wenn die normierten SOCE-Amplituden betrachtet wurden (Abb. 3-5 D).

In Abbildung 3-5 E ist die nucleäre SOCE-Amplitude als Funktion der cytoplasmatischen SOCE-Amplitude in einem Kern-Cyto-Diagramm aufgetragen. Aus diesem Diagramm können Informationen über die Regulation des nucleären SOCE gezogen werden. Mittels einer Korrelationsanalyse nach Spearman wurde eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,9607$  zwischen dem cytoplasmatischen SOCE und dem nucleären SOCE ermittelt. Es wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die resultierende Regressionsgerade graphisch dargestellt. Die Regressionsgerade hatte eine Steigung von  $1,129$ . Daraus folgt eine lineare Beziehung zwischen dem cytoplasmatischen

und dem nucleären SOCE. Das Diagramm und die Analysen deuten darauf hin, dass eine lineare Beziehung zwischen dem cytoplasmatischen und dem nucleären SOCE besteht.

Die Abbildung 3-5 F zeigt im Vergleich die Mediane der Kern-Cyto-Verhältnisse ( $\Delta_{\text{nuc}}/\Delta_{\text{cyto}}$ ) der CaT-Amplituden (links) und der SOCE-Amplituden (rechts). Da die nucleäre CaT-Amplitude kleiner als die cytoplasmatische war, wurde ein Kern-Cyto-Verhältnis für die CaT-Amplituden von  $<1$  ermittelt. Aus der Abbildung geht eine Verschiebung des Verhältnisses zu Werten von  $\geq 1$  für die SOCE-Amplituden hervor, was eine größere relative SOCE-Amplitude im Kern anzeigt. Die Erhöhung des Kern-Cyto-Verhältnisses betrug dabei  $\approx 63\%$  (von  $0,65 F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$  (IQR  $0,55-0,78 F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ) für die CaT-Amplitude auf  $1,06 F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$  (IQR  $0,98-1,23 F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ) für die SOCE-Amplitude;  $P < 0,0001$ ).



**Abbildung 3-5 Der SOCE im Cytoplasma und im Nucleus von Ventrikelmyozyten**

(A) Original-Linescan-Bilder von vier elektrisch-stimulierten CaT sowie des SOCE mit den zugehörigen, normalisierten Fluoreszenzspuren. Dargestellt ist dieselbe Zelle wie in Abb. 3-3. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-800. (B) Vergleich der Mediane der CaT-Amplituden, (C) der SOCE-Amplituden und (D) der normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma (schwarz) und Zellkern (rot) (E) Auftragung der nucleären SOCE-Amplitude ( $\Delta$ SOCE) als Funktion der cytoplasmatischen SOCE-Amplitude ( $\Delta$ SOCE; Spearman Korrelation;  $r=0,9607$ ). (F) Vergleich der Mediane der Kern-Cyto-Verhältnisse der CaT-Amplituden (schwarz) und der SOCE-Amplituden (grau). Wilcoxon Test, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n=39$ ,  $N=16$ .

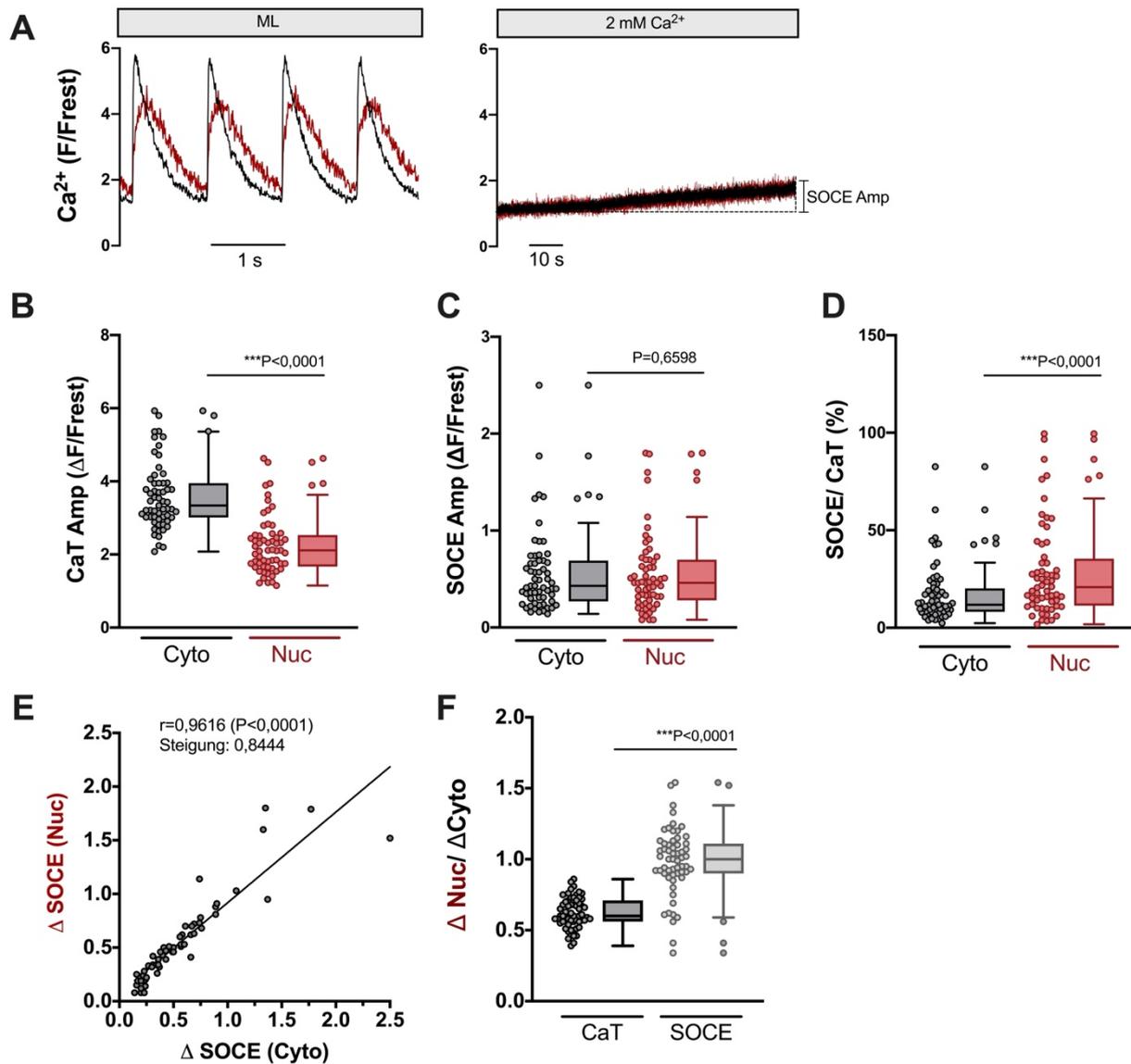
### 3.3 SOCE in Ventrikelmyozyten spontan-hypertensiver Ratten (SHR)

Untersuchungen haben gezeigt, dass die molekularen Komponenten des speichergesteuerten Calcium-Einstroms eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzhypertrophie einnehmen können (vgl. Kapitel 1.5.3). Um den SOCE in einem Hypertrophie-Modell zu untersuchen, wurden spontan-hypertensive Ratten (SHR) im Alter von 12-16 Wochen verwendet. Dazu wurde das in Kapitel 3.1.1 beschriebene Versuchsprotokoll angewendet. Zu Beginn des Versuchsprotokolls wurden elektrisch-stimulierte CaT aufgezeichnet. Die Abbildung 3-6 A (links) zeigt vier elektrisch-stimulierte, cytoplasmatische (schwarz) und nucleäre (rot) CaT sowie die cytoplasmatische und nucleäre Fluoreszenzspur der SOCE-Amplitude eines SHR-Ventrikelmyozyten. Der Vergleich der Mediane ist in Abbildung 3-6 B für die CaT-Amplituden, in 3-6 C für die SOCE-Amplituden und in 3-6 D für die normierten SOCE-Amplituden graphisch dargestellt. Die Daten sind als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots dargestellt.

Der Median der CaT-Amplituden betrug für die Ventrikelmyozyten der SHR im Cytoplasma  $3,34 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $3,01-3,95 \Delta F/F_{rest}$ ) und im Nucleus  $2,11 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,67-2,53 \Delta F/F_{rest}$ ) und war damit im Cytoplasma signifikant größer als im Zellkern ( $P < 0,0001$ ; Abb. 3-6 A, B). Die SOCE-Amplituden zeigten hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Cytoplasma und Nucleus (Cytoplasma:  $0,43 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,27-0,69 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Nucleus  $0,46 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,28-0,70 \Delta F/F_{rest}$ );  $P = 0,6598$ ). Die normierten SOCE-Amplituden wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Cytoplasma und Zellkern auf (Cytoplasma:  $11,9\%$  (IQR  $8,2-20,3\%$ ) vs. Nucleus  $20,9\%$  (IQR  $11,3-35,5\%$ );  $P < 0,0001$ ). Die normierten SOCE-Amplituden waren damit im Zellkern  $\approx 75\%$  größer als im Cytoplasma.

Die Beziehung zwischen dem cytoplasmatischen SOCE und dem nucleären SOCE wurde mittels einer linearen Regressionsanalyse ermittelt und die resultierende Regressionsgerade graphisch in einem Kern-Cyto-Diagramm in Abbildung 3-6 E dargestellt. Die Datenpunkte zeigten im Diagramm eine lineare Beziehung und bildeten eine Gerade mit einer Steigung von  $0,8444$ . Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,9616$ , was eine starke, positive Korrelation zwischen dem cytoplasmatischen und dem nucleären SOCE zeigt. Die Ergebnisse legen eine direkte Abhängigkeit des nucleären SOCE vom cytoplasmatischen SOCE nahe, ähnlich wie in den WKY-Ventrikelmyozyten.

Der Medianvergleich der Kern-Cyto-Verhältnisse ( $\Delta Nuc/\Delta Cyto$ ) für die CaT-Amplituden und für die SOCE-Amplituden ist in Abbildung 3-6 F dargestellt. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den WKY-Myozyten beobachtet. Bei dem Vergleich zeigte sich eine Erhöhung des Kern-Cyto-Verhältnisses für die SOCE-Amplitude im Vergleich zur CaT-Amplitude um  $\approx 67\%$  (von  $0,60 F_{nuc}/F_{cyto}$  (IQR  $0,56-0,71 F_{nuc}/F_{cyto}$ ) für die CaT-Amplitude auf  $1,0 F_{nuc}/F_{cyto}$  (IQR  $0,90-1,11 F_{nuc}/F_{cyto}$ ) für die SOCE-Amplitude;  $P < 0,0001$ ).



**Abbildung 3-6** Der SOCE im Cytoplasma und im Nucleus von SHR-Ventrikelmyozyten

(A) Normalisierte Fluoreszenzspuren von vier CaT und von der durch die Ca-Erhöhung verursachten SOCE-Amplitude. (B) Vergleich der Mediane der CaT-Amplituden, (C) der SOCE-Amplituden und (D) der normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma (schwarz) und Zellkern (rot). (E) Auftragung des nucleären SOCE ( $\Delta$ SOCE) als Funktion des cytoplasmatischen SOCE ( $\Delta$ SOCE; Spearman-Korrelation,  $r=0,9616$ ). (F) Vergleich der Mediane der Kern-Cyto-Verhältnisse der CaT-Amplituden (schwarz) und der SOCE-Amplituden (grau). Wilcoxon Test \*\*\*P<0,001; n=59, N=16.

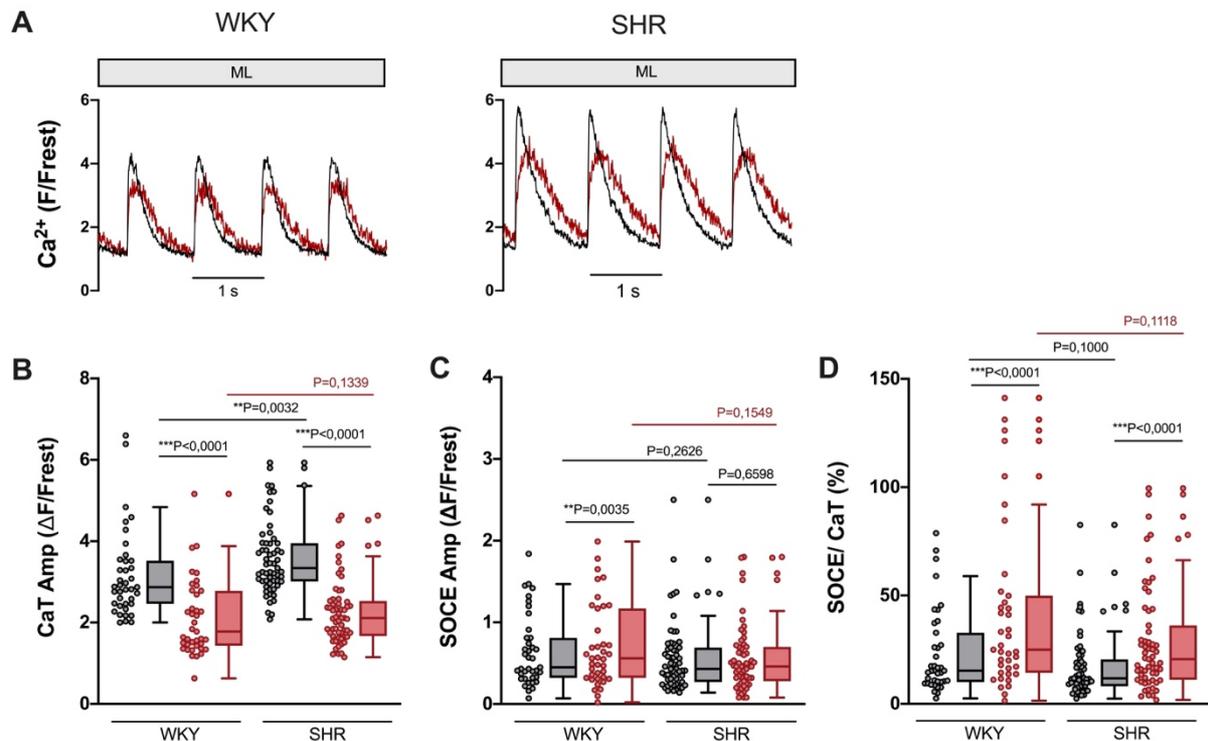
### 3.3.1 Vergleich des SOCE zwischen WKY- und SHR-Ventrikeldomyozyten

Die für die Charakterisierung des SOCE verwendeten Ratten (WKY und SHR) waren 12-16 Wochen alt. Die SHR befanden sich daher am Beginn der Entwicklung einer Herzhypertrophie (Plačkić et al., 2016). Studien an Ventrikeldomyozyten von SHR haben gezeigt, dass die CaT in diesen Zellen größere Amplituden im Vergleich zu Myozyten der WKY haben (Chen-Izu et al., 2007; Plačkić et al., 2016).

Die Abbildung 3-7 zeigt den Vergleich der funktionellen CaT- und SOCE-Messungen von WKY- und SHR-Ventrikeldomyozyten. Dabei sind unter 3-7 A die Fluoreszenzspuren von jeweils vier CaT von WKY- und SHR-Ventrikeldomyozyten abgebildet. In Abbildung 3-7 B-D sind im Vergleich die Daten aus den Abbildungen 3-5 und 3-6 dargestellt. Verglichen wurden die Mediane der CaT-Amplituden, der SOCE-Amplituden sowie der normierten SOCE-Amplituden.

Die im Vergleich zu WKY-Ventrikeldomyozyten größeren CaT-Amplituden der SHR-Myozyten konnten auch in den Versuchen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 3-7 A, B). Der direkte Vergleich der Mediane zeigt, dass die CaT-Amplituden im Cytoplasma  $\approx 16\%$  und im Zellkern  $\approx 19\%$  größer als die der WKY-Myozyten waren (Cyto WKY:  $2,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,46-3,52 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Cyto SHR:  $3,34 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $3,01-3,95 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,0032$ ; Nuc WKY:  $1,78 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,43-2,78 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Nuc SHR:  $2,11 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,67-2,53 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,1339$ ). In beiden Gruppen waren die cytoplasmatischen CaT signifikant größer als die nucleären CaT ( $P<0,0001$ ). Der Vergleich der cytoplasmatischen SOCE-Amplituden ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen WKY- und SHR-Ventrikeldomyozyten (Median WKY:  $0,45 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-0,81 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. SHR:  $0,43 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,27-0,69 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,2626$ ). Auch die nucleären SOCE-Amplituden unterschieden sich nicht voneinander (WKY:  $0,56 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-1,17 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. SHR:  $0,46 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,28-0,70 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,1549$ ). Ebenso zeigten die normierten SOCE-Amplituden keinen statistisch signifikanten Unterschied. Dies galt gleichermaßen für die cytoplasmatischen normierten SOCE-Amplituden (WKY:  $15,3\%$  (IQR  $10,1-32,8\%$ ) vs. SHR:  $11,9\%$  (IQR  $8,2-20,3\%$ );  $P=0,1000$ ) und für die nucleären normierten SOCE-Amplituden (WKY:  $25,0\%$  (IQR  $14,3-49,9\%$ ) vs. SHR:  $20,9\%$  (IQR  $11,3-35,5\%$ );  $P=0,1118$ ). Die nucleären normierten SOCE-Amplituden waren sowohl in WKY- als auch in SHR-Ventrikeldomyozyten größer als die cytoplasmatischen ( $P<0,0001$ ).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen daher bei Analyse der Ca-abhängigen Fluoreszenz keinen wesentlichen funktionellen Unterschied hinsichtlich des SOCE zwischen WKY- und SHR-Ventrikeldomyozyten.



**Abbildung 3-7 Vergleich von CaT und vom SOCE in Ventrikelmyozyten aus WKY und SHR**

**(A)** Repräsentative, normalisierte Fluoreszenzspuren von jeweils vier CaT eines WKY- und eines SHR-Ventrikelmyozyten. Dargestellt sind die CaT aus den Abbildungen 3-4 und 3-5. **(B)** Medianvergleich der CaT-Amplituden, **(C)** der SOCE-Amplituden und **(D)** der normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma (schwarz) und Zellkern (rot). Verglichen wurden die Daten aus den Abbildungen 3-5 und 3-6. Mann-Whitney/ Wilcoxon Test,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ , WKY:  $n=39$ ,  $N=16$  vs. SHR:  $n=59$ ,  $N=16$ .

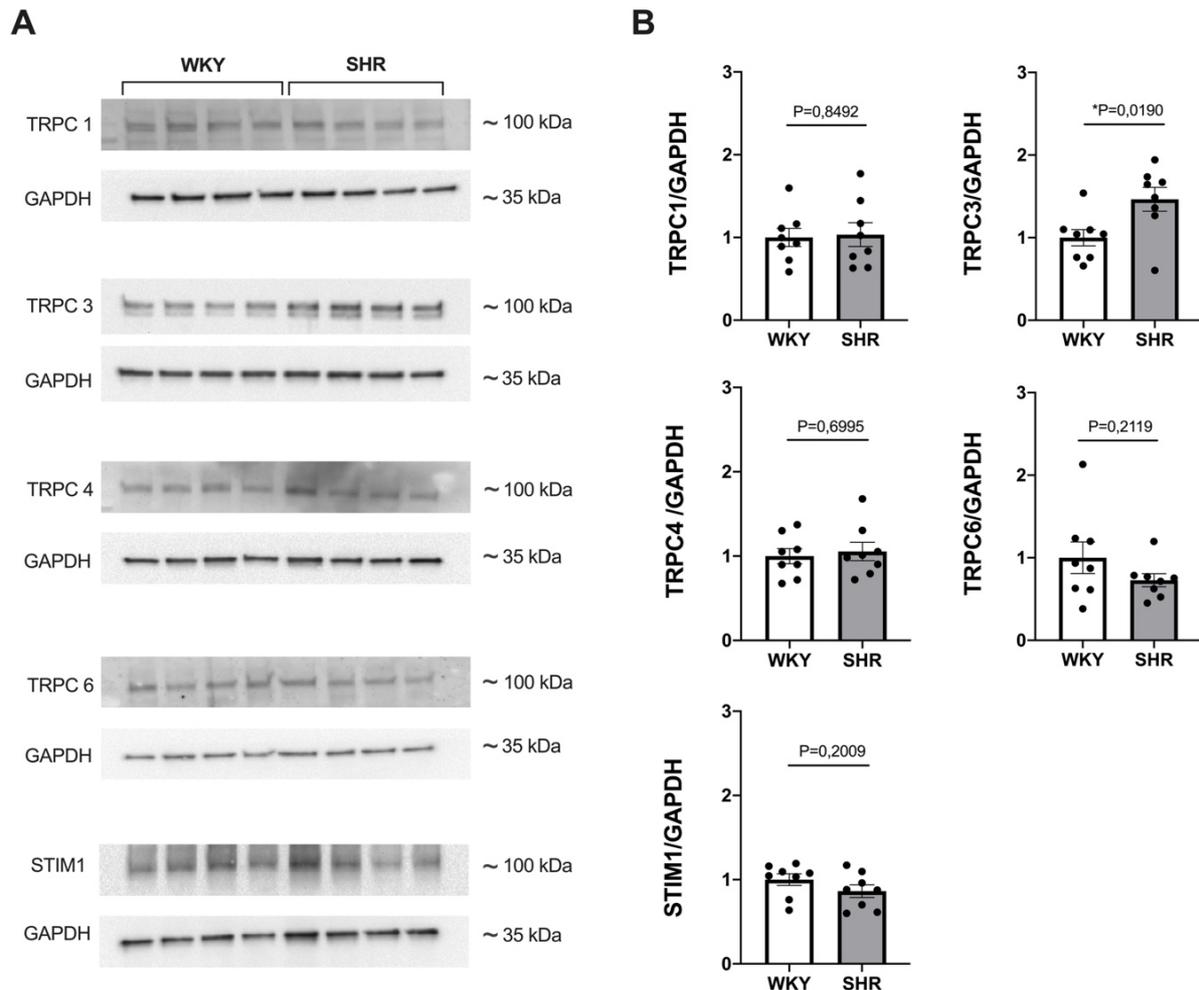
### 3.3.2 Expression von SOCE-Proteinen in linksventrikulärem Gewebe von WKY und SHR

Nach der funktionellen Messung des SOCE in WKY- und SHR-Ventrikelmyozyten wurde anschließend in Western Blot-Untersuchungen die Expression von SOCE-Proteinen in linksventrikulärem (LV) Gewebe von WKY- und SHR-Herzen analysiert. In Abbildung 3-8 A sind die Original-Blots und in 3-8 B die dazugehörigen Ergebnisse dargestellt. Die Expression der SOCE-Proteine der SHR-Gewebe wurde auf die der WKY-Gewebe normalisiert.

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression von TRPC1, 3, 4 und 6 sowie von STIM1 untersucht. Dabei konnten für TRPC1 (WKY:  $1,00 \pm 0,11$  vs. SHR:  $1,04 \pm 0,14$ ;  $P = 0,8492$ ) sowie für TRPC4 (WKY:  $1,00 \pm 0,09$  vs. SHR:  $1,06 \pm 0,11$ ;  $P = 0,6995$ ) keine Unterschiede zwischen WKY und SHR festgestellt werden.

Die Expression von TRPC6 (WKY:  $1,00 \pm 0,19$  vs. SHR:  $0,73 \pm 0,08$ ;  $P=0,2119$ ) und von STIM1 (WKY:  $1,00 \pm 0,07$  vs. SHR:  $0,86 \pm 0,08$ ;  $P=0,2009$ ) war ebenfalls statistisch nicht signifikant verändert. Für TRPC3 konnte hingegen eine erhöhte Proteinexpression im SHR-Gewebe nachgewiesen werden. Die Expression war  $\approx 50\%$  höher als im WKY-Gewebe (WKY:  $1,00 \pm 0,10$  vs. SHR:  $1,46 \pm 0,14$ ;  $P=0,0190$ ).

Die Befunde aus den Western Blot-Untersuchungen zeigen daher – mit Ausnahme von TRPC3 – keine wesentlichen Unterschiede zwischen SHR und WKY.



**Abbildung 3-8 Proteinexpression von TRPC1, 3, 4 und 6 sowie STIM1 in Ventrikelgewebe von WKY- und SHR-Herzen**

(A) Repräsentative Immunoblots von TRPC1, 3, 4 und 6 und STIM1 mit GAPDH als Ladekontrolle. (B) Balkendiagramme der gemittelten Daten der Proteinexpression. Die Proteinexpression wurde auf die GAPDH-Expression normalisiert und die WKY-Daten dienten als Referenz (=100 %).  $N=8/8$  (WKY/SHR); ungepaarter Student t-Test,  $*P<0,05$ .

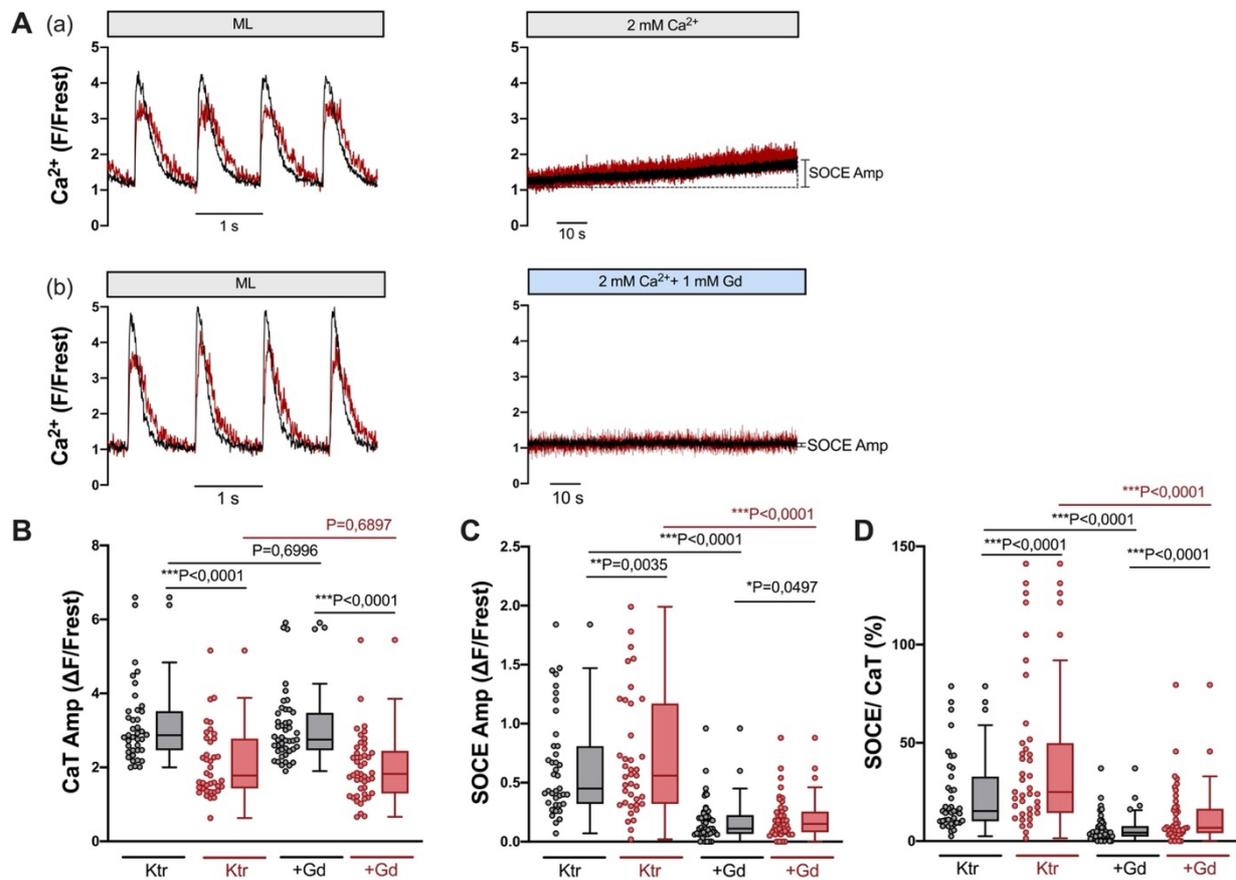
### 3.4 Pharmakologische Untersuchung der am SOCE-beteiligten Kanäle

Nach der Etablierung des Versuchsprotokolls und der Charakterisierung des SOCE unter den Grundbedingungen folgte die pharmakologische Charakterisierung der am SOCE-beteiligten Proteine. Dazu wurde in mehreren Versuchsreihen der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den SOCE untersucht. Zum Einsatz kamen neben dem unspezifischen SOCE-Blocker Gadolinium, die für Orai spezifischen Inhibitoren S66 und BTP-2 sowie der TRPC-Blocker SKF 96365 (SKF) oder eine Kombination aus S66 und SKF.

#### 3.4.1 Gadolinium blockiert den SOCE in Ventrikelmyozyten

Das Versuchsprotokoll zur Messung des SOCE wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Um den Effekt von Gadolinium (Gd) auf den SOCE zu bestimmen, wurde Gd in einer Konzentration von 1 mM zur Ca-freien Messlösung zugegeben. Eine vorherige Zugabe in die physiologische Messlösung wäre nicht möglich gewesen, da Gd ebenfalls LTCC hemmt und die CaT daher unterdrückt hätte. In Abbildung 3-9 sind die Ergebnisse dieser Messreihe dargestellt. Als Kontrollzellen (Ktr) dienten die Zellen, die in Abbildung 3-4 dargestellt sind. Die Abbildung 3-9 A zeigt für die Kontrollgruppe und die mit Gd-behandelte Gruppe jeweils vier CaT und die zugehörigen SOCE-Fluoreszenzspuren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-9 B-D graphisch als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots dargestellt. Verglichen wurden die Mediane der CaT-Amplituden, der SOCE-Amplituden und der normierten SOCE-Amplituden. Die CaT-Amplituden der beiden Gruppen wiesen keine Unterscheide auf. Sowohl die CaT-Amplitude im Cytoplasma (Median Ktr:  $2,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,46-3,52 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Gd:  $2,75 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,46-3,48 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,6996$ ) als auch die im Nucleus (Median: Ktr:  $1,78 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,43-2,78 \Delta F/F_{rest}$ ), Gd:  $1,82 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,29-2,45 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,6897$ ) waren vergleichbar. Die cytoplasmatischen CaT-Amplituden waren in beiden Gruppen signifikant größer als die nucleären ( $P<0,0001$ ). Nach der Zugabe von Gd waren die SOCE-Amplituden im Cytoplasma und im Nucleus hingegen deutlich vermindert. Die SOCE-Amplitude sank deutlich um  $\approx 75\%$  im Cytoplasma von  $0,45 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-0,81 \Delta F/F_{rest}$ ; Ktr) auf  $0,11 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,07-0,23 \Delta F/F_{rest}$ ; Gd;  $P<0,0001$ ). Im Nucleus war die Amplitude ebenfalls deutlich um  $\approx 75\%$  vermindert von  $0,56 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-1,17 \Delta F/F_{rest}$ ; Ktr) auf  $0,15 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,08-0,26 \Delta F/F_{rest}$ ; Gd;  $P<0,0001$ ). Die SOCE-Amplitude war damit nach Gd-Behandlung im Zellkern immer noch größer als im Cytoplasma ( $P=0,0497$ ). Beim Vergleich der normierten SOCE-Amplituden zeigte sich ebenfalls der inhibitorische Effekt des Gd sowohl für das Cytoplasma (Median Ktr:  $15,3\%$  (IQR  $10,1-32,8\%$ ) vs. Gd:  $4,3\%$  (IQR  $2,4-7,7\%$ )) als auch für den Nucleus (Median Ktr:  $25\%$  (IQR  $14,3-49,9\%$ ) vs. Gd:  $6,8\%$  (IQR  $4,0-16,5\%$ ))

deutlich, da die CaT-Amplituden unverändert blieben und die SOCE-Amplituden deutlich verkleinert waren ( $P < 0,0001$ ).



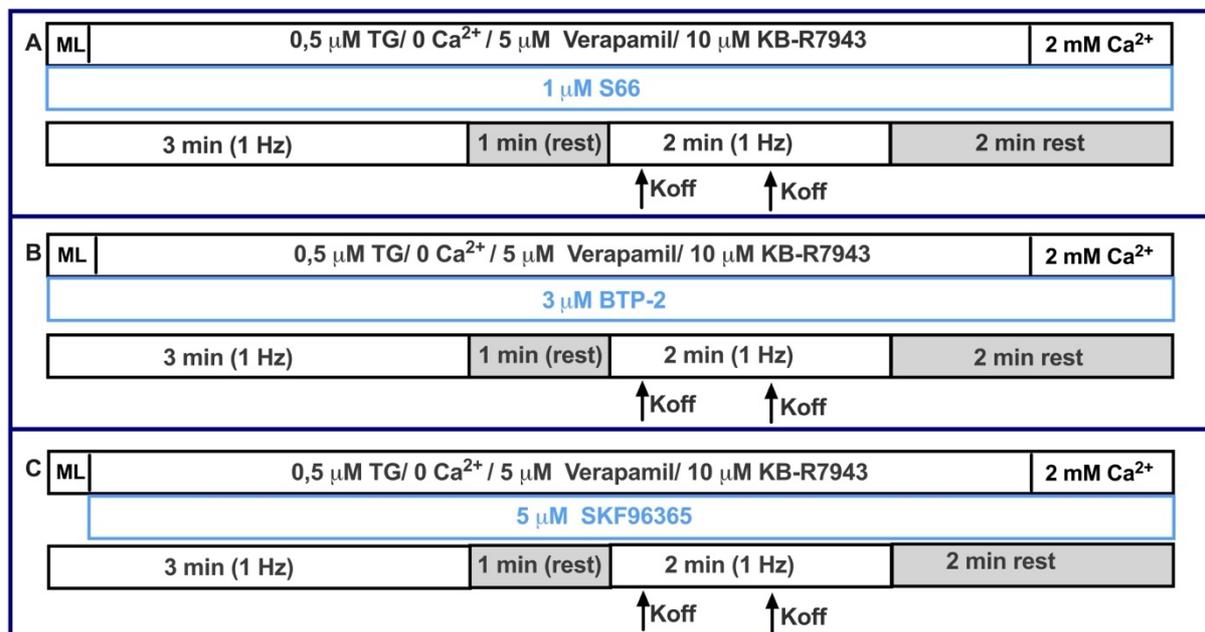
**Abbildung 3-9 Gadolinium hemmt den SOCE in Ventrikelmiozyten**

**(A)** Repräsentative, normalisierte Fluoreszenzspuren von vier CaT und der zugehörigen SOCE-Amplitude eines Kontrollmyozyten (a) und einer Gd-behandelten Zelle (b). Dargestellt ist dieselbe Kontrollzelle wie in Abb. 3-5 A. **(B)** Vergleich der Mediane der CaT-Amplituden, **(C)** der SOCE-Amplituden und **(D)** der normierten SOCE-Amplituden. Die Wirkung des Gd auf den SOCE wurde mit den Kontrollzellen aus Abb. 3-4 verglichen. Mann-Whitney/ Wilcoxon Test,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ ; Ktr:  $n=39$ ;  $N=16$ ; Gd:  $n=45$ ;  $N=8$ .

### 3.4.2 Orai- und TRPC-Kanäle tragen zum SOCE in Ventrikelfmyozyten bei

Die molekularen Komponenten des SOCE sind STIM1, Orai- und TRPC-Kanäle. Gd ist ein unspezifischer Blocker von Kationenkanälen, der sowohl Orai- als auch TRPC-Kanäle als auch weitere Kanäle blockiert. In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit der gemessene langsame Ca-Anstieg durch Orai- und/oder TRPC-Kanäle vermittelt wurde. Zu diesem Zweck wurde eine pharmakologische Strategie verwendet und drei verschiedene, häufig verwendete SOCE-Inhibitoren eingesetzt. Diese waren S66 (1  $\mu\text{M}$ ), BTP-2 (3  $\mu\text{M}$ ) und SKF96365 (SKF, 5  $\mu\text{M}$ ) (Sabourin et al., 2011, 2016a; Touchberry et al., 2011). S66 und BTP-2 blockieren bevorzugt Orai-Kanäle, wohingegen SKF ein Blocker von TRPC-Kanälen ist (Abb. 3-1).

Das zuvor beschriebene Versuchsprotokoll zur Auslösung des SOCE wurde auch in dieser Versuchsreihe verwendet, wobei die Zellen für eine vollständige Wirkung mit S66 oder BTP-2 vorinkubiert wurden (vgl. Kapitel 2.5.6). Dazu wurden die Inhibitoren in die Messlösung gegeben und diese Lösung bereits während der Deesterifizierung des Farbstoffs auf die Zellen gegeben. Die pharmakologischen Substanzen wirkten folglich von Beginn an und damit während des gesamten Versuchsprotokolls auf die Zellen ein. Die Versuchsprotokolle für die verschiedenen Inhibitoren sind in Abbildung 3-10 dargestellt. Für die Kontrollzellen wurden Lösungen verwendet, denen die gleiche Menge an DMSO zugesetzt wurde, wie in den Lösungen der Inhibitoren enthalten war.



**Abbildung 3-10 Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle mit Einsatz der verschiedenen SOCE-Inhibitoren**

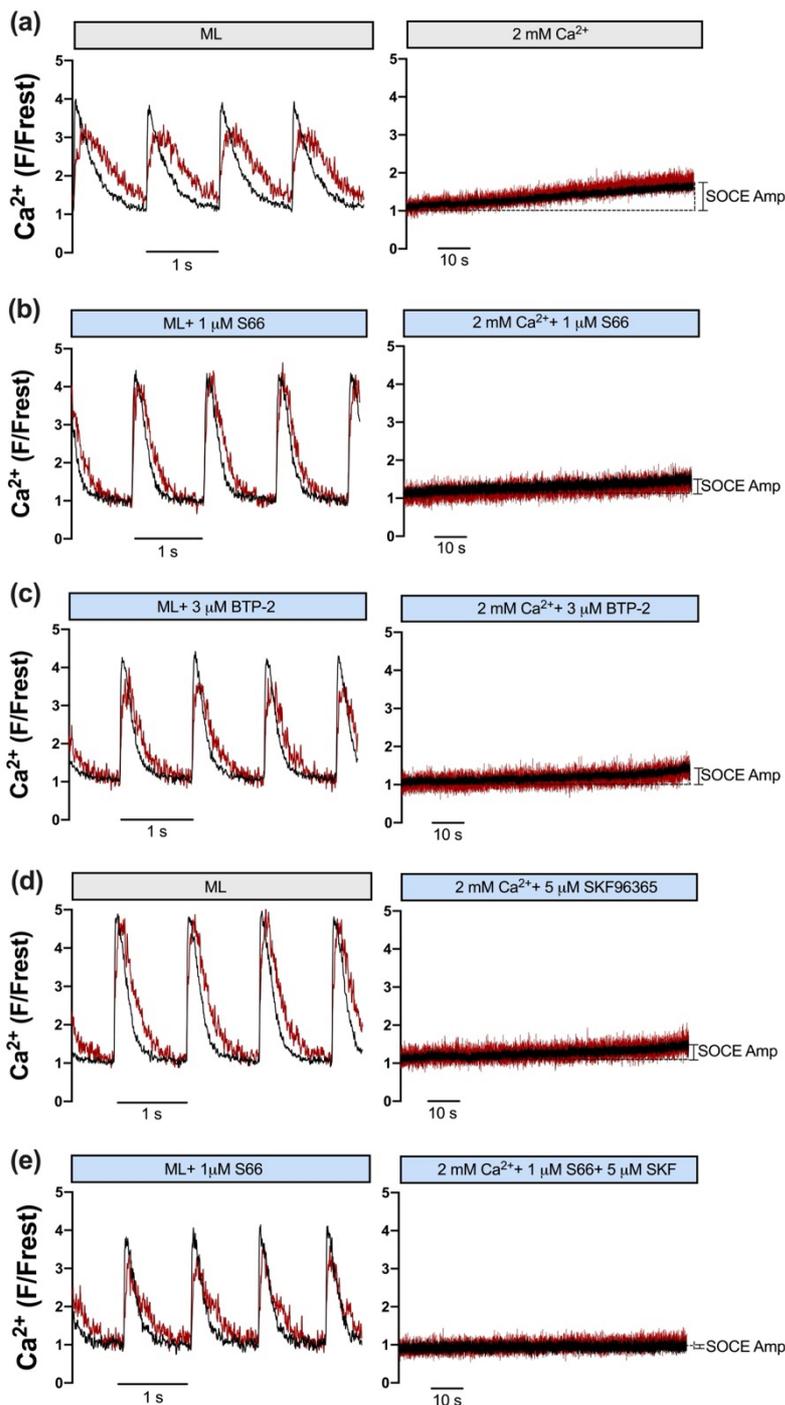
Versuchsprotokolle für die Experimente **(A)** mit S66, **(B)** mit BTP-2 und **(C)** mit SKF. Die Zellen wurden mit S66 und BTP-2 bereits mit der Messlösung > 20 Minuten vorinkubiert. SKF wurde erst mit der Ca-freien Messlösung appliziert. ML=Messlösung, TG=Thapsigargin, Koff=Koffein.

Die Abbildung 3-11 zeigt unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (DMSO-Kontrollzellen oder Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren) jeweils vier CaT (links) und den zugehörigen SOCE (rechts). Die CaT-Amplituden waren dabei in allen Gruppen vergleichbar. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Ca-Erhöhung in den DMSO-Kontrollzellen zu einer messbaren SOCE-Amplitude führte (Abb. 3-11 (a)), während alle eingesetzten Inhibitoren den langsamen SOCE deutlich verringerten (Abb. 3-11 (b-e)).

SKF wurde verwendet, um eine mögliche Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE zu untersuchen. Da SKF auch LTCC blockiert (Gao et al., 2012), wurden die Zellen nicht mit SKF vorinkubiert (vgl. Abb. 3-10). Der Inhibitor wurde aus diesem Grund erst mit der Ca-freien Messlösung appliziert und war ebenso der 2 mM Ca-Messlösung zugesetzt. Durch die Zugabe von SKF sank der SOCE-vermittelte Ca-Anstieg im Cytoplasma und im Nucleus (Abb. 3-11 (d)). Die Hemmung des Ca-Einstroms durch SKF war dabei vergleichbar mit der Hemmung durch die Orai-Blocker S66 (Abb. 3-11 (b)) und BTP-2 (Abb. 3-11 (c)).

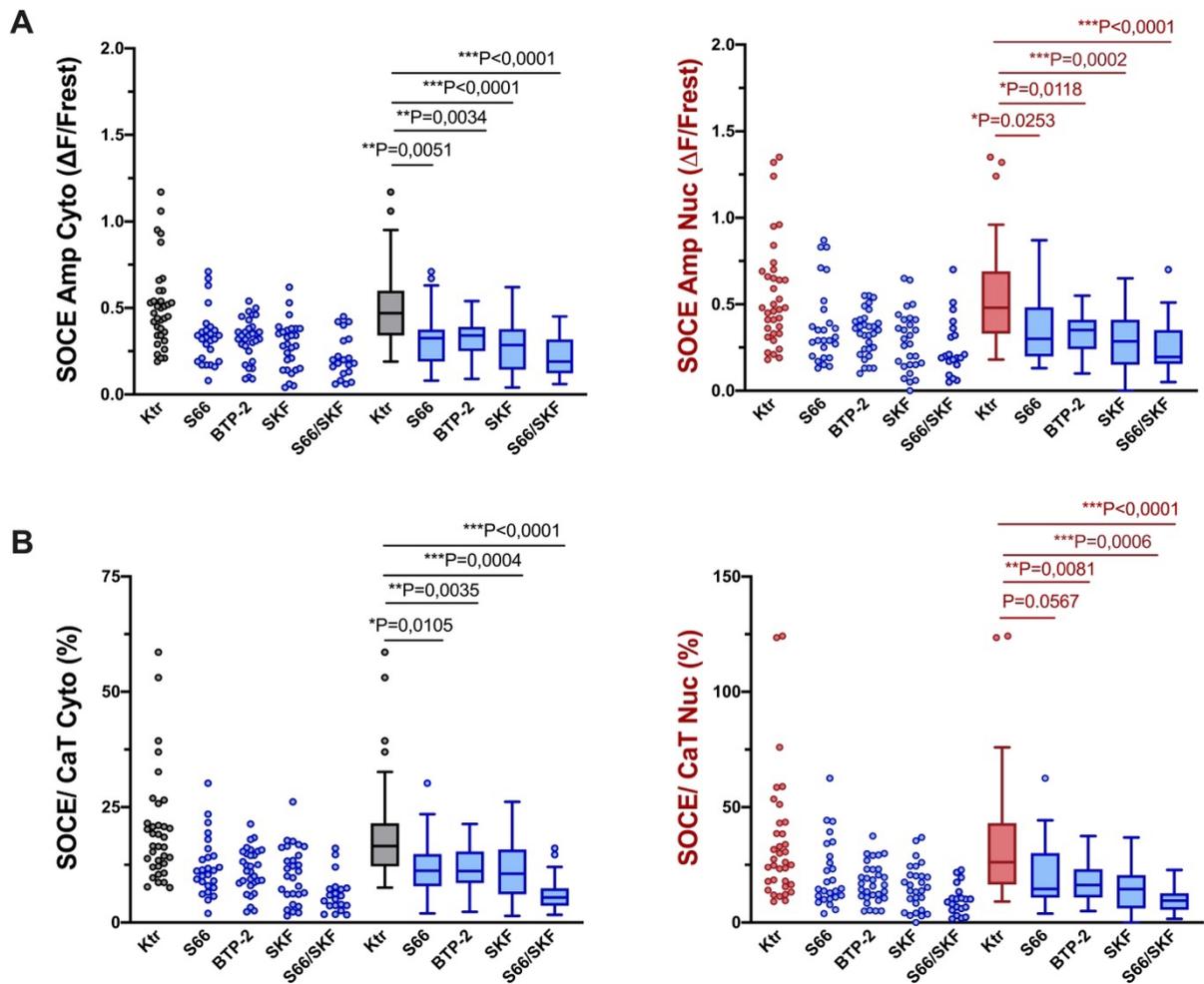
In Abbildung 3-12 A sind die SOCE-Amplituden und in 3-12 B die normierten SOCE-Amplituden für das Cytoplasma (schwarz, links) und den Nucleus (rot, rechts) abgebildet. Die SOCE-Amplitude der DMSO-Kontrollzellen betrug im Median für das Cytoplasma  $0,47 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,34-0,60 \Delta F/F_{rest}$ ). Der Einsatz von S66 oder BTP-2 führte zu einer Reduktion der SOCE-Amplitude um  $\approx 25-30\%$  auf  $0,33 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,19-0,38 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P=0,0051$ ; S66) und auf  $0,34 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,25-0,39 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P=0,0034$ ; BTP-2). Durch die Applikation von SKF sank die cytoplasmatische SOCE-Amplitude um  $\approx 40\%$  auf  $0,29 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,14-0,38 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P<0,0001$ ). Die nucleäre SOCE-Amplitude der DMSO-Kontrollzellen betrug im Median  $0,48 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,33-0,69 \Delta F/F_{rest}$ ). Diese wurde durch S66 oder BTP-2 um  $\approx 30-40\%$  auf  $0,30$  (IQR  $0,20-0,48 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P=0,0253$ ; S66) bzw. auf  $0,35 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,24-0,41 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P=0,0118$ ; BTP-2) gesenkt. SKF bewirkte eine Reduktion der nucleären SOCE-Amplitude um  $\approx 40\%$  auf  $0,29 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,15-0,41 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P=0,0002$ ). Die normierten SOCE-Amplituden wurden durch den Einsatz der Inhibitoren in einem ähnlichen Maß verringert. Sie betragen im Cytoplasma der Kontrollzellen im Median  $16,6\%$  (IQR  $12,1-21,5\%$ ). Durch die Applikation von S66 und BTP-2 wurden sie jeweils um  $\approx 30-35\%$  auf  $11,2\%$  (IQR  $7,9-14,9\%$ ;  $P=0,0105$ ; S66) und auf  $11,1\%$  (IQR  $8,6-15,4\%$ ;  $P=0,0035$ ; BTP-2) gesenkt. Durch die Applikation von SKF sank die normierte SOCE-Amplitude im Cytoplasma um  $\approx 35\%$  auf  $10,6\%$  (IQR  $6,1-15,9\%$ ;  $P=0,0004$ ). Die nucleären normierten SOCE-Amplituden waren größer als die cytoplasmatischen und betragen in den Kontrollzellen im Median  $26,2\%$  (IQR  $16,5-43,1\%$ ). Auch diese wurde durch die Applikation der Inhibitoren gesenkt. Durch den Einsatz von S66 sanken die normierten SOCE-Amplituden um  $\approx 45\%$  auf  $14,6\%$  (IQR  $10,8-30,1\%$ ;  $P=0,0567$ ), durch BTP-2 um  $\approx 40\%$  auf  $16,2\%$  (IQR  $10,8-23,1\%$ ;  $P=0,0081$ ) und durch SKF um  $\approx 45\%$  auf  $14,5\%$  (IQR  $6,1-20,5\%$ ;  $P=0,0006$ ). Die Wirkung der einzelnen Substanzen auf den SOCE war damit in beiden Zellkompartimenten vergleichbar.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Orai- als auch TRPC-Kanäle am SOCE beteiligt sind. In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob die gemeinsame Hemmung von Orai- und TRPC-Kanälen durch eine Kombination von S66 mit SKF die SOCE-Amplitude weiter verringerte als die Applikation der Inhibitoren alleine. Dabei wurden die Zellen mit S66 vorinkubiert, wohingegen SKF wieder erst mit der Ca-freien Messlösung auf die Zellen appliziert wurde. Die Kombination aus einem Orai-Hemmstoff (S66) und einem TRPC-Blocker (SKF) zeigte einen additiven Effekt auf die Verringerung der SOCE-Amplitude. Diese wurde sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus um  $\approx 60\%$  reduziert (Cytoplasma:  $0,19 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,13-0,32 \Delta F/F_{rest}$ ) und Nucleus  $0,20 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,16-0,35 \Delta F/F_{rest}$ ); beide  $P < 0,0001$ ). Die Reduktion der normierten SOCE-Amplitude betrug im Vergleich zu Kontrollzellen sowohl im Cytoplasma ( $5,4\%$  (IQR  $3,6-7,4\%$ );  $P < 0,0001$ ) als auch im Nucleus  $\approx 65\%$  ( $9,5\%$  (IQR  $5,5-12,7\%$ );  $P < 0,0001$ ). Diese Experimente legen nahe, dass sowohl Orai- als auch TRPC-Kanäle zum SOCE-vermittelten Ca-Einstrom in Ventrikelmyozyten beitragen.



**Abbildung 3-11 Der SOCE wird in Ventrikelmiozyten durch die Zugabe von S66, BTP-2, SKF oder der Kombination von S66 mit SKF gehemmt**

Repräsentative, normalisierte Fluoreszenzspuren von CaT (links) und SOCE (rechts) eines (a) Kontrollmiozyten (Ktr) und von Zellen, in denen der SOCE in Gegenwart von (b) 1  $\mu\text{M}$  S66, (c) 3  $\mu\text{M}$  BTP-2, (d) 5  $\mu\text{M}$  SKF oder (e) S66 und SKF gemessen wurde. Die Zellen waren mit S66 oder BTP-2 vorinkubiert, während SKF der Ca-freien Messlösung erst nach der Aufzeichnung der CaT zugesetzt wurde.

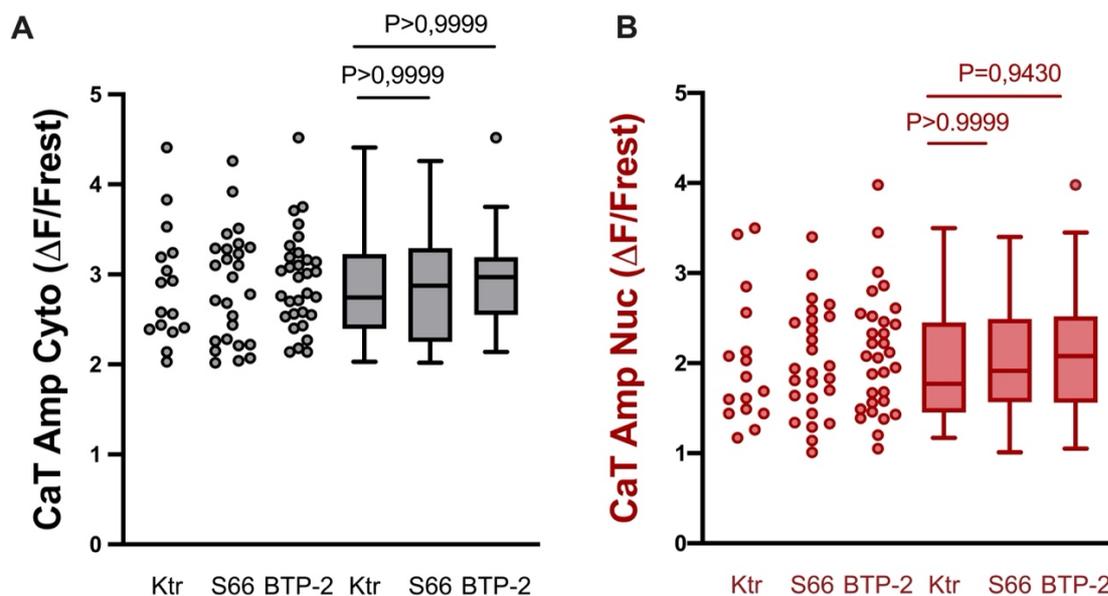


**Abbildung 3-12 Reduktion der SOCE-Amplitude sowie der normierten SOCE-Amplitude durch S66, BTP-2, SKF oder eine Kombination aus S66 und SKF in Ventrikelmyozyten**

**(A)** Vergleich der SOCE-Amplituden für das Cytoplasma (links) und den Nucleus (rechts), dargestellt als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots. **(B)** Vergleich der normierten SOCE-Amplituden für das Cytoplasma (links) und den Zellkern (rechts). Cytoplasma schwarz, Nucleus rot, Inhibitoren hellblau, Ktr: n=35, N=17; S66: n=26, N=4; BTP-2: n=31, N=5; SKF: n=28, N=5; S66/SKF: n=20, N=3. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

### 3.4.2.1 S66 oder BTP-2 haben keinen Einfluss auf die ventrikuläre CaT-Amplitude

Die Myozyten wurden wie oben beschrieben mit den Orai-Inhibitoren S66 oder BTP-2 vorinkubiert. Zu Beginn jeder Messung wurden elektrisch-stimulierte CaT aufgenommen. In Abbildung 3-13 sind als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots die CaT-Amplituden der Kontrollgruppe im Vergleich mit den S66- und BTP-2-behandelten Zellen dargestellt. Die Inkubation mit den beiden Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die cytoplasmatische CaT-Amplitude (Ktr:  $2,75 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,4-3,23 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. S66:  $2,88 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,25-3,29 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. BTP-2:  $2,97 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,55-3,19 \Delta F/F_{rest}$ )). Auch die nucleäre CaT-Amplitude blieb durch die Inkubation mit den Inhibitoren (Abb. 3-13 B) unverändert (Ktr:  $1,77 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,45-2,45 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. S66:  $1,92 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,57-2,49 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. BTP-2:  $2,08 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,56-2,52 \Delta F/F_{rest}$ )). Aus diesem Grund konnten die CaT-Amplituden für die Normalisierung des SOCE herangezogen werden und die Vergleichbarkeit der Daten war gegeben. Orai-Kanäle scheinen nicht zum CaT von Ventrikelmiozyten beizutragen.



**Abbildung 3-13 Die Inkubation mit S66 oder BTP-2 hat in Ventrikelmiozyten keinen Effekt auf die cytoplasmatische oder die nucleäre CaT-Amplitude**

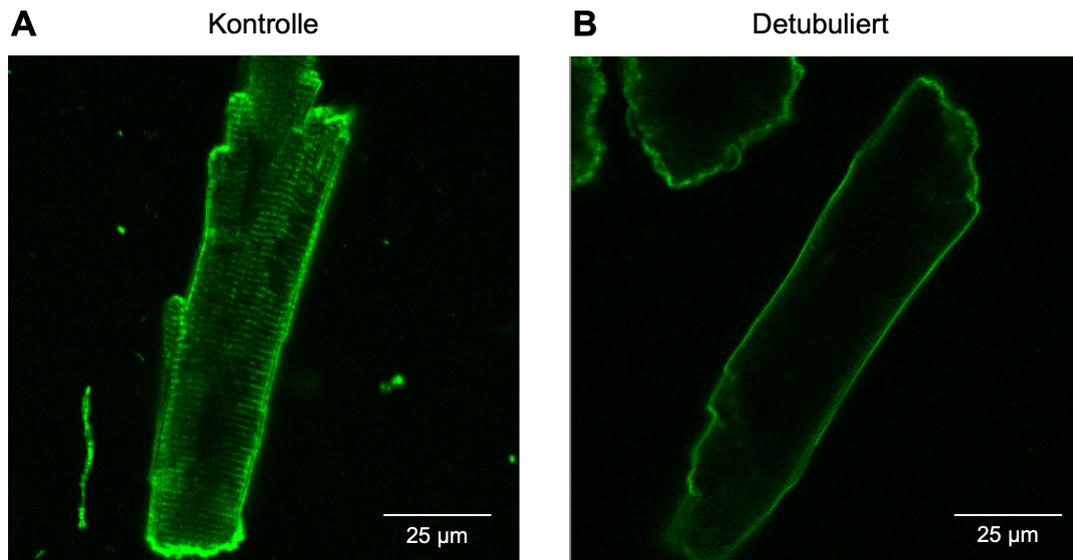
(A) Vergleich der cytoplasmatischen CaT-Amplituden von Kontrollzellen (Ktr) und mit S66 oder BTP-2 vorinkubierten Zellen. (B) Vergleich der nucleären CaT-Amplituden von Ktr und mit S66 oder BTP-2 vorinkubierten Zellen. Die Inkubation hat keinen Einfluss auf die elektrisch-stimulierten CaT. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; Ktr:  $n=16$ ,  $N=9$ ; S66:  $n=26$ ,  $N=4$ ; BTP-2:  $n=31$ ,  $N=5$ .

### 3.5 T-Tubuli werden für die SOCE-Aktivierung in Ventrikelmyozyten nicht benötigt

In der nächsten Versuchsreihe wurde die subzelluläre Lokalisation der am SOCE beteiligten Proteine untersucht. Über die Lokalisation der TRPC-Kanäle liegen bislang keine eindeutigen Ergebnisse vor. Es wird diskutiert, ob die Kanäle überwiegend in den T-Tubuli oder in der Plasmamembran lokalisiert sind. Untersuchungen dazu zeigten, dass TRPC1 und 6 sowohl in den T-Tubuli als auch in der Plasmamembran lokalisiert sind und TRPC3 und 4 überwiegend in der Plasmamembran exprimiert werden. Eine klare Abgrenzung der Lokalisation scheint jedoch schwer möglich zu sein (Doleschal et al., 2015; Fauconnier et al., 2007; Jiang et al., 2014; Kojima et al., 2010). Studien, die sich mit der Lokalisation von Orai befassten, lieferten ebenfalls kontroverse Ergebnisse (Rosenberg et al., 2021). Die Aktivierung von Orai-Kanälen durch STIM1 scheint jedoch hauptsächlich an der Plasmamembran stattzufinden (Bartoli et al., 2020; Saliba et al., 2015).

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob für die Aktivierung des SOCE T-Tubuli benötigt werden. Für diesen Zweck wurden adulte Ventrikelmyozyten mit einer 1,5 M Formamidlösung behandelt und infolgedessen detubuliert. Durch die osmotische Wirkung des Formamids kommt es beim Auswaschen der Lösung mit Messlösung zu einer kurzfristigen Zunahme des Zellvolumens. Dabei werden die T-Tubuli physikalisch von der äußeren Zellmembran abgetrennt (Kawai et al., 1999).

Die Kontrollzellen ohne Formamidbehandlung und die durch Formamid detubulierten Zellen wurden mit dem Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop im 2D-Modus dargestellt. Dazu wurden die Zellmembranen mit dem lipophilen Farbstoff di-8-ANEPPS angefärbt (Abb. 3-14). Die Kontrollzellen zeigten dabei ein ausgeprägtes T-tubuläres System, während dieses bei den Formamid-behandelten Zellen fehlte und die erfolgreiche Detubulierung bestätigte.



**Abbildung 3-14 Di-8-ANEPPS-Färbung von Ventrikelmyozyten**

(A) Original-2D-Aufnahme einer Kontrollzelle mit T-tubulärem System und (B) eines detubulierten Ventrikelmyozyten nach Formamid-Behandlung; beide Zellen wurden für zwei Minuten mit 10  $\mu\text{M}$  di-8-ANEPPS inkubiert. Der Display-Bereich beträgt 250-3000.

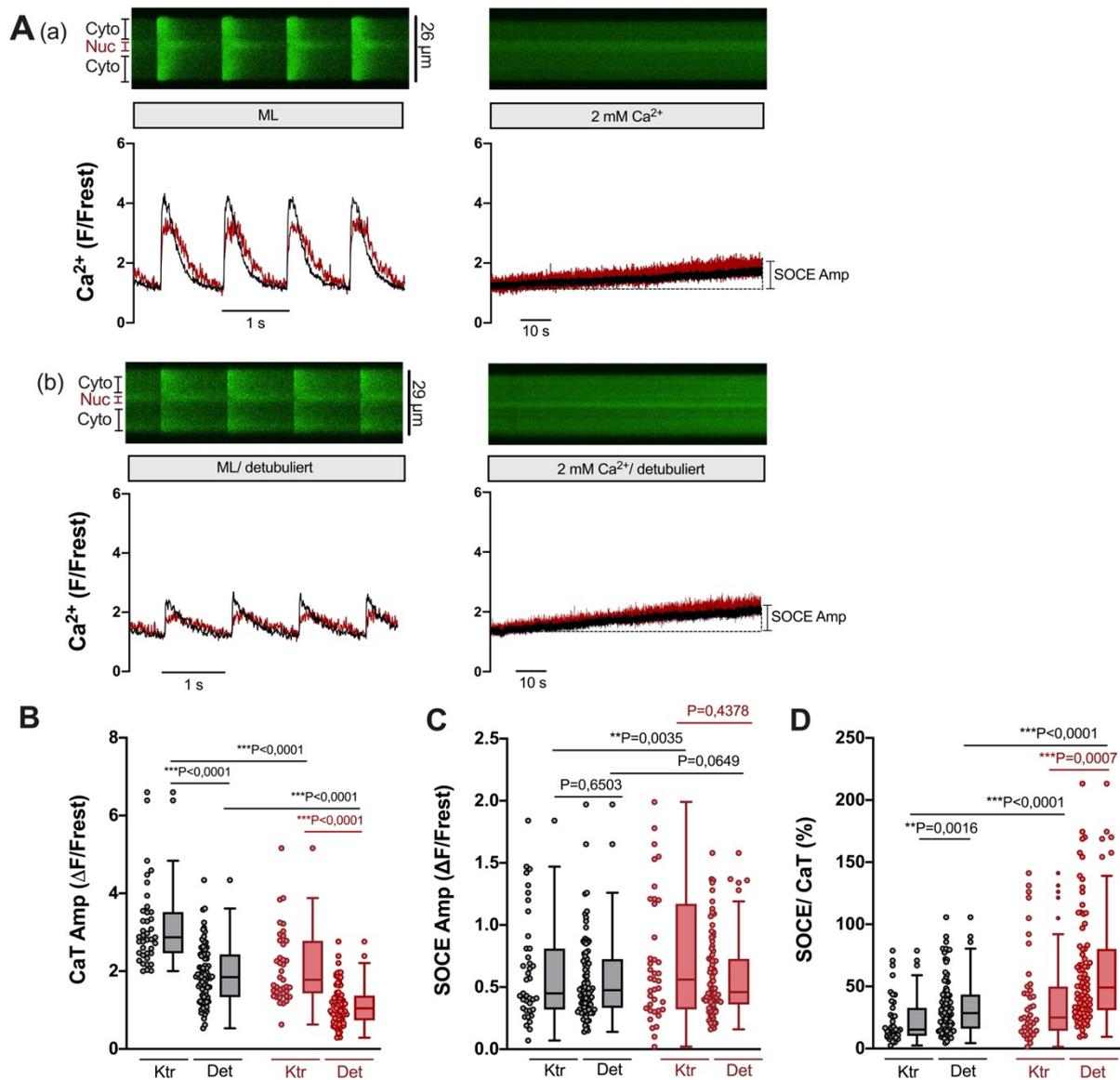
Für die Messungen des SOCE wurden die Ventrikelmyozyten wie oben beschrieben detubuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem SOCE-Protokoll vermessen.

Die Abbildung 3-15 A zeigt Original-Linescan-Bilder von CaT und dem SOCE einer Kontrollzelle (a) sowie eines detubulierten Ventrikelmyozyten (b). Darunter sind jeweils die zugehörigen, normalisierten Fluoreszenzspuren dargestellt. In Abbildung 3-15 B-D sind im Vergleich die CaT-Amplituden, die SOCE-Amplituden sowie die normierten SOCE-Amplituden abgebildet. Verglichen wurden dabei jeweils die cytoplasmatischen und nucleären Amplituden von Kontrollzellen mit detubulierten Zellen.

Die detubulierten Ventrikelmyozyten zeigten sowohl im Cytoplasma (Ktr:  $2,87 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 2,46-3,52  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ ) vs. detubuliert:  $1,85 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 1,33-2,43  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ );  $P < 0,0001$ ) als auch im Nucleus (Ktr:  $1,78 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 1,43-2,78  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ ) vs. detubuliert:  $1,05 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 0,74-1,37  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ );  $P < 0,0001$ ) deutlich kleinere elektrisch-stimulierte CaT im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis beruht darauf, dass die LTCC überwiegend in den T-Tubuli lokalisiert sind. Durch die Detubulierung der Myozyten sinkt die Anzahl der LTCC erheblich, wodurch der Ca-Einstrom deutlich reduziert wird (Kawai et al., 1999).

Die SOCE-Amplitude der detubulierten Zellen war hingegen im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert (Abb. 3-15 C). Dies galt gleichermaßen für das Cytoplasma (Ktr:  $0,45 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 0,32-0,81  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ ) vs. detubuliert:  $0,48 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 0,33-0,73  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ );  $P = 0,6503$ ) und für den Nucleus (Ktr:  $0,56 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 0,32-1,17  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ ) vs. detubuliert:  $0,46 \Delta F/F_{\text{rest}}$  (IQR 0,36-0,73  $\Delta F/F_{\text{rest}}$ );  $P = 0,4378$ ). Im nächsten Schritt wurden die etwa gleich großen

SOCE-Amplituden auf die unterschiedlich großen CaT-Amplituden normalisiert. Aus diesem Grund unterschieden sich die normierten SOCE-Amplituden zwischen den Gruppen in beiden Zellkompartimenten (Cytoplasma und Nucleus) ebenfalls voneinander. Die normierten SOCE-Amplituden betragen in den Kontrollzellen im Cytoplasma 15,3 % (IQR 10,1-32,8 %) und im Nucleus 25,0 % (IQR 14,3-49,9 %) sowie in den detubulierten Ventrikelmyozyten im Cytoplasma 28,6 % (IQR 16,0-43,5 %) und im Nucleus 49,2 % (IQR 30,9-80,2 %). Die Detubulierung führte in den Ventrikelmyozyten zu einem signifikant erhöhten Verhältnis vom SOCE am CaT (Cytoplasma:  $P=0,0016$  vs. Nucleus:  $P=0,0007$ ). Die normierten SOCE-Amplituden waren in beiden Gruppen im Nucleus signifikant größer als im Cytoplasma ( $P<0,0001$ ).



**Abbildung 3-15** Der SOCE in detubulierten Ventrikelmiozyten

(A) Original-Linescan-Bilder eines (a) Kontrollmyozyten (Ktr) und (b) eines detubulierten Ventrikelmiozyten mit den zugehörigen, normalisierten Fluoreszenzspuren. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-800. (B) Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots mit Vergleich der Mediane der CaT-Amplituden, (C) der SOCE-Amplituden, und (D) der normierten SOCE-Amplituden jeweils im Cytoplasma (schwarz) und Nucleus (rot) von Kontroll- und detubulierten Ventrikelmiozyten (Det). Verglichen wurden die Daten aus Abb. 3-5 mit den detubulierten Ventrikelmiozyten. Mann-Whitney/ Wilcoxon Test, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001; Ktr: n=39, N=16; detubuliert: n=84, N=12.

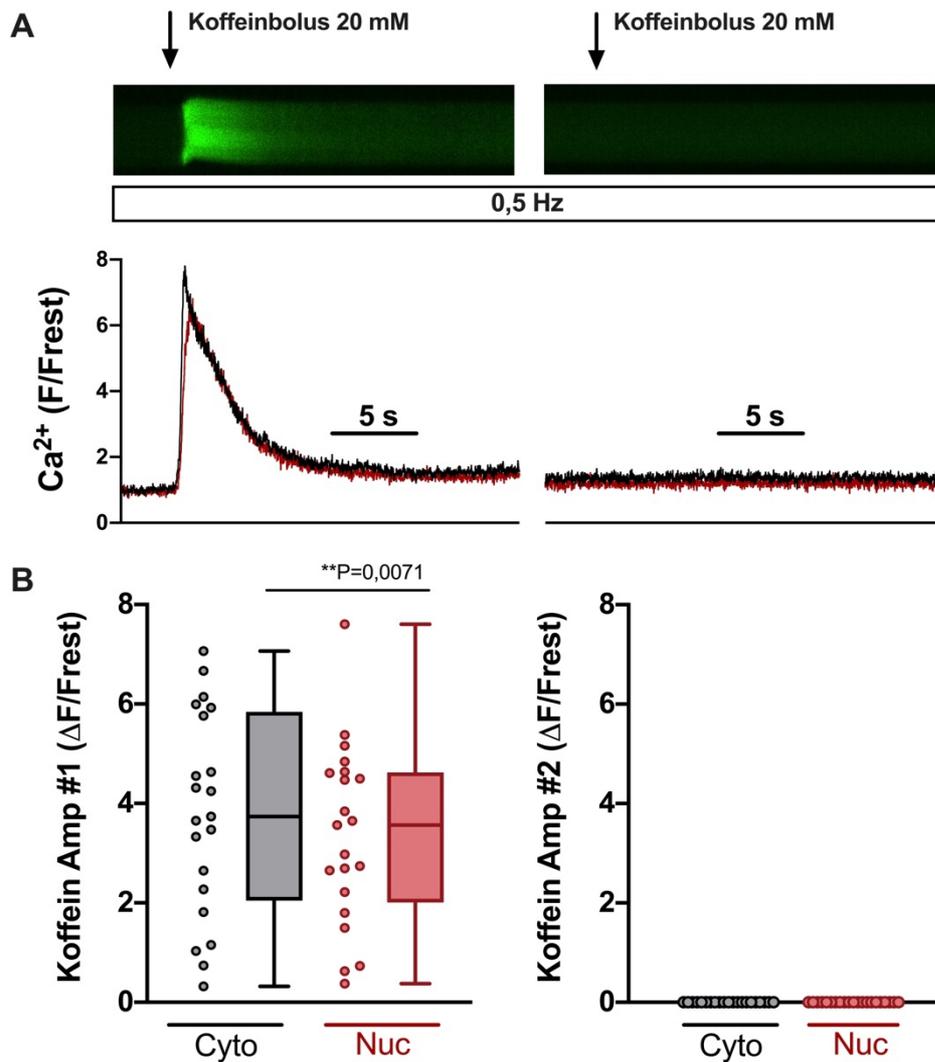
## 3.6 Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom in Vorhofmyozyten

### 3.6.1 Charakterisierung des SOCE in Vorhofmyozyten

Vorhofmyozyten unterscheiden sich strukturell von Ventrikelmyozyten und weisen Unterschiede z.B. bezüglich der subzellulären Ca-Regulierung auf (Kockskämper, 2016). Daher wurde der SOCE in diesem Versuchsteil in Vorhofmyozyten charakterisiert. Im Gegensatz zu Ventrikelmyozyten besitzen atriale Myozyten kein regelmäßiges T-Tubulus-System. Mit einer di-8-ANEPPS-Färbung wurden die Vorhofmyozyten im 2D-Modus des Zeiss LSM 510 dargestellt und das fehlende T-tubuläre System bestätigt (Abb. 3-17 A).

Um den SOCE in Vorhofmyozyten zu messen, wurde das gleiche Messprotokoll wie für die Ventrikelmyozyten verwendet. Die Vorhofzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert. Am Ende des Messprotokolls zeigte sich in den Vorhofmyozyten nach Zugabe von 2 mM Ca ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, der als SOCE-Amplitude ausgewertet wurde.

Die intrazelluläre Speicherentleerung wurde mit einer zweifachen Bolusapplikation von Koffein durchgeführt. Die Abbildung 3-16 zeigt die SR-Ca-Beladung in der Ca-freien Messlösung mit Thapsigargin, die durch den zweifachen Koffeinbolus (20 mM) ermittelt wurde. Während der Koffeinapplikation wurden die Vorhofmyozyten mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. In Abbildung 3-16 A (links) ist ein Original-Linescan-Bild des ersten Koffeintransienten mit der zugehörigen normalisierten Fluoreszenzspur abgebildet. Diese erste Koffeingabe führte zu einer Freisetzung von Ca aus dem SR-Ca-Speicher, die einen messbaren Koffeintransienten auslöste. Die zweite Koffeingabe löste hingegen keine weitere Ca-Freisetzung aus (Abb. 3-16 A, rechts). Der Vergleich der Mediane ist in Abbildung 3-16 B dargestellt. Der Median der ersten Koffeintransienten-Amplitude betrug in 21 Zellen im Cytoplasma  $3,74 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,04-5,84  $\Delta F/F_{rest}$ ) und im Nucleus  $3,57 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,01-4,62  $\Delta F/F_{rest}$ ). Der cytoplasmatische Koffeintransient war signifikant größer als der nucleäre ( $P=0,0071$ ). In allen 21 Zellen führte die zweite Koffeinapplikation zu keinem weiteren messbaren Koffeintransienten (Abb. 3-16 A, B, rechts). Durch die Wiederholung der Koffeinapplikation wurde eine vollständige Entleerung der SR-Ca-Speicher sichergestellt. Auch in Vorhofmyozyten war trotz der Applikation der Ca-freien Messlösung mit Thapsigargin, Verapamil und KB-R noch Ca im SR vorhanden, das durch die erste Bolusgabe von Koffein freigesetzt wurde.



**Abbildung 3-16 SR-Ca-Beladung atrialer Kardiomyozyten in Ca-freier Messlösung ermittelt durch Koffeingabe**

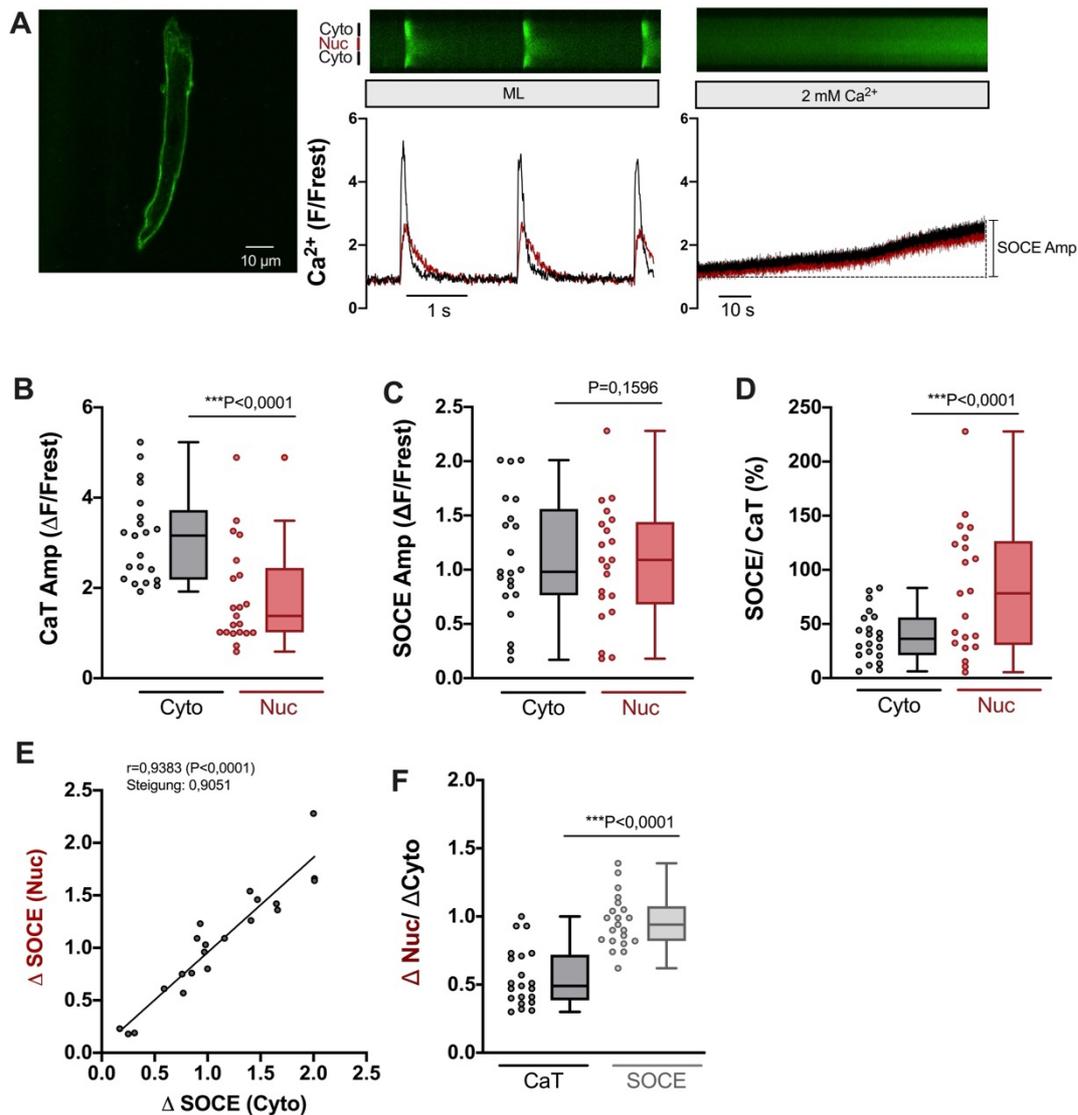
(A) Original-Linescan-Bilder und zugehörige normalisierte Fluoreszenzspuren während der ersten (links) und der zweiten (rechts) Bolusapplikation von 20 mM Koffein. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-1300. (B) Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots mit Vergleich der Mediane der cytoplasmatischen (schwarz) und nucleären (rot) Koffeintransient-Amplituden. Wilcoxon-Test,  $**P < 0,01$ ;  $n = 21$ ;  $N = 5$ .

Die Ergebnisse der Charakterisierung des SOCE von 21 Vorhofmyozyten sind in Abbildung 3-17 dargestellt. In Abbildung 3-17 A sind Original-Linescan-Bilder von drei CaT und vom SOCE mit den zugehörigen Fluoreszenzspuren abgebildet. Die Abbildungen 3-17 B-D zeigen den Medianvergleich der CaT-Amplituden, der SOCE-Amplituden und der normierten SOCE-Amplituden jeweils im Cytoplasma und im Nucleus der Vorhofmyozyten.

Für die elektrisch-stimulierten CaT wurden im Cytoplasma Amplituden von  $3,16 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,19-3,73  $\Delta F/F_{rest}$ ) und im Nucleus von  $1,38 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 1,02-2,45  $\Delta F/F_{rest}$ ) gemessen. Wie auch bei den Ventrikelfmyozyten zu beobachten war, zeigten die atrialen Zellen ebenfalls größere CaT-Amplituden im Cytoplasma als im Nucleus ( $P < 0,0001$ ; Abb. 3-17 B). Die SOCE-Amplituden (Abb. 3-17 C) betragen im Cytoplasma  $0,98 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 0,77-1,56  $\Delta F/F_{rest}$ ) und im Nucleus  $1,09 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 0,68-1,44  $\Delta F/F_{rest}$ ). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den SOCE-Amplituden gefunden werden ( $P = 0,1596$ ). Die normierten SOCE-Amplituden (Abb. 3-17 D) waren im Nucleus mit einem Median von 78,3 % (IQR 30,6-126,6 %) signifikant größer als im Cytoplasma mit einem Median von 36,3 % (IQR 21,1-56,0 %);  $P < 0,0001$ ).

Die Abbildung 3-17 E zeigt das Kern-Cyto-Diagramm für den SOCE in Vorhofmyozyten. Dazu wurde die Amplitude des nucleären SOCE als Funktion der Amplitude des cytoplasmatischen SOCE aufgetragen. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab eine starke, positive Korrelation zwischen dem nucleären und dem cytoplasmatischen SOCE in Vorhofmyozyten ( $r = 0,9383$ ). Es wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die daraus resultierende Gerade graphisch dargestellt. Die Datenpunkte bildeten eine Gerade mit einer Steigung von 0,9051. Dieses Ergebnis legt eine lineare Beziehung zwischen dem cytoplasmatischen und dem nucleären SOCE in Vorhofmyozyten nahe. Das Kern-Cyto-Verhältnis wurde für die CaT- und für die SOCE-Amplituden gebildet und ist als Vergleich in Abbildung 3-17 F dargestellt. Das Kern-Cyto-Verhältnis der SOCE-Amplituden war dabei signifikant größer als das der CaT-Amplituden. Für die CaT-Amplituden wurden Werte von  $< 1$  ermittelt, wohingegen das Kern-Cyto-Verhältnis der SOCE-Amplituden Werte von  $\approx 1$  aufwies. Das Kern-Cyto-Verhältnis war für die SOCE-Amplituden annähernd doppelt so groß ( $0,94 F_{nuc}/F_{cyto}$  (IQR 0,82-1,08  $F_{nuc}/F_{cyto}$ )) wie für die CaT-Amplituden ( $0,49 F_{nuc}/F_{cyto}$  (IQR 0,39-0,72  $F_{nuc}/F_{cyto}$ );  $P < 0,0001$ ).

Zusammenfassend zeigte sich, dass in Vorhofmyozyten die Erhöhung des extrazellulären Ca nach der Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher in einer Ca-freien Messlösung zu einem messbaren SOCE führte. Dieser war im Cytoplasma und im Nucleus quantifizierbar, wobei der SOCE im Nucleus verhältnismäßig größer als im Cytoplasma war.



**Abbildung 3-17 Der SOCE in atrialen Kardiomyozyten**

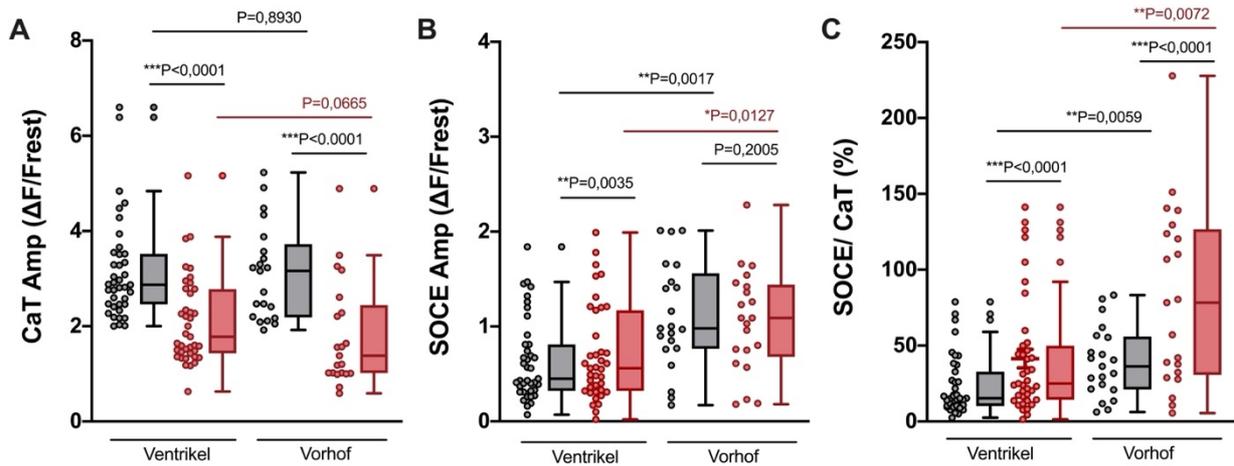
**(A)** Repräsentative 2D-Aufnahme (links) eines Vorhofmyozyten (Färbung mit 10  $\mu\text{M}$  di-8-ANEPPS, Display-Bereich 280-2300) und Original-Line-Scan Bildern (einer anderen Zelle) von drei CaT und dem SOCE mit den zugehörigen normalisierten Fluoreszenzspuren. Der Display-Bereich beträgt nach Hintergrundkorrektur 0-800. **(B)** Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots mit Medianvergleich der CaT-Amplituden, **(C)** der SOCE-Amplituden und **(D)** der normierten SOCE-Amplituden **(E)** Auftragung des nucleären SOCE als Funktion des cytoplasmatischen SOCE (Korrelationsanalyse nach Spearman,  $r=0,9383$ ) und **(F)** Medianvergleich des Kern-Cyto-Verhältnisses der CaT-Amplituden (schwarz) und der SOCE-Amplituden (grau). Wilcoxon-Test,  $***P<0,001$ ;  $n=21$ ,  $N=5$ .

### 3.6.2 Der SOCE unterscheidet sich in Vorhof- und Ventrikelmyozyten

In Abbildung 3-18 sind im Vergleich die Ergebnisse der funktionellen SOCE-Messungen der Ventrikel- und Vorhofmyozyten aus den Abbildungen 3-5 und 3-17 dargestellt. Es wurden die Mediane der CaT-Amplituden, der SOCE-Amplituden sowie der normierten SOCE-Amplituden miteinander verglichen (Abb. 3-18 A-C).

Der Vergleich der CaT-Amplituden zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Ventrikel- und Vorhofmyozyten in beiden Zellkompartimenten (Median Cyto Ventrikel:  $2,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,46-3,52 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Cyto Vorhof:  $3,16 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $2,19-3,73 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,8930$ ; Nuc Ventrikel:  $1,78 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,43-2,78 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Nuc Vorhof:  $1,38 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $1,02-2,45 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,0665$ ). Die cytoplasmatischen CaT waren in beiden Gruppen signifikant größer als die nucleären CaT ( $P<0,0001$ ).

In den Vorhofmyozyten waren die SOCE-Amplituden im Cytoplasma deutlich größer als in den Ventrikelmyozyten (Median Ventrikel:  $0,45 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-0,81 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Vorhof:  $0,98 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,77-1,56 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,0017$ ). Die nucleären SOCE-Amplituden waren im Vorhof annähernd doppelt so groß wie die ventrikulären SOCE-Amplituden (Ventrikel:  $0,56 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,32-1,17 \Delta F/F_{rest}$ ) vs. Vorhof:  $1,09 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,68-1,44 \Delta F/F_{rest}$ );  $P=0,0127$ ). Beim Vergleich der normierten SOCE-Amplituden zeigten sich ebenfalls größere Werte für die Vorhofmyozyten als für die Ventrikelmyozyten. Dies galt gleichermaßen für die cytoplasmatischen normierten SOCE-Amplituden (Ventrikel:  $15,3 \%$  (IQR  $10,1-32,8 \%$ ) vs. Vorhof:  $36,3 \%$  (IQR  $21,1-56,0 \%$ );  $P=0,0059$ ) wie für die nucleären normierten SOCE-Amplituden (Ventrikel:  $25,0 \%$  (IQR  $14,3-49,9 \%$ ) vs. Vorhof:  $78,3 \%$  (IQR  $30,6-126,6 \%$ );  $P=0,0072$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass Vorhofmyozyten einen deutlich größeren SOCE als Ventrikelmyozyten besitzen.



**Abbildung 3-18 Vergleich von CaT- und SOCE-Amplituden in Vorhof- und Ventrikelmyozyten**

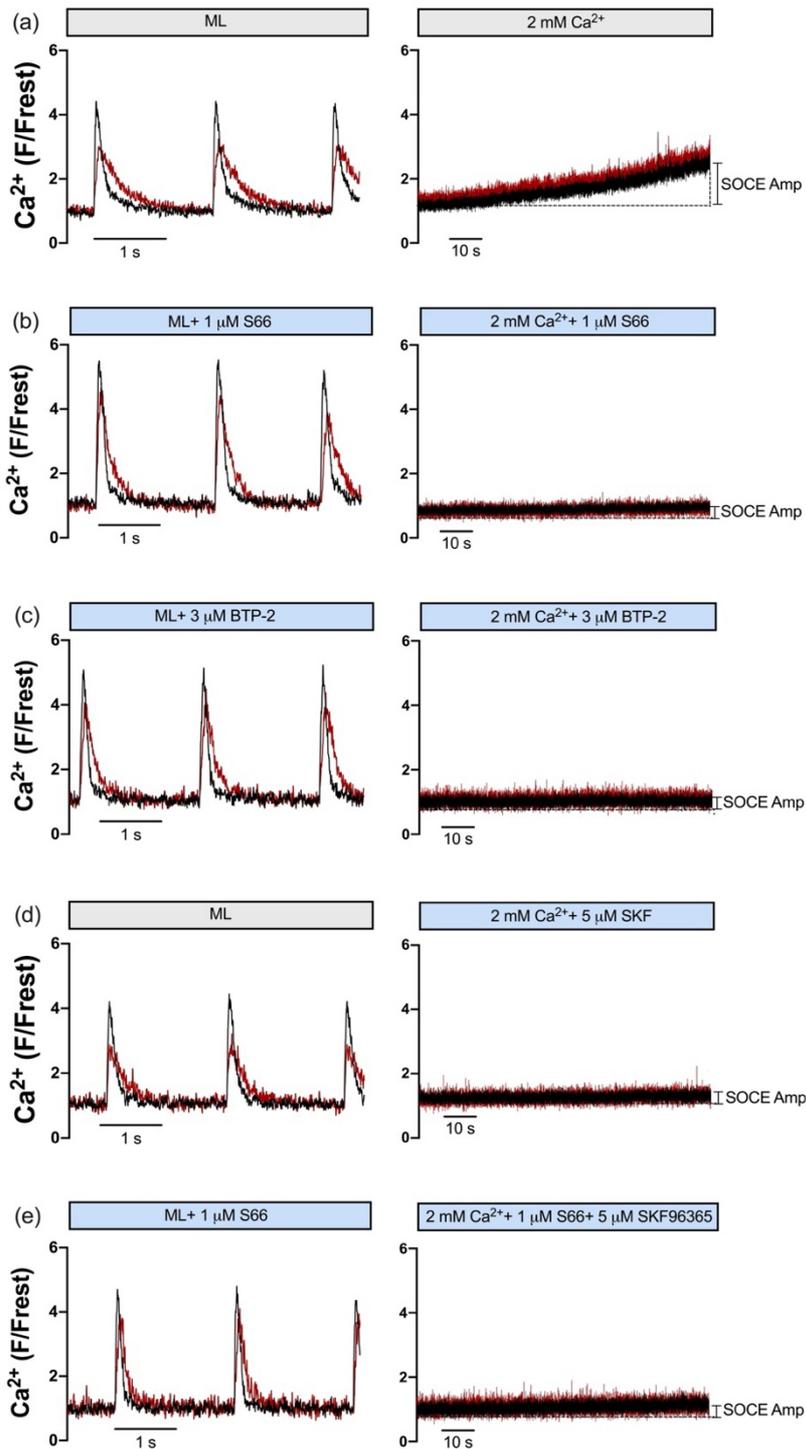
**(A)** Vergleich der Mediane der CaT-Amplituden, **(B)** der SOCE-Amplituden und **(C)** der normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma (schwarz) und Nucleus (rot) von Ventrikel- und Vorhofmyozyten; Verglichen wurden die Daten aus Abbildung 3-4 und 3-15; Darstellung der Daten als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots. Mann-Whitney/ Wilcoxon Test, \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ ; Ventrikel:  $n=39$ ;  $N=16$ ; Vorhof:  $n=21$ ;  $N=5$ .

### 3.6.3 Der SOCE in Vorhofmyozyten wird durch S66, BTP-2 oder SKF gehemmt

Auch in Vorhofmyozyten wurden die verschiedenen SOCE-Inhibitoren eingesetzt, um zu untersuchen, ob der gemessene Ca-Anstieg durch Orai- und/oder TRPC-Kanäle verursacht wird. Außerdem kann durch den Einsatz der Inhibitoren der Anteil der am SOCE beteiligten Proteine bewertet werden. Dazu wurden auch die Vorhofzellen, wie in Abbildung 3-10 für Ventrikelmyozyten dargestellt, mit den dort genannten Inhibitoren behandelt.

Die Vorhofmyozyten wurden > 20 Minuten mit S66 oder BTP-2 vorinkubiert, wohingegen SKF mit der Ca-freien Messlösung appliziert wurde. Als Kontrolle diente der gemessene Fluoreszenzanstieg in DMSO-Kontrollzellen. Zu den Messlösungen wurde der Anteil DMSO gegeben, der zum Lösen der Inhibitoren benötigt wurde.

In Abbildung 3-19 sind jeweils die CaT von Vorhofmyozyten (links) und die zugehörigen SOCE-Amplituden derselben Zelle (rechts) abgebildet. In den Kontrollzellen konnte eine robuste SOCE-Amplitude ermittelt werden (Abb. 3-19 (a)), wohingegen die SOCE-Amplitude durch die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus in allen Fällen deutlich verringert war (Abb. 3-19 (b-e)).



**Abbildung 3-19** Der SOCE in Vorhofmyozyten wird durch S66, BTP-2, SKF oder der Kombination aus S66 und SKF reduziert

Repräsentative, normalisierte Fluoreszenzspuren von CaT bei elektrischer Stimulation mit einer Frequenz von 0,5 Hz (links) und den SOCE-Amplituden (rechts) für (a) eine DMSO-Kontrollzelle, (b) eine mit S66-, (c) eine mit BTP-2-, (d) eine mit SKF- und (e) eine mit S66 in Kombination mit SKF-behandelte Zelle.

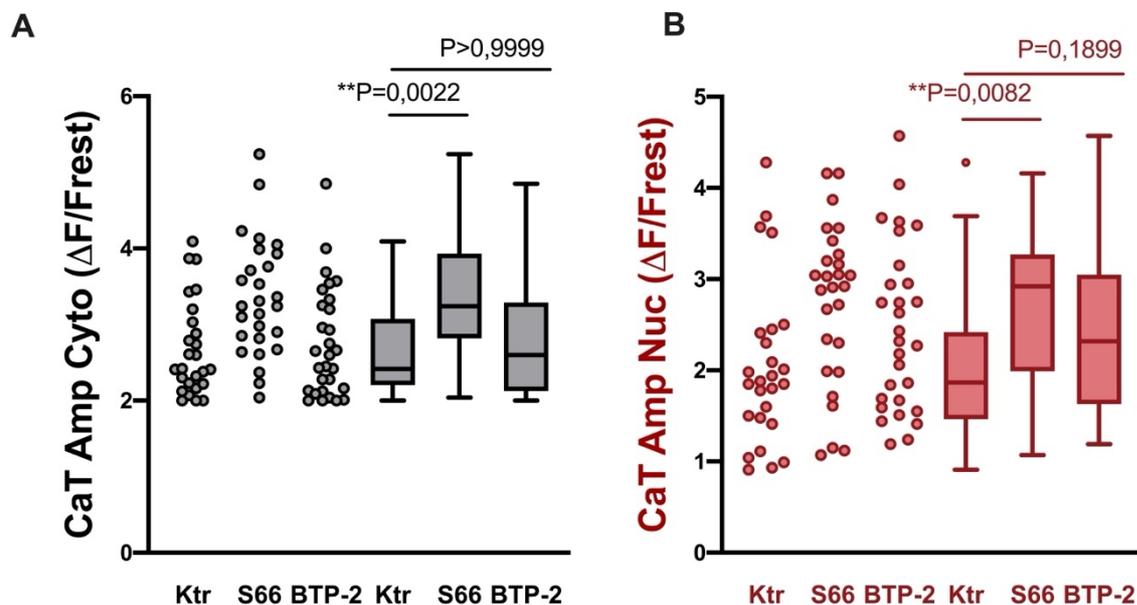
In Abbildung 3-20 sind im Vergleich die Mediane der SOCE-Amplituden sowie der normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma und im Nucleus dargestellt. Abbildung 3-20 A zeigt die cytoplasmatischen (links) und die nucleären (rechts) SOCE-Amplituden für die DMSO-Kontrollzellen (Cytoplasma schwarz, Nucleus rot) und die Inhibitor-behandelten Zellen (hellblau) und Abbildung 3-20 B zeigt die cytoplasmatischen (links) und die nucleären (rechts) normierten SOCE-Amplituden, ebenfalls für die DMSO-Kontrollzellen und die Inhibitor-behandelten Zellen. Die cytoplasmatische SOCE-Amplitude betrug in den DMSO-Kontrollmyozyten der Vorhofmyozyten im Median  $0,70 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,50-0,98 \Delta F/F_{rest}$ ). Wurde S66 als Orai-Inhibitor eingesetzt, sank die SOCE-Amplitude um  $\approx 65\%$  auf  $0,23 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,14-0,35 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P < 0,0001$ ). BTP-2 oder SKF verringerten die SOCE-Amplitude um  $\approx 80\%$  auf  $0,14 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,06-0,25 \Delta F/F_{rest}$ ; BTP-2) und auf  $0,14 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,03-0,25 \Delta F/F_{rest}$ ; SKF; beide  $P < 0,0001$ ). Die nucleäre SOCE-Amplitude ( $0,75 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,45-1,03 \Delta F/F_{rest}$ )) wurde durch die Applikation von S66 um  $\approx 60\%$  auf  $0,28 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,14-0,36 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P < 0,0001$ ) reduziert. Der Einsatz von BTP-2 oder SKF reduzierte die Amplitude um  $\approx 75\%$ . Sie sank durch BTP-2 auf  $0,18 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,09-0,30 \Delta F/F_{rest}$ ) und durch SKF auf  $0,17 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,05-0,30 \Delta F/F_{rest}$ ; beide  $P < 0,0001$ ). Auch in den Vorhofmyozyten konnte eine ähnliche Reduktion der normierten SOCE-Amplituden, verglichen mit den absoluten SOCE-Amplituden, ermittelt werden. Der Median der normierten SOCE-Amplitude betrug im Cytoplasma der Kontrollzellen  $25,7\%$  (IQR  $16,6-38,9\%$ ). Durch die Applikation der Orai-Inhibitoren S66 und BTP-2 wurde die normierte SOCE-Amplitude um  $\approx 70-80\%$  auf  $7,7\%$  (IQR  $4,2-9,1\%$ ;  $P < 0,0001$ ; S66) und auf  $5,4\%$  (IQR  $1,8-11,8\%$ ;  $P < 0,0001$ ; BTP-2) gesenkt. Wurde SKF als TRPC-Inhibitor auf die Zellen gegeben, so sank die normierte SOCE-Amplitude im Cytoplasma um  $\approx 80\%$  auf  $5,3\%$  (IQR  $1,2-8,5\%$ ;  $P < 0,0001$ ). Der Median der normierten SOCE-Amplitude im Nucleus der Kontrollzellen betrug  $37,9\%$  (IQR  $24,6-62,7\%$ ) und war damit deutlich größer als im Cytoplasma. Der Einsatz der Orai-Inhibitoren S66 oder BTP-2 sowie des TRPC-Blockers SKF ergab eine Reduktion des SOCE/CaT-Verhältnisses im Nucleus um jeweils  $\approx 75-80\%$ . Dieses Verhältnis sank durch S66 auf  $8,0\%$  (IQR  $5,4-18,3\%$ ), durch BTP-2 auf  $7,8\%$  (IQR  $3,7-15,8\%$ ) und durch SKF auf  $9,6\%$  (IQR  $3,2-13,3\%$ ; alle  $P < 0,0001$ ).

Die Kombination von S66 und SKF bewirkte – im Gegensatz zu den Befunden bei den Ventrikelmyozyten – keine zusätzliche Reduktion der SOCE-Amplitude in Vorhofzellen. Die cytoplasmatische SOCE-Amplitude wurde um  $\approx 65\%$  auf  $0,24 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,07-0,48 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P < 0,0001$ ) und das cytoplasmatische SOCE/CaT-Verhältnis ebenfalls um  $\approx 65\%$  auf  $8,6\%$  (IQR  $1,9-12,6\%$ ;  $P < 0,0001$ ) gesenkt. Die Kombination aus S66 und SKF bewirkte ebenfalls keinen additiven Effekt auf die nucleäre SOCE-Amplitude sowie die normierte nucleäre SOCE-Amplitude. Das Verhältnis wurde um  $\approx 70\%$  auf  $11,7\%$  (IQR  $6,5-24,6\%$ ) gesenkt ( $P < 0,0001$ ) und die SOCE-Amplitude sank um  $\approx 60\%$  auf  $0,29 \Delta F/F_{rest}$  (IQR  $0,15-0,51 \Delta F/F_{rest}$ ;  $P = 0,0002$ ).



## 3.6.3.1 Einfluss von S66 oder BTP-2 auf die atriale CaT-Amplitude

Auch die Vorhofmyozyten wurden mit den Orai-Inhibitoren S66 oder BTP-2 vorinkubiert. Zu Beginn des Messprotokolls wurden die Myozyten elektrisch stimuliert und die CaT aufgezeichnet. Die Abbildung 3-21 zeigt als Scatter-Dot-Plots und Box-Whisker-Plots die CaT-Amplituden der Kontrollgruppe im Vergleich mit den S66- und BTP-2-behandelten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit BTP-2 hatte keinen Einfluss auf die CaT-Amplitude (Cytoplasma Ktr:  $2,42 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,21-3,07  $\Delta F/F_{rest}$ ) vs. BTP-2:  $2,60 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,13-3,29  $\Delta F/F_{rest}$ );  $P > 0,9999$  und Nucleus Ktr:  $1,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 1,46-2,42  $\Delta F/F_{rest}$ ) vs BTP-2:  $2,32 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 1,63-3,05  $\Delta F/F_{rest}$ );  $P = 0,1899$ ). Die Inkubation mit S66 zeigte hingegen – im Gegensatz zu den Ventrikelmyozyten – eine Wirkung auf die CaT-Amplitude. Sowohl im Cytoplasma (Abb. 3-21 A) als auch im Nucleus (Abb. 3-21 B) stieg die Amplitude durch die Inkubation mit S66 (Cytoplasma Ktr:  $2,42 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,21-3,07  $\Delta F/F_{rest}$ ) vs. S66:  $3,24 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 2,82-3,93  $\Delta F/F_{rest}$ );  $P = 0,0022$  und Nucleus Ktr:  $1,87 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 1,46-2,42  $\Delta F/F_{rest}$ ) vs S66:  $2,92 \Delta F/F_{rest}$  (IQR 1,99-3,27  $\Delta F/F_{rest}$ );  $P = 0,0082$ ). Die Wirkung von S66 auf die CaT-Amplitude war unerwartet, wurde im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiterverfolgt.



**Abbildung 3-21** Effekt der Inkubation mit S66 oder BTP-2 auf die cytoplasmatische und die nucleäre CaT-Amplitude in Vorhofmyozyten

**(A)** Vergleich der cytoplasmatischen CaT-Amplituden von Kontrollzellen (Ktr) und mit S66 oder BTP-2 vorinkubierten Zellen. **(B)** Vergleich der nucleären CaT-Amplituden von Ktr und mit S66 oder BTP-2 vorinkubierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test; Ktr:  $n = 26$ ,  $N = 8$ ; S66:  $n = 27$ ,  $N = 5$ ; BTP-2:  $n = 29$ ,  $N = 4$ .

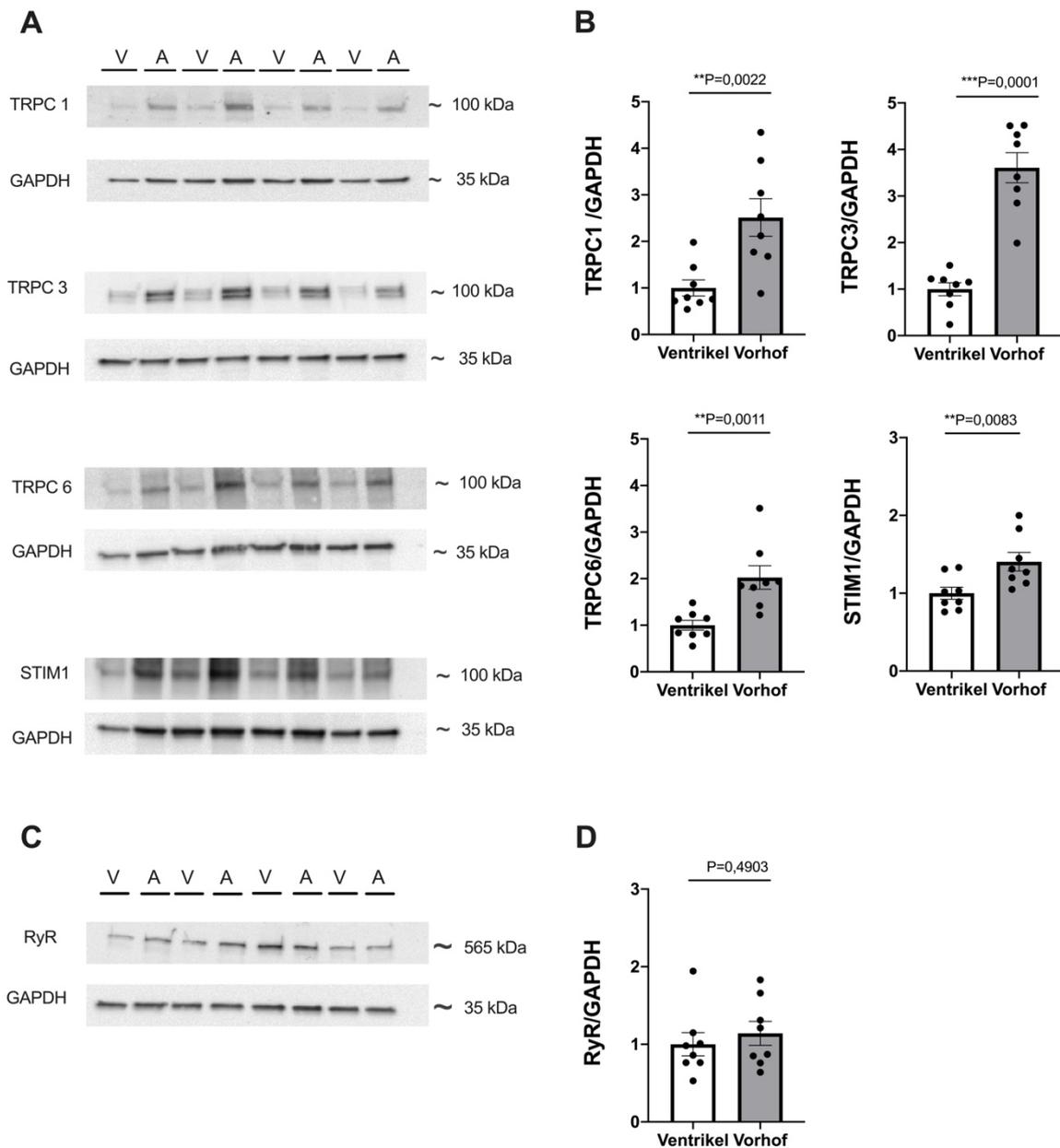
### 3.6.4 Erhöhte Expression von TRPC1, 3 und 6 sowie von STIM1 in Vorhofmyozyten

Da die absoluten SOCE-Amplituden in Vorhofmyozyten größer als in Ventrikelmyozyten waren (vgl. Abb. 3-18), wurde eine Western Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression von linksventrikulärem (LV) und linksatrialem (LA) Gewebe für TRPC1, 3 und 6 sowie für STIM1 durchgeführt. Für alle genannten Proteine wurde GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Zum direkten Vergleich wurden jeweils abwechselnd Ventrikel (V)- und Vorhof (A)-Proben in die Gele gegeben. In Abbildung 3-22 A und B sind die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen dargestellt. Dabei sind unter A die Original-Western Blots und unter B die relative Proteinexpression, normalisiert auf GAPDH, abgebildet.

Die Proteinexpression war für die untersuchten TRPC-Kanäle (1,3 und 6) im Gewebe des linken Atriums signifikant erhöht. Für TRPC1 wurde eine 2,5-fache Steigerung der Expression im Vergleich zum Ventrikelgewebe ermittelt (Ventrikel:  $1,00 \pm 0,17$  vs. Vorhof:  $2,51 \pm 0,41$ ;  $P=0,0022$ ). Die Steigerung der TRPC3-Expression im Vorhof betrug das 3,6-fache vom Ventrikel (Ventrikel:  $1,00 \pm 0,14$  vs. Vorhof:  $3,61 \pm 0,32$ ;  $P=0,0001$ ). Im Vorhofgewebe war außerdem TRPC6 mit einer 2-fachen Steigerung signifikant stärker exprimiert als im Ventrikelgewebe (Ventrikel:  $1,00 \pm 0,11$  vs. Vorhof:  $2,03 \pm 0,25$ ;  $P=0,0011$ ).

Der Ca-Sensor STIM1, der in der SR-Membran lokalisiert ist, war ebenfalls signifikant stärker im Vorhofgewebe exprimiert mit einer Steigerung von  $\approx 40\%$  (Ventrikel:  $1,00 \pm 0,08$  vs. Vorhof:  $1,41 \pm 0,12$ ;  $P=0,0083$ ). Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen zeigen, dass es hinsichtlich des SOCE nicht nur funktionelle Unterschiede zwischen Vorhof und Ventrikel gibt, sondern auch in Bezug auf die Proteinexpression.

Die Abbildung 3-22 C zeigt Original-Western Blots des Ca-regulierenden Proteins RyR und in Abbildung 3-22 D ist die relative Proteinexpression dazu dargestellt. Die Proteinexpression wurde auch hier auf die Ventrikelproben normalisiert. Im Gegensatz zu den deutlichen Steigerungen der Expression von am SOCE beteiligten Proteinen konnte für RyR (Ventrikel:  $1,00 \pm 0,15$  vs. Vorhof:  $1,14 \pm 0,15$ ;  $P=0,4903$ ) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Proteinexpression gefunden werden. Dies zeigt, dass im Vorhof keine grundsätzlich höhere Expression von Ca-regulierenden Proteinen gefunden werden kann.



**Abbildung 3-22 Unterschiedliche Proteinexpression von SOCE-Proteinen in Ventrikel- und Vorhofgewebe**

(A) Repräsentative Immunoblots von TRPC1, 3, 6 und STIM1 mit GAPDH als Ladekontrolle in ventrikulärem (V) und atrialem (A) Gewebe. (B) Gemittelte Daten der Proteinexpression von Proteinen, die am SOCE beteiligt sind. (C) Repräsentative Immunoblots von RyR mit GAPDH als Ladekontrolle. (D) Gemittelte Proteinexpression von RyR; Die Proteinexpression wurde auf die GAPDH-Expression normalisiert und die ventrikulären Daten dienten als Referenz (=100 %). N=8/8 (Ventrikel/Atrium); gepaarter Student t-test,  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$ .

## 4 Diskussion

Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom (SOCE) spielt eine wichtige Rolle für die Wiederauffüllung der intrazellulären Ca-Speicher sowie für die Aktivierung Ca-abhängiger Signalwege in elektrisch nicht-erregbaren Zellen. Der Mechanismus des SOCE und dessen Bedeutung ist in diesen Zellen heute weitgehend erforscht und gut verstanden (Putney, 2014; Tojyo et al., 2014; M. M. Wu et al., 2006). Untersuchungen, die sich mit dem SOCE in Herzmuskelzellen beschäftigen, liefern hingegen kontroverse Ergebnisse, weshalb die Rolle des SOCE in diesen Zellen bis zum heutigen Zeitpunkt umstritten bleibt. In Kardiomyozyten ist das intrazelluläre Ca für viele Zellfunktionen wie die Kontraktion, den Energiestoffwechsel oder die Gentranskription entscheidend und wird streng reguliert. Veränderungen des intrazellulären Ca können pathologische Signalwege auslösen, wie die hypertrophe Genexpression über den Calcineurin-NFAT oder den CaMKII-HDAC-Weg. Studien zeigen, dass das nucleäre Calcium dabei eine entscheidende Rolle spielt, indem es die Proteinexpression über die Ca-abhängige Gentranskription im Zellkern beeinflusst (Ljubojevic et al., 2014; Olivares-Florez et al., 2018; Plačkić et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des SOCE auf das cytoplasmatische Ca und erstmals auch auf das nucleäre Ca von adulten Kardiomyozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach experimenteller Entleerung der SR-Ca-Speicher in einer Ca-freien Messlösung mit Hemmstoffen der SERCA (Thapsigargin), des LTCC (Verapamil) und des NCX (KB-R7943) die Erhöhung des extrazellulären Ca den SOCE in adulten ventrikulären und atrialen Myozyten auslöste. Das Ca, das über die SOCE-Kanäle in der Plasmamembran ins Cytoplasma der Zelle strömte, gelangte dabei ebenfalls in den Zellkern und löste in beiden Kompartimenten eine messbare Ca-Erhöhung aus. Dabei war die nucleäre SOCE-Amplitude direkt von der cytoplasmatischen SOCE-Amplitude abhängig. Es wurde weiterhin gezeigt, dass der gemessene Ca-Einstrom im Wesentlichen durch TRPC- und Orai-Kanäle vermittelt wurde, die überwiegend in der Oberflächenmembran und nicht in den T-Tubuli der Ventrikelmyozyten lokalisiert waren. Die Befunde dieser Arbeit liefern damit wichtige Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des SOCE an der Ca-abhängigen Regulation der Gentranskription bei Herzerkrankungen.

#### 4.1 Die Erhöhung des extrazellulären Ca löst nach Speicherentleerung den SOCE in adulten Ventrikelmyozyten aus

Für die funktionellen Messungen des SOCE in adulten Kardiomyozyten wurde zunächst ein Messprotokoll etabliert. Zu Beginn des Protokolls wurden die Zellen elektrisch stimuliert und CaT aufgezeichnet. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Ca-freien Messlösung, die Thapsigargin, Verapamil und KB-R7943 enthielt, umspült. Eine anschließende zweifache Bolusgabe von Koffein führte zur vollständigen Entleerung der SR-Ca-Speicher. Schließlich wurde eine 2 mM Ca Messlösung über das Superfusionssystem auf die Zellen appliziert. Mit Hilfe dieses Versuchsprotokolls konnte eine kleine aber robuste Ca-Erhöhung im Cytoplasma und Nucleus gemessen werden. Die gemessene Ca-Erhöhung war dabei auf einen Ca-Einstrom zurückzuführen, da dieser durch die Erhöhung des extrazellulären Ca nach der Applikation einer Ca-freien Messlösung ausgelöst wurde und während der Messung die intrazellulären Ca-Speicher vollständig entleert wurden. Außerdem war der Ca-Einstrom durch bekannte SOCE-Inhibitoren (Gd, S66, BTP-2, SKF) blockierbar. Somit konnte die Ca-Erhöhung als SOCE identifiziert werden.

Frühere Studien zeigten bereits, dass SOCE-Proteine in adulten Kardiomyozyten exprimiert werden und für einen Ca-Einstrom nach Entleerung der intrazellulären Speicher sorgen (Hunton et al., 2004; Voelkers et al., 2010). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen das Vorhandensein eines Ca-Einstroms nach experimenteller Entleerung des SR mit Thapsigargin und Koffein. Für die Quantifizierung dieses Ca-Einstroms wurden zunächst die cytoplasmatischen und nucleären CaT-Amplituden der Ventrikelmyozyten ermittelt. Der Ca-Einstrom, der für die Kontraktion verantwortlich ist, wird während der elektromechanischen Kopplung vor allem durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vom L-Typ (LTCC) getragen. Jedem cytoplasmatischen CaT folgt dabei ein nucleärer CaT mit einer kleineren Amplitude. Der nucleäre CaT tritt mit einer zeitlichen Verzögerung auf, da das Ca durch passive Diffusion über die Kernporen in den Zellkern gelangt (Genka et al., 1999; Ljubojević et al., 2011; Ljubojevic & Bers, 2015). Erhöhte cytoplasmatische Ca-Konzentrationen verursachen daher ebenfalls eine Erhöhung der nucleären Ca-Konzentrationen (Ljubojevic & Bers, 2015). Die Bestimmung der CaT-Amplitude war ein wichtiger Arbeitsschritt zur Charakterisierung des SOCE, da das Verhältnis der ermittelten SOCE-Amplitude zur CaT-Amplitude gebildet wurde und der Anteil des SOCE im Vergleich zum CaT betrachtet wurde (normierte SOCE-Amplitude).

Der Einsatz einer Ca-freien Messlösung ist eine bewährte Methode zum Messen des SOCE (Bootman & Rietdorf, 2017). Mit der Lösung wurden außerdem Thapsigargin, KB-R7943 und Verapamil auf die Kardiomyozyten gebracht. Die Verwendung dieser Lösung führte in weniger als 60 Sekunden zu einem Verschwinden der CaT. Sowohl die Ca-freie Messlösung als auch

der Zusatz von Verapamil, als Blocker der LTCC, führte zu einer schnellen Verringerung des Ca-Einstroms durch diese Kanäle, so dass Kontraktionen ausblieben. Durch die Zugabe von Verapamil konnte eine mögliche Beteiligung der LTCC am SOCE ausgeschlossen werden. Thapsigargin hemmt spezifisch und irreversibel die SERCA, so dass die Ca-Aufnahme in das SR blockiert wurde. Das Blockieren der SERCA mittels Thapsigargin stellt einen essentiellen Schritt in experimentellen Messungen des SOCE dar (Sabourin et al., 2016b; Voelkers et al., 2010). Der Einsatz von Thapsigargin führt zur passiven Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher. Neben Thapsigargin, das am häufigsten eingesetzt wird, können auch andere SERCA-Inhibitoren, wie Cyclopiazonsäure oder Di-tert-Butylhydrochinon zur Speicherentleerung eingesetzt werden (Prakriya & Lewis, 2015). In Gegenwart der Ca-freien Messlösung erfolgte die zweifache Bolusapplikation einer Koffeinlösung in supraphysiologischer Konzentration (20 mM). Diese bewirkte durch die Aktivierung der RyR2 eine schnelle Freisetzung des gesamten (verbliebenen) SR-Ca-Gehalts. Dabei war ein Koffein-induzierter CaT nur bei der ersten Bolusapplikation detektierbar. Der zweite Bolus löste keinen weiteren Koffeintransienten aus, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass bereits mit dem ersten Bolus eine vollständige Speicherentleerung stattgefunden hatte. Die Bolusgabe des Koffeins ist unerlässlich, da trotz der Applikation der Ca-freien Messlösung mit Thapsigargin, KB-R und Verapamil in nahezu allen gemessenen Zellen noch Ca im SR vorhanden war und der SOCE erst nach einer vollständigen Speicherentleerung durch Thapsigargin oder CPA in Kombination mit einer Koffeinapplikation maximal aktiviert werden kann (Wen et al., 2018). Nach der Speicherentleerung in der Ca-freien Messlösung wurde die extrazelluläre Ca-Konzentration auf 2 mM Ca erhöht und ein langsamer Ca-Einstrom in die Zelle registriert. Hierbei muss beachtet werden, dass das Umschalten des Superfusionssystems von Ca-freier Messlösung auf eine Lösung mit einer hohen extrazellulären Ca-Konzentration von 2 mM zu einer bevorzugten Aktivierung des NCX im Rückwärtsmodus (Ca-Influx, Na-Efflux) führen kann. Durch den Zusatz von KB-R in der Ca-freien Messlösung war der NCX blockiert, so dass der gemessene Ca-Einstrom nicht durch den NCX getragen wurde. Der Ca-freien Messlösung war daher – neben Thapsigargin – immer auch Verapamil und KB-R zugesetzt.

Für die Messung der Ca-Erhöhung durch den SOCE wurde ein Zeitraum von 90 Sekunden gewählt. Am Ende dieses Zeitraums wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und als SOCE-Amplitude ausgewertet. Im Vergleich zu einem elektrisch-stimulierten CaT waren die gemessenen SOCE-Amplituden klein. Die SOCE-Amplituden wurden auf den zugehörigen CaT derselben Zelle normalisiert. Dies ermöglicht eine Abschätzung der durch den SOCE hervorgerufenen Ca-Erhöhung. Berücksichtigt werden muss dabei, dass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten keine direkten Aussagen über die absoluten Ca-Konzentrationen im Cytoplasma und Nucleus erlauben, da die Werte in dieser Arbeit nicht kalibriert wurden. Eine

Näherung kann durch die in früheren Arbeiten durchgeführten in situ Kalibrierungen der Fluo-4-Fluoreszenz von CaT in Ventrikelmyozyten von WKY erfolgen. Dabei wurden für die cytoplasmatische CaT-Amplitude Ca-Konzentrationen  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  von  $\approx 1200$  nM und für die kleinere nucleäre CaT-Amplitude  $[Ca^{2+}]_{nuc}$  von  $\approx 900$  nM ermittelt (Ljubojević et al., 2011; Plačkić et al., 2016). Die in dieser Arbeit erhobenen SOCE-Amplituden machten im Cytoplasma  $\approx 15$  % und im Nucleus  $\approx 25$  % eines CaT aus. Geht man grob vereinfachend davon aus, dass die kalibrierten Werte über den gesamten Konzentrationsbereich etwa linear sind, ergeben die normierten cytoplasmatischen und nucleären SOCE-Amplituden  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhungen von etwa 200 nM (Abb. 4-1).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen in adulten Rattenkardiomyozyten einen messbaren Ca-Einstrom nach experimenteller Entleerung der SR-Ca-Speicher mit anschließender Erhöhung des extrazellulären Ca nach. Viele Untersuchungen, die sich mit dem SOCE im Herzen beschäftigen, wurden hingegen in neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt, wohingegen es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht viele Untersuchungen zum SOCE in adulten Rattenkardiomyozyten gibt. Die Ergebnisse der Untersuchungen des SOCE in neonatalen Kardiomyozyten zeigen eindeutig, dass der SOCE in diesen Zellen vorhanden ist (Luo et al., 2012; Ohba et al., 2009; Voelkers et al., 2010). Auch in adulten Maus- und Rattenkardiomyozyten wurde bereits gezeigt, dass die Entleerung der SR-Ca-Speicher mit anschließender Erhöhung des extrazellulären Ca zu einem robusten Ca-Einstrom führt (Bartoli et al., 2020; Hunton et al., 2004; Kojima et al., 2012; Wen et al., 2018). Dahingegen zeigten andere Untersuchungen, dass es einen Ca-Einstrom durch SOCE in adulten Kardiomyozyten basal nicht – oder nur in wenigen der gemessenen Kardiomyozyten – gibt und dieser erst mit der Entwicklung einer Herzhypertrophie an Bedeutung gewinnt und gemessen werden kann (Luo et al., 2012; Nakayama et al., 2006; X. Wu et al., 2010; Zhao et al., 2015). Dessen ungeachtet sind die molekularen Komponenten des SOCE (STIM, Orai, TRPC) in adulten Kardiomyozyten exprimiert, wenn auch in geringerer Dichte als bei einer Hypertrophie (Bartoli et al., 2020; Nakayama et al., 2006; Saliba et al., 2015; Zhao et al., 2015). Die physiologische Bedeutung der SOCE-Proteine in adulten Kardiomyozyten bleibt bis heute unklar.

#### 4.1.1 Der nucleäre SOCE ist vom cytoplasmatischen SOCE abhängig

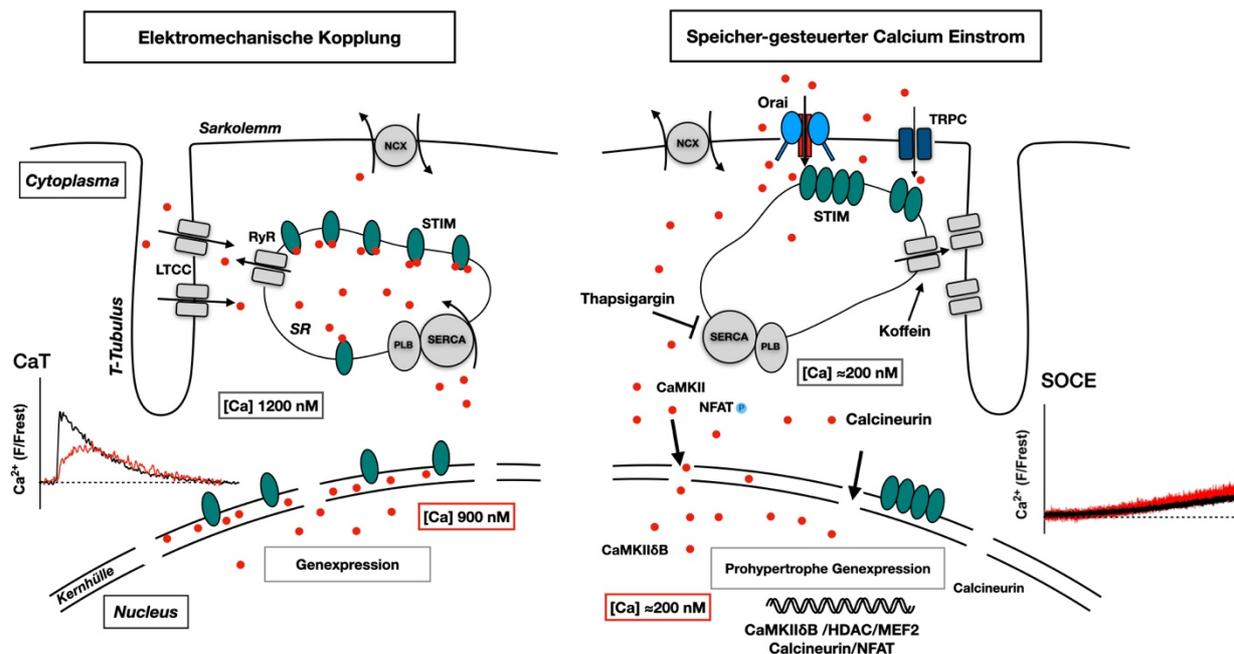
In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss des SOCE auf das Kerncalcium untersucht. Die cytoplasmatische und nucleäre Ca-Erhöhung durch den SOCE wurden dabei simultan gemessen. Aus diesen Messungen geht eine robuste nucleäre SOCE-vermittelte Ca-Erhöhung hervor. Im Gegensatz zum CaT, der im Nucleus kleiner ist als im Cytoplasma, wurden im Nucleus gleich große oder sogar größere SOCE-Amplituden als im Cytoplasma beobachtet. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Ca-Propagation aus dem Cytoplasma in den Zellkern beim SOCE erleichtert ist, was auch durch das Kern-Cyto-Verhältnis der SOCE-Amplituden mit Werten von  $>1$  begründet werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der SOCE in dieser Arbeit experimentell ausgelöst und gemessen wurde. Die SERCA war während der Messungen durch Thapsigargin irreversibel gehemmt, so dass die Wiederaufnahme von Ca ins SR blockiert wurde. Die Frage, ob das einströmende Ca für die Wiederauffüllung der intrazellulären Ca-Speicher genutzt wird, kann im Rahmen dieser Arbeit daher nicht beantwortet werden. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass die Hemmung der SERCA mit Thapsigargin zu einer erleichterten Ca-Propagation aus dem Cytoplasma in den Zellkern führt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erleichterte Ca-Propagation in den Nucleus während des SOCE durch diesen Umstand gefördert wurde. Unter physiologischen Bedingungen würde zumindest ein Teil des einströmenden Ca durch die SERCA zurück ins SR aufgenommen werden (Kiess & Kockskämper, 2019).

Die Abhängigkeit des nucleären Ca vom cytoplasmatischen Ca wurde bereits in früheren Untersuchungen für den CaT gezeigt (Kiess & Kockskämper, 2019; Kockskämper, Seidlmayer, et al., 2008). Dieser Befund konnte in dieser Arbeit für das Ca, das mittels SOCE in die Zelle strömt, bestätigt werden (Abb. 3-5 E). So wurde eine lineare Beziehung zwischen dem SOCE im Nucleus und im Cytoplasma ermittelt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der cytoplasmatische SOCE die Grundlage für den nucleären SOCE bildet. Außerdem könnte dieser Befund darauf hinweisen, dass der Ca-Einstrom über SOCE in das Cytoplasma das nucleäre Ca direkt beeinflusst. Die erhöhten nucleären Ca-Konzentrationen, verursacht durch SOCE, könnten dabei zur Aktivierung prohypertropher Wege beitragen. STIM1 ist neben der Membran des SR bzw. ER auch in der äußeren Kernmembran und den Kern-Tubuli lokalisiert (S.-H. Lee et al., 2018; Stathopoulos et al., 2006). Da auch die Kernhülle einen Ca-Speicher darstellt und über die äußere Kernmembran an das SR-Membransystem angrenzt, könnte STIM1 in der Kernhülle ebenfalls als Ca-Sensor fungieren. In Ventrikelmyozyten reicht das dichte T-Tubuli-Netzwerk nah an den Zellkern heran (Olivares-Florez et al., 2018).

Möglicherweise kann STIM1 auf der Kernhülle somit ebenfalls SOCE-Kanäle in den T-Tubuli – falls vorhanden – aktivieren. Der so ausgelöste Ca-Einstrom könnte schließlich zur

Wiederauffüllung der entleerten Kernhülle beitragen. Der SOCE hat insgesamt das Potenzial, das Kerncalcium zu erhöhen und prohypertrophe Signalwege über Calcineurin oder die CaMKII zu aktivieren (Abb. 4-1). Der SOCE könnte auch mit der Aktivierung anderer Signalwege, wie dem  $G_q$ -gekoppelten Signalweg verknüpft sein. Die Stimulation eines  $G_q$ -gekoppelten Rezeptors durch neurohumorale Faktoren führt zur Aktivierung der PLC und damit zur Bildung von  $IP_3$  und DAG.  $IP_3$  bewirkt durch die Aktivierung des  $IP_3$ -Rezeptors eine Ca-Freisetzung aus dem SR. Dabei könnte STIM eine Konformationsänderung durchlaufen und den SOCE aktivieren (Watanabe et al., 2008). Das gebildete DAG kann einige TRPC-Kanäle (3,6 und 7) direkt aktivieren (Hofmann et al., 1999; Lemonnier et al., 2009). Der folgende Ca-Einstrom kann prohypertrophe Signalwege in Kardiomyozyten über NFAT aktivieren und so zum kardialen Remodeling beitragen (Onohara et al., 2006). Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptoren ( $G_s$ -gekoppelt) zu keiner Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher. Studien hierzu zeigten, dass der TRPC-Blocker SKF-96365 keinen Einfluss auf den positiv inotropen Effekt, der durch den Agonisten Isoprenalin ausgelöst wurde, hatte (Pang et al., 2004).

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Erhöhung des extrazellulären Ca nach Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher einen Ca-Einstrom auslöste, der zu einem messbaren intrazellulären Ca-Anstieg führte (Abb. 4-1). Der Ca-Einstrom war dabei nicht nur im Cytoplasma detektierbar, der SOCE hatte ebenfalls Zugang zum Zellkern und führte dort zu ähnlich großen SOCE-Amplituden wie im Cytoplasma. Die cytoplasmatischen CaT-Amplituden waren hingegen größer als die nucleären. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der Ca-Einstrom durch SOCE eine wichtige Rolle für die Erhöhung des cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen Ca zu spielen scheint.



**Abbildung 4-1 Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom in Ventrikelmyozyten**

Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung (links) sowie des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (rechts) in Ventrikelmyozyten. Dem cytoplasmatischen CaT (schwarz) folgt ein nucleärer CaT (rot) mit einer zeitlichen Verzögerung und kleineren Amplitude. Während der elektromechanischen Kopplung liegt STIM als Monomer in der SR-Membran vor, STIM (grün) wird nach Speicherentleerung durch Thapsigargin und Koffein aktiviert, bildet Homooligomere und aktiviert Plasmamembran-Kanäle (Orai und TRPC). Durch SOCE-Kanäle einströmendes Ca gelangt über das Cytoplasma in den Zellkern und kann über verschiedene Ca-abhängige Signalwege zur prohypertrophen Genexpression beitragen.

## 4.2 Orai- und TRPC-Kanäle tragen zum Ca-Einstrom in Ventrikelmyozyten bei

Beim SOCE in elektrisch nicht-erregbaren Zellen vermittelt STIM1 durch das Erkennen von Ca-Verlusten aus dem ER die Aktivierung der Plasmamembran-Kanäle Orai und TRPC (Smyth et al., 2010). Lanthanoide, wie Gadolinium oder Lanthan, sind Substanzen, die den Ca-Einstrom durch SOCE effektiv hemmen (G. S. Bird et al., 2008). In dieser Arbeit wurde daher der Ca-Einstrom zunächst durch den unspezifischen Kationenkanalblocker Gadolinium gehemmt. Durch die Applikation von Gd sank die SOCE-Amplitude sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus deutlich um  $\approx 75\%$ . Es ist beschrieben, dass Gd bei Konzentrationen über  $100\ \mu\text{M}$  auch die Plasmamembran Ca-ATPase (PMCA) hemmt (G. St. J. Bird & Putney, 2005; van Breemen et al., 1972). In dieser Arbeit wurde Gd in einer Konzentration von  $1\ \text{mM}$  eingesetzt. Daher kann angenommen werden, dass durch die Applikation von Gd auch der Ca-Ausstrom durch die PMCA gehemmt wurde. Dieser macht in Rattenkardiomyozyten zusammen mit dem mitochondrialen Ca-Uniporter jedoch lediglich einen Anteil von  $\approx 1\%$  aus (Bers, 2002), weshalb dieser Ca-Ausstrom quantitativ nicht stark ins Gewicht fiel. Gd führte zu einer erheblichen Reduktion der SOCE-Amplitude, woraus geschlossen werden kann, dass vermutlich TRPC- und/ oder Orai-Kanäle für den Ca-Einstrom sorgen. Als unspezifischer Kationenkanalblocker kommt Gd häufig in SOCE-Experimenten in Kardiomyozyten zum Einsatz und hemmt dort effektiv den Ca-Einstrom (Luo et al., 2012; Seth et al., 2009; Wen et al., 2018). Ebenso geeignet ist das Lanthanoid Lanthan, das gleichermaßen zur unspezifischen Hemmung des Ca-Einstroms durch SOCE genutzt werden kann (Hunton et al., 2004; Luo et al., 2012). Aus den Ergebnissen der Gd-Versuchsreihe konnte keine Aussage über die Anteile von Orai- oder TRPC-Kanälen am SOCE getroffen werden. Im nächsten Schritt wurden deshalb spezifischere Orai- oder TRPC-Blocker eingesetzt. Der STIM/Orai-Signalweg wurde mit den pharmakologischen Inhibitoren S66 ( $1\ \mu\text{M}$ ) oder BTP-2 ( $3\ \mu\text{M}$ ) blockiert. Diese Substanzen blockierten den Ca-Einstrom über den genannten Signalweg nach einer Inkubationszeit von  $> 20$  Minuten (G. S. Bird & Putney, 2017). Die SOCE-Amplituden sanken um  $\approx 25\text{-}30\%$  im Cytoplasma und um  $\approx 30\text{-}40\%$  im Nucleus.

Neben BTP-2 und S66 gibt es weitere Orai-spezifische Inhibitoren. Die auf der Struktur von S66 beruhende Substanz JPIII bewirkt eine deutliche Reduktion des Ca-Einstroms nach Speicherentleerung in isolierten Ventrikelmyozyten (Bartoli et al., 2020). Die Untersuchung zeigt, dass der Einsatz von JPIII in einem TAC-Hypertrophie-Modell zu einer Reduktion des SOCE auf das Niveau der Kontrollmyozyten führt.

Die spezifische Hemmwirkung von S66 und BTP-2 auf Orai wurde in dieser Arbeit bestätigt, da die Substanzen keinen Einfluss auf die elektrisch-stimulierten CaT hatten. Das spricht

umgekehrt auch dafür, dass Orai selbst keinen Einfluss auf den elektrisch-stimulierten CaT von Ventrikelmyozyten hat.

SKF 96365 (SKF, 5  $\mu$ M) ist eine Imidazolverbindung und ein unspezifischer Kationenkanalblocker. SKF blockiert TRPC-Kanäle, jedoch zeigten Studien ebenfalls eine hemmende Wirkung von SKF auf andere Kanäle, z. B. den LTCC (Singh et al., 2010). Die hemmende Wirkung auf den LTCC wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da mit der Ca-freien Messlösung bereits der LTCC-Hemmer Verapamil appliziert wurde. Die Kardiomyozyten wurden mit SKF nicht vorinkubiert, da die Analyse der CaT-Amplitude zu Beginn der Messungen, wie zuvor beschrieben, eine wichtige Komponente in der Quantifizierung des SOCE darstellt. Die Substanz wurde daher zusammen mit der Ca-freien Messlösung auf die Zellen gegeben. Die SOCE-Amplituden wurden dadurch um  $\approx 35\%$  im Cytoplasma und um  $\approx 40\%$  im Zellkern gesenkt. Spezifische SOCE-Inhibitoren werden häufig in verschiedenen Hypertrophie-Modellen (TAC, Überexpression) eingesetzt. Dabei führt der Einsatz von SKF in transgenen Mäusen, die TRPC3 überexprimieren, zu einer deutlichen Reduktion des SOCE. Auch in den Wildtyp-Mäusen konnte der SOCE, der nur in wenigen Zellen gemessen werden konnte, durch den Einsatz von SKF blockiert werden (Nakayama et al., 2006). Eine andere Studie zeigt, dass nach einem Myokardinfarkt die Expression von TRPC1,3,4 und 6 erhöht ist und der gemessene SOCE durch den Einsatz von SKF ebenfalls deutlich blockiert werden kann (Makarewich et al., 2015).

Die Verwendung von S66, BTP-2 oder SKF reduzierte in dieser Arbeit in allen drei Fällen den SOCE. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass der gemessene Fluoreszenzanstieg durch einen Ca-Einstrom vermittelt wird, der durch Orai- und TRPC-Kanäle verursacht wird. Die Inhibitoren blockierten dabei den Ca-Einstrom in Ventrikelmyozyten etwa gleich stark. Ein ähnlicher Befund wurde in Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten gefunden (Touchberry et al., 2011). In dieser Untersuchung reduzierte die Inkubation der Zellen mit BTP-2 oder SKF den SOCE-vermittelten Ca-Einstrom (nach Speicherentleerung mit Thapsigargin und Koffein) deutlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass der Ca-Einstrom zu etwa gleichen Teilen von Orai- und TRPC-Kanälen getragen wird. Diese Hypothese kann weiterhin darauf gestützt werden, dass die Kombination von S66 als Blocker von Orai mit dem TRPC-Blocker SKF eine deutlich größere Reduktion der SOCE-Amplituden sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern um  $\approx 60\%$  ergab. Der Versuchsteil zeigte, dass in adulten Rattenkardiomyozyten sowohl Orai- als auch TRPC-Kanäle nach experimenteller Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher aktiviert werden und zum SOCE beitragen.

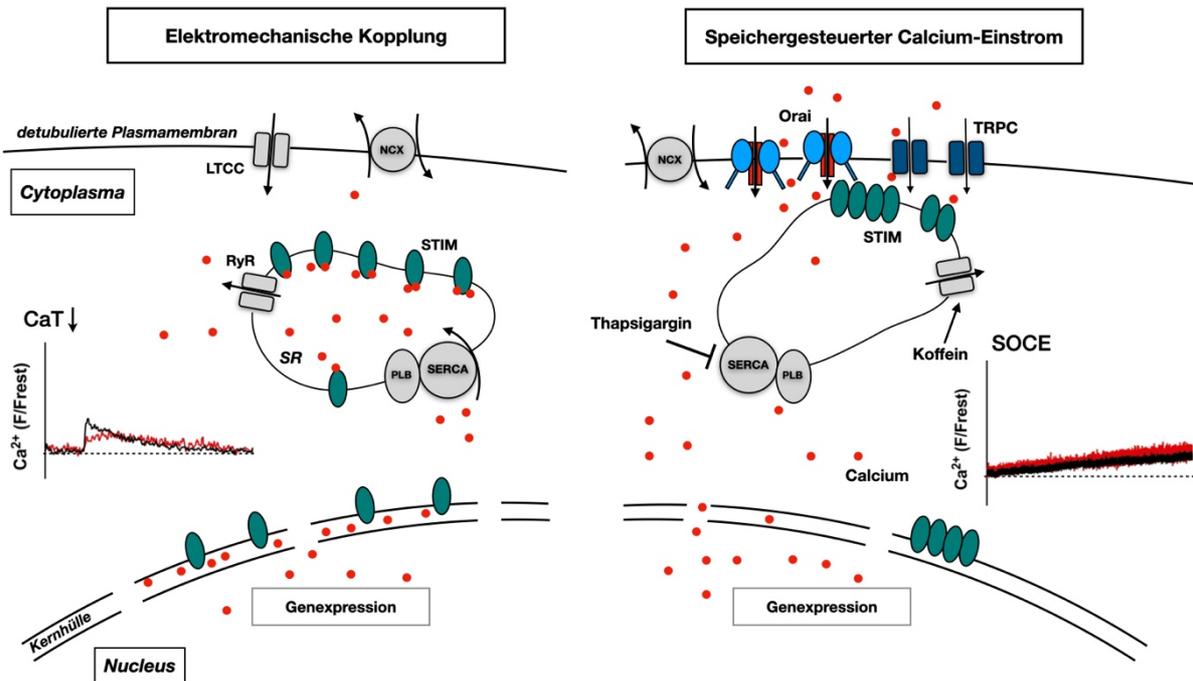
### 4.3 Die Aktivierung des SOCE benötigt keine T-Tubuli

Die T-Tubuli sind ein Charakteristikum von adulten Ventrikelmyozyten. Sie stellen ein komplexes Membrannetzwerk dar, das tief in die Zelle hereinreicht (Soeller & Cannell, 1999). Ca-regulierende Proteine, wie z.B. der LTCC oder der NCX sind überwiegend in den T-Tubuli lokalisiert (Brette et al., 2004). Für die elektromechanische Kopplung sind die T-tubulären Einstülpungen daher unerlässlich. Etwa 75 % der Dyaden, in denen die LTCC in enger Verbindung zum SR stehen und so zu einer homogenen Ca-Freisetzung in der gesamten Zelle führen, sind in den T-Tubuli lokalisiert (Brette et al., 2006; Orchard et al., 2009; Scriven et al., 2000). Frühere Arbeiten, die sich mit der Lokalisation von Orai- und TRPC-Kanälen in adulten Kardiomyozyten beschäftigten, lieferten zum Teil kontroverse Ergebnisse. Die Studien zeigen, dass die verschiedenen TRPC-Isoformen sowohl in der Plasmamembran als auch in den T-Tubuli, jedoch in unterschiedlicher Dichte exprimiert werden. Für TRPC1 wurde die Lokalisation sowohl in den T-Tubuli (Huang et al., 2009; Jiang et al., 2014; Ward et al., 2008) als auch in der Plasmamembran beschrieben (Kojima et al., 2010). TRPC4 scheint hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert zu sein (Jiang et al., 2014; Kojima et al., 2010). Die Lokalisation von TRPC3 wurde in den axialen Komponenten der T-Tubuli beschrieben (Goel et al., 2007). Andere Arbeiten zeigten, dass TRPC3 überwiegend in der Plasmamembran und nicht in den T-Tubuli vorkommt (Fauconnier et al., 2007; Kojima et al., 2010). Die TRPC6-Lokalisation wurde neben den T-Tubuli auch in der Plasmamembran beschrieben (Doleschal et al., 2015; Jiang et al., 2014; Mohl et al., 2011). Die Lokalisation von Orai-Kanälen wurde basal bisher überwiegend an der Plasmamembran beschrieben (Bartoli et al., 2020; Saliba et al., 2015).

Mit einem Formamid-induzierten osmotischen Schock wurden in dieser Arbeit Ventrikelmyozyten detubuliert und die erfolgreiche Detubulierung mit 2D-Konfokalaufnahmen bestätigt. Durch die Detubulierung sanken die gemessenen Amplituden der elektrisch stimulierten CaT sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus um 35-40 % (Abb. 4-2, links). Kawai et al. zeigten bereits im Jahr 1999 mit den ersten Detubulierungsversuchen an Rattenmyozyten eine deutliche Reduktion der CaT-Amplitude und des Ca-Einstroms durch LTCC um  $\approx 75\%$  (Kawai et al., 1999). Weitere Arbeiten von Brette und Orchard bestätigten ebenfalls die deutliche Reduktion der CaT-Amplitude nach der Detubulierung von Ventrikelmyozyten mit Formamid (Brette et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass LTCC überwiegend in den T-Tubuli lokalisiert sind. Nach erfolgreicher Detubulierung wurden die Myozyten dem Versuchsprotokoll zum Messen des SOCE unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass die Detubulierung keine Auswirkungen auf den Ca-Einstrom durch SOCE hatte. Die SOCE-Amplituden der detubulierten Zellen unterschieden sich nicht von den unbehandelten Kontrollzellen. Zieht man für diese Versuchsreihe ebenfalls die kalibrierten Werte für die CaT

früherer Arbeiten heran, können für den SOCE in den detubulierten Myozyten, ebenfalls grob vereinfacht, ähnliche nucleäre und cytoplasmatische Ca-Konzentrationen von  $\approx 200$  nM errechnet werden. Die Detubulierung hat demnach keinen Einfluss auf den SOCE-vermittelten Ca-Einstrom. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass TRPC- und Orai-Kanäle überwiegend in der nicht-T-tubulären Plasmamembran von Ventrikelmyozyten verteilt sind und die Aktivierung des SOCE daher keine T-Tubuli benötigt (Abb. 4-2, rechts). Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen überwiegend mit den Befunden anderer Arbeiten überein (Fauconnier et al., 2007; Kojima et al., 2010; Mohl et al., 2011). Die restlichen TRPC, die eventuell in den T-Tubuli exprimiert sind, spielen demnach quantitativ unter den genannten Bedingungen keine große Rolle.

Die Herzhypertrophie kann mit Veränderungen der T-Tubuli-Struktur einhergehen. Dabei kann es zu einer Umstrukturierung, zum Verlust oder zur Reduktion der Dichte der T-Tubuli kommen (Heinzel et al., 2008). Untersuchungen zur Lokalisation von Orai- oder TRPC-Kanälen in Hypertrophie-Modellen zeigten, dass es zu veränderten Expressionsmustern kommen kann. Viele Untersuchungen zeigen eine erhöhte Expression von Orai- und/oder TRPC-Kanälen während der Hypertrophie. TRPC4-Proteine, die basal überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurden in transgenen Mäusen bei einer Überexpression vermehrt in den T-Tubuli gefunden (X. Wu et al., 2010). Eine andere Untersuchung zeigt, dass eine erhöhte Expression von TRPC3 oder die Stimulation der Kardiomyozyten mit Angiotensin II zu einer Änderung der Lokalisation von TRPC3 zu überwiegend in der Plasmamembran führt (Doleschal et al., 2015). Immunocytochemische Untersuchungen von Orai in einem TAC-Modell zeigen eine eher diffuse Verteilung der Proteine in den T-Tubuli während der Herzhypertrophie (Bartoli et al., 2020). In einem Herzinsuffizienz-Modell der Ratte zeigten die mit di-8-ANEPPS gefärbten Ventrikelmyozyten eine deutliche Reduktion der T-Tubuli-Dichte (Lyon et al., 2009). Sind die aktivierten SOCE-Kanäle, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, vornehmlich in der nicht-T-tubulären Plasmamembran lokalisiert, wäre die Aktivierung des SOCE von diesen strukturellen Veränderungen jedoch nicht betroffen, so dass das Ca über diese Kanäle ungehindert in die Zellen strömen kann. Die Umstrukturierungen der T-Tubuli während der Herzhypertrophie führt zu einem vermindertem Ca-Einstrom durch LTCC, weshalb der Ca-Einstrom durch die SOCE-Kanäle diesen verminderten Einstrom kompensieren könnte. Darüber hinaus hätte der Ca-Einstrom durch die SOCE-Kanäle in hypertrophierten Herzen das Potenzial, Umbauprozesse wie die prohypertrophe Genexpression zu verstärken.



**Abbildung 4-2 SOCE-Kanäle sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert**

Links: schematische Darstellung eines detubulierten Ventrikeldomyozyten und daraus resultierendem erniedrigtem CaT; rechts: speichergesteuerter Calcium-Einstrom: SOCE-Kanäle (Orai, TRPC) sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Der SOCE bleibt nach der Detubulierung unverändert groß.

#### 4.4 Der SOCE ist in der frühen Hypertrophie in SHR nicht erhöht

Zunächst wurden funktionelle SOCE-Messungen an isolierten Ventrikelmyozyten von SHR durchgeführt. Die dafür verwendeten Tiere waren 12-16 Wochen alt und befanden sich demnach am Beginn der Entstehung einer LV-Hypertrophie. Die Analyse der CaT-Amplitude ergab, in Übereinstimmung mit früheren Studien (Chen-Izu et al., 2007; Plačkić et al., 2016), sowohl größere cytosolische als auch nucleäre Amplituden im Vergleich zu WKY. In diesem frühen Stadium der Erkrankung treten damit bereits Veränderungen in der Ca-Regulation der Kardiomyozyten auf. Dabei sind die Ursachen dieser Veränderungen bis heute nicht abschließend geklärt. Die Messungen des SOCE ergaben in den isolierten Kardiomyozyten der SHR sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus keine erhöhten Amplituden im Vergleich zu WKY. Die Arbeiten, die sich mit der in situ Kalibrierung der Fluo-4-Fluoreszenz der CaT beschäftigten, zeigten höhere cytoplasmatische und nucleäre Ca-Konzentrationen der SHR-Ventrikelmyozyten im Vergleich zu den WKY-Ventrikelmyozyten. Die cytoplasmatischen und nucleären CaT-Amplituden betragen in den SHR-Myozyten  $\approx 1900-2000$  nM (Plačkić et al., 2016). Die in dieser Arbeit ermittelten SOCE-Amplituden machten in den SHR-Myozyten im Cytoplasma einen Anteil von  $\approx 12$  % vom CaT und im Nucleus von  $\approx 21$  % vom CaT aus und waren damit vergleichbar mit denen der WKY-Myozyten. Betrachtet man die normierten SOCE-Amplituden in Bezug auf die kalibrierten Ca-Konzentrationen, kann man vereinfacht davon ausgehen, dass der SOCE in SHR-Myozyten cytoplasmatische  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhungen von  $\approx 250$  nM und nucleäre  $[Ca^{2+}]$ -Erhöhungen von  $\approx 400$  nM verursachen kann. Im Vergleich zu den WKY-Myozyten ist das cytoplasmatische Ca im frühen Stadium der Hypertrophie durch SOCE wenig verändert, wohingegen das nucleäre Ca stärker ansteigt und zu  $\approx 60$  % höheren Ca-Konzentrationen führen kann. Dieser Befund kann nicht abschließend erklärt werden. Kommt es während der Pathogenese der Herzhypertrophie zu Umstrukturierungen der T-Tubuli, die ebenfalls mit erhöhten Expressionen der SOCE-Kanäle (Orai, TRPC) in den T-Tubuli einhergehen, könnte dies zu einem präferentiellen Zugang des einströmenden Ca in den Nucleus führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten die vorhandenen Daten um neue Ergebnisse aus Detubulierungsuntersuchungen in SHR-Ventrikelmyozyten erweitert werden.

Die Ergebnisse aus den funktionellen Messungen dieser Arbeit wurden weiterhin durch die Befunde aus den Western Blot-Untersuchungen ergänzt. Dabei wurde die Expression von TRPC1, 3, 4 und 6 sowie von STIM1 untersucht. Im LV-Gewebe der SHR wurden keine Unterschiede in der Proteinexpression von TRPC1, 4 und 6 sowie von STIM1 im Vergleich zum Gewebe der normotensiven WKY gefunden. Lediglich für TRPC3 konnte eine erhöhte Expression um 50 % im SHR-Gewebe ermittelt werden. Für TRPC1,3 und 6 wurde bereits

eine wichtige Rolle bei der Herzhypertrophie beschrieben (Eder & Molkentin, 2011; Ohba et al., 2009; Onohara et al., 2006). Des Weiteren wurde in einem Hypertrophie-Modell an neonatalen Ratten mit der Durchführung einer TAC erhöhte STIM1-Expression gefunden, die mit einer verstärkten Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs einherging. Die Hemmung von STIM1 verhinderte hingegen die durch Agonisten induzierte Entstehung der Hypertrophie (Luo et al., 2012). Mäuse mit einem TRPC1-Genknockout zeigen bei chronisch induziertem Stress durch Angiotensin II oder einer TAC keine Zeichen einer Hypertrophie, weshalb TRPC-Kanälen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzhypertrophie zugeschrieben wird (Seth et al., 2009). Eine erhöhte TRPC3-Expression wurde bereits in einem TAC-Hypertrophie-Modell an adulten Kardiomyozyten demonstriert (Bush et al., 2006). TRPC3 kann demnach eine entscheidende Komponente in der Pathogenese der Herzhypertrophie darstellen (Watanabe et al., 2008).

Ein Hypertonus und der Beginn einer Herzhypertrophie scheinen noch keinen Einfluss auf die Expression oder die Aktivierung der am SOCE beteiligten Proteine zu haben. Der Beginn der Erkrankung hat seinen Ursprung daher wahrscheinlicher in anderen Mechanismen, wie z.B. der erhöhten Aktivierung des RAAS-Systems (Berridge et al., 2003; Bisping et al., 2014). Dennoch könnte es mit Fortschreiten der Erkrankung bis zum Übergang in die Herzinsuffizienz zu einer übermäßigen Aktivierung des SOCE kommen. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten weitere Versuche mit älteren SHR durchgeführt werden. Außerdem kann angenommen werden, dass es durch eine gesteigerte Aktivierung des RAAS-Systems, was mit einer vermehrten Bildung von Angiotensin II einhergeht, in der Zelle vermehrt zur Ca-Freisetzung aus dem SR oder der Kernhülle durch die Aktivierung von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren kommt. Nicht abschließend geklärt ist, ob unter diesen Umständen STIM1 bereits eine Aktivierung erfährt und damit die Plasmamembrankanäle aktiviert und so für Veränderungen der cytosolischen Ca-Konzentration sorgt. Die Aktivierung des SOCE erfolgte in dieser Arbeit durch eine experimentelle Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher, so dass auf die physiologische Aktivierung des SOCE keine Rückschlüsse gezogen werden können.

## 4.5 Der SOCE in Vorhofmyozyten

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen ventrikulären und atrialen Myozyten (Kockskämper, 2016), wurde der SOCE auch in Vorhofmyozyten charakterisiert. Zur Messung des SOCE in Vorhofmyozyten wurde das gleiche Messprotokoll wie für die Ventrikelmyozyten verwendet. Wie zuvor beschrieben, weisen ventrikuläre Myozyten ein regelmäßiges T-tubuläres System auf, das in atrialen Rattenmyozyten in dieser Ausprägung nicht vorkommt (Abb. 3-17 A). Daraus resultieren Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung, die auch abgebildet werden konnten. Die zu Beginn des Versuchsprotokolls gemessenen atrialen CaT erschienen im transversalen Linescan eher U-förmig (Abb. 3-17 A), im Gegensatz dazu zeigten ventrikuläre Myozyten einen gleichmäßigen, homogenen CaT (Hüser et al., 1996). Zur Speicherentleerung wurde wie zuvor beschrieben Koffein als zweifache Bolusapplikation direkt in die Messkammer gegeben. Auch die Messungen der Vorhofmyozyten ergaben eine messbare koffeininduzierte Ca-Erhöhung nur während der ersten Bolusgabe. Der zweite Bolus konnte keinen weiteren Koffeintransienten auslösen, weshalb von einer vollständigen Speicherentleerung ausgegangen werden konnte. Die Zugabe von Ca führte zur langsamen Ca-Erhöhung im Cytoplasma und Nucleus, das bedeutet es war ein SOCE messbar. Zwischen dem cytoplasmatischen und dem nucleären SOCE konnte – wie in den Ventrikelmyozyten – eine starke, positive Korrelation beobachtet werden. Der cytoplasmatische SOCE bildet demnach auch in den Vorhofmyozyten die Grundlage für den nucleären SOCE. Das Kern-Cyto-Verhältnis der SOCE-Amplitude war – ebenso wie in den Ventrikelmyozyten – zu größeren Werten im Vergleich zum CaT verschoben, was auf eine erleichterte Ca-Propagation während des SOCE in den Zellkern hinweist. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die SERCA durch Thapsigargin irreversibel gehemmt war und die erleichterte Ca-Propagation in den Nucleus zumindest teilweise durch diesen Umstand gefördert werden könnte (Kiess & Kockskämper, 2019). Die CaT-Amplituden von Vorhofmyozyten sind mindestens genau so groß wie die von Ventrikelmyozyten, wobei atriale CaT auch größer als ventrikuläre sein können (Bootman et al., 2011; Ljubojević et al., 2011). Die normierten SOCE-Amplituden ergaben in den Vorhofmyozyten im Cytoplasma im Median  $\approx 36\%$  und im Nucleus  $\approx 78\%$ . Nähert man sich auch hier über die kalibrierten Ca-Konzentrationen früherer Arbeiten (Ljubojević et al., 2011; Plačkić et al., 2016) den Ca-Konzentrationen, die durch den SOCE verursacht werden, können in den Vorhofmyozyten  $[Ca^{2+}]_{cyto}$  von 450 nM und  $[Ca^{2+}]_{nuc}$  von 700 nM errechnet werden. In den Vorhofmyozyten werden durch den SOCE demzufolge sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern deutlich größere Ca-Erhöhrungen als in den Ventrikelmyozyten erreicht. Warum der SOCE in den Vorhofmyozyten zu erhöhten nucleären im Vergleich zu cytoplasmatischen Ca-Konzentrationen führt, bleibt unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre das Vorhandensein

eines axialen Tubulussystems der Vorhofmyozyten. Das axiale Tubulussystem reicht dicht an den Nucleus heran (Brandenburg, Kohl, et al., 2016). Sind die SOCE-Kanäle in den Vorhofmyozyten in großer Dichte in diesem Tubulussystem exprimiert, könnte der SOCE-vermittelte Ca-Einstrom dann einen bevorzugten Zugang zum Zellkern haben und die erhöhten Ca-Konzentrationen verursachen.

Auch in den Vorhofmyozyten wurden die SOCE-Inhibitoren eingesetzt, um den Anteil von Orai- und/oder TRPC-Kanälen am gemessenen SOCE zu bestimmen. Alle eingesetzten Inhibitoren verringerten den SOCE deutlich. Dabei wurden die normierten SOCE-Amplituden im Cytoplasma durch die Orai-Blocker S66 und BTP-2 um  $\approx 70-80\%$  und durch den TRPC-Blocker SKF um  $\approx 80\%$  reduziert. Auch im Nucleus konnte die Ca-Erhöhung durch den SOCE mit dem Einsatz der genannten Inhibitoren deutlich um  $\approx 75-80\%$  verringert werden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass der SOCE auch in Vorhofmyozyten sowohl von Orai- als auch von TRPC-Kanälen getragen wird. Die Kombination eines Orai-Blockers mit einem TRPC-Blocker führte überraschenderweise zu keinem zusätzlichen inhibitorischen Effekt in den Vorhofmyozyten. Ein additiver Effekt konnte nur in den Ventrikelmyozyten beobachtet werden. Orai- und TRPC-Proteine können neben ihrer homomeren Struktur auch als heteromere Orai-TRPC-Komplexe vorliegen (Liao et al., 2008). Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese heteromeren Orai-TRPC-Komplexe auch in Kardiomyozyten vorkommen. Weiterhin bleibt unklar, ob die Komplexe auch von den bekannten Orai- und TRPC-Blockern gehemmt werden können. Sollten die Orai-TRPC-Komplexe in Vorhofmyozyten vorkommen und diese sowohl durch die Orai- als auch den TRPC-Blocker gehemmt werden, könnte dies erklären, weshalb durch die Kombination eines Orai-Blockers mit einem TRPC-Blocker keine zusätzliche Reduktion des SOCE erreicht wurde.

#### 4.6 Der SOCE unterscheidet sich zwischen atrialen und ventrikulären Myozyten

Die SOCE-Amplitude war in Vorhofmyozyten annähernd doppelt so groß wie in Ventrikelmyozyten, und zwar sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus (Abb. 3-18 B). Auch die normierten SOCE-Amplituden waren in Vorhofmyozyten signifikant größer als in Ventrikelmyozyten. Die Aktivierung des SOCE führt daher in Vorhofmyozyten zu einem erhöhten Ca-Einstrom. Aufgrund dieser Ergebnisse aus den funktionellen Messungen wurden Western Blot-Untersuchungen der SOCE-Proteine TRPC1, 3 und 6 sowie von STIM1 in linkem Vorhof- und Ventrikelgewebe durchgeführt. Für den Vergleich der Proteinexpression von Orai1 konnten keine Daten erhoben werden, da für Orai1 kein funktionierender Antikörper gefunden werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass das Vorhofmyokard eine deutlich höhere Proteinexpression für alle genannten SOCE-Proteine im Vergleich zu Ventrikelmyokard

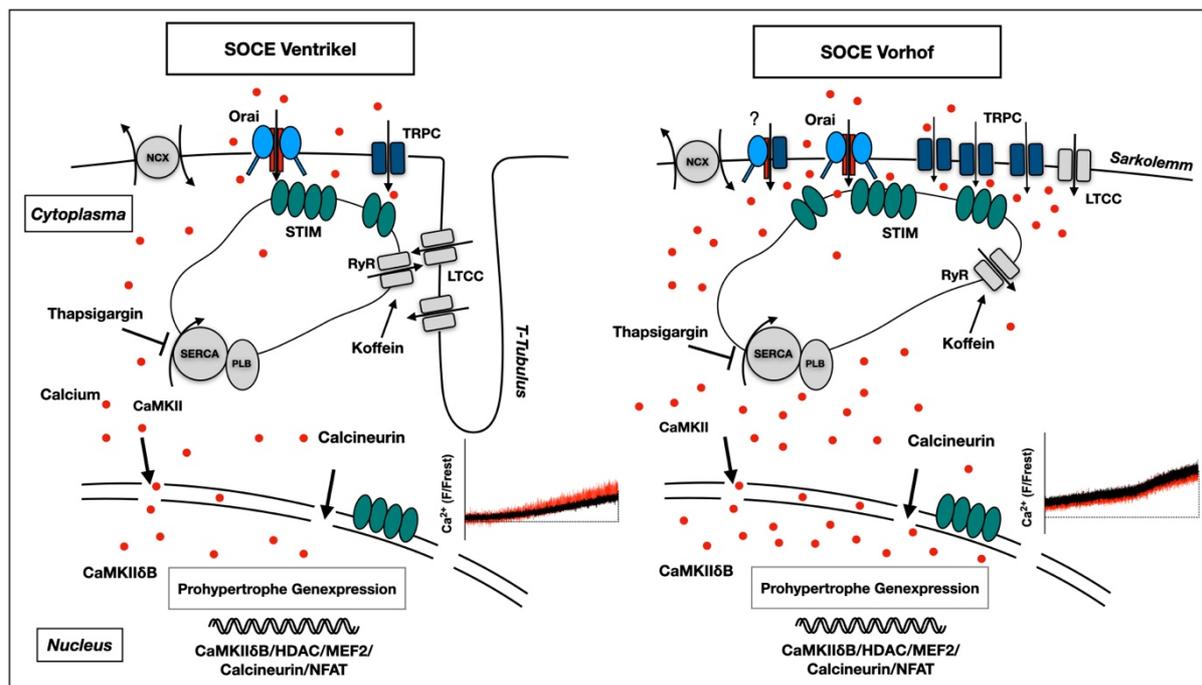
aufweist. Dieses Ergebnis korreliert mit den erhöhten SOCE-Amplituden in den Vorhofmyozyten. Im Gegensatz zu den erhöhten Expressionen der SOCE-Proteine, war der RyR, ein Ca-regulierendes Protein, im Vorhofmyokard auf ähnlichem Niveau wie im Ventrikelgewebe exprimiert. Dieser Befund geht mit den Ergebnissen aus Western Blot-Untersuchungen an Vorhof- und Ventrikelmyozyten von Kaninchen einher (Domeier et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass es keine grundsätzlich höhere Expression von Ca-regulierenden Proteinen in Vorhofgewebe gibt. Somit kann die erhöhte funktionelle Aktivierung des SOCE in Vorhofmyozyten auf die erhöhten Expressionslevel der SOCE-Proteine zurückgeführt werden. Die Reduktion des SOCE durch die Applikation der verschiedenen Inhibitoren (S66, BTP-2 und SKF) war in Vorhofmyozyten stärker ausgeprägt als in Ventrikelmyozyten. Der größere Effekt der Inhibitoren könnte wie zuvor beschrieben auf das Vorkommen von Orai-TRPC-Komplexen in Vorhofmyozyten zurückgeführt werden, die bereits durch einen Orai- oder TRPC-Blocker vollständig blockiert werden könnten. Über die Expression und Funktion von SOCE-Kanälen im Vorhof ist bis heute wenig bekannt. In humanen Vorhofmyozyten wurde die Expression von TRPC1 in Kombination mit einem unselektiven Kationeneinstrom beschrieben, der dem SOCE zugeordnet werden konnte. TRPC1 interagiert in den Vorhofmyozyten mit STIM und Orai und der Kationeneinstrom konnte durch Lanthan blockiert werden (Y.-H. Zhang et al., 2013). Die Lokalisation von TRPC6 wurde im Vorhof der Maus im Sarkolemm und den (axialen) T-Tubuli beschrieben (Nikolova-Krstevski et al., 2017). Eine andere Untersuchung demonstrierte bereits die Expression der Orai-Isoformen 1 und 3 im linken Vorhof (Wolkowicz et al., 2011). Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen in Vorhofmyozyten der Ratte einen Ca-Einstrom nach intrazellulärer Speicherentleerung, der dem SOCE entspricht. Dieser war in den atrialen Myozyten größer als in Ventrikelmyozyten und ging dort ebenfalls mit erhöhten Expressionsleveln der SOCE-Proteine einher. Die Befunde deuten darauf hin, dass der SOCE in Vorhofmyozyten basal eine größere Bedeutung haben könnte.

## 4.7 Hemmung des SOCE in Kardiomyozyten zur Therapie der Herzhypertrophie?

Viele Untersuchungen im Herzen deuten darauf hin, dass der SOCE eine essentielle Rolle in der Hypertrophie und der Herzinsuffizienz einnimmt (Bartoli et al., 2020; Eder & Molkenin, 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der SOCE-vermittelte Ca-Einstrom ins Cytoplasma und in den Nucleus durch Blocker von SOCE-Kanälen deutlich reduziert werden kann. Es wurde bereits gezeigt, dass die Herzhypertrophie mit gesteigerten Expressionen von SOCE-Kanälen und einer erhöhten SOCE-Aktivität einhergeht (Gao et al., 2012; Luo et al., 2012). Die Überexpression von TRPC3 führt beispielsweise zu einer gesteigerten NFAT-Aktivität und begünstigt damit die Entstehung einer Herzhypertrophie. Der damit in Verbindung stehende SOCE kann durch die Applikation von SKF deutlich reduziert werden (Nakayama et al., 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass ein STIM-, Orai- oder TRPC-Genknockdown ebenfalls die Entstehung einer Herzhypertrophie verhindern kann (Luo et al., 2012; Ohba et al., 2009; Seth et al., 2009). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der SOCE ein potentielles Target zur Behandlung der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz darstellen kann. Dabei sind vor allem die spezifischen Orai-Blocker vielversprechende Kandidaten, da sie keine unerwünschten Wirkungen auf die Proteine der elektromechanischen Kopplung (z.B. LTCC) zu haben scheinen (Troupes et al., 2017). Dessen ungeachtet spielt der SOCE eine wichtige Rolle in elektrisch nicht-erregbaren Zellen, wie etwa Immunzellen (Shaw & Feske, 2013). Für eine klinische Anwendung muss daher die Wirkung der Orai-Blocker auf den gesamten Organismus betrachtet werden, da es durch die Hemmung von SOCE-Kanälen in anderen Organsystemen zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann. Es wurde bereits beschrieben, dass Fehlfunktionen von Orai und/oder STIM mit schwerwiegenden Krankheiten, wie einer allgemeinen Immunschwäche oder einer ausgeprägten Muskelschwäche einhergehen (Feske, 2010; Lacruz & Feske, 2015). Ein möglicher klinischer Einsatz der SOCE-Inhibitoren zur Behandlung der Herzhypertrophie wäre daher nur bei einer spezifischen Wirkung auf Kardiomyozyten gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde der SOCE quantitativ unter experimentellen Bedingungen betrachtet und analysiert. Eine Aussage über die physiologische Bedeutung des SOCE in adulten Kardiomyozyten kann daher nicht getroffen werden. Dennoch zeigt diese Arbeit, dass der SOCE – sofern aktiviert – zu einer Erhöhung des Ca im Zellkern führen kann und daher ein möglicher Regulator der Ca-abhängigen Gentranskription ist.

## 4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit charakterisierte den SOCE in adulten Ventrikel- und Vorhofmyozyten, wobei erstmals der Einfluss des SOCE auf das Kerncalcium betrachtet wurde. Es wurde gezeigt, dass neben den Proteinen der elektromechanischen Kopplung auch Proteine des speichergesteuerten Ca-Einstroms in Kardiomyozyten exprimiert werden (Abb. 4-3). Weiterhin wurde gezeigt, dass nach vollständiger intrazellulärer Entleerung der SR-Ca-Speicher mit Thapsigargin und Koffein und anschließender Erhöhung des extrazellulären Ca (2 mM) der SOCE in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten aktiviert werden kann (Abb. 4-3). Der SOCE-vermittelte Ca-Einstrom war in beiden Zelltypen im Cytoplasma und Nucleus detektierbar mit größeren SOCE-Amplituden in Vorhofmyozyten (Abb. 4-3, rechts). Durch den Ca-Einstrom könnten im Nucleus Signalwege aktiviert werden, die zu einem maladaptiven Remodeling beitragen (Abb. 4-3). Der Einsatz verschiedener pharmakologischer Inhibitoren (Gd, S66, BTP-2, SKF) reduzierte den SOCE deutlich, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die gemessene Ca-Erhöhung SOCE-vermittelt ist und durch Orai- und TRPC-Kanäle getragen wird. Dabei hatten die Orai-spezifischen Blocker in Ventrikelmyozyten keine Wirkung auf den elektrisch-stimulierten CaT. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass zur Aktivierung des SOCE in Ventrikelmyozyten T-Tubuli nicht benötigt werden. Die durchgeführte Detubulierung der Ventrikelmyozyten hatte keinen Einfluss auf die gemessene SOCE-Amplitude. Im frühen Stadium einer LV-Hypertrophie in den SHR scheint der Ca-Einstrom durch SOCE noch keine wesentliche Rolle zu spielen. Jedoch könnte mit dem Fortschreiten der Erkrankung der SOCE eine wichtige Rolle einnehmen und die beteiligten Proteine zu vielversprechende Targets in der Behandlung der Herzhypertrophie werden. Insgesamt zeigte die vorliegende Studie, dass der SOCE in adulten Ventrikel- und Vorhofmyozyten vorhanden ist. Darüber hinaus lieferte die Studie erstmals Beweise dafür, dass das nucleäre Ca durch die Aktivierung von SOCE-Kanälen direkt beeinflusst werden kann.



**Abbildung 4-3 Gesamtkonzept des speichergesteuerten Calcium-Einstroms in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten**

Die Hemmung der SERCA durch Thapsigargin und die Aktivierung der RyR durch Koffein bei gleichzeitiger Applikation einer Ca-freien Messlösung entleerten die intrazellulären Ca-Speicher; die Erhöhung der extrazellulären Ca-Konzentration löste den SOCE aus; einströmendes Ca gelangt über das Cytoplasma durch die Kernporen in den Nucleus. Im Nucleus könnte das Ca prohypertrophe Signalwege aktivieren und ein maladaptives Remodeling begünstigen.

## 5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Makroskopischer Aufbau und Blutfluss des Herzens.....	7
Abbildung 1-2 Mikroskopischer Aufbau einer Herzmuskelzelle .....	9
Abbildung 1-3 Elektromechanische Kopplung eines Ventrikelmyozyten .....	12
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der funktionalen STIM-Domänen .....	17
Abbildung 1-5 Schematische Darstellung von Orai.....	18
Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der Membrantopologie eines TRPC-Proteins .....	20
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung Ca-abhängiger prohypertropher Signalwege in Kardiomyozyten .....	28
Abbildung 1-8 Arbeitshypothese des SOCE in adulten Kardiomyozyten.....	33
Abbildung 2-1 Aufbau der Langendorff-Apparatur .....	37
Abbildung 2-2 Strukturformel Thapsigargin.....	45
Abbildung 2-3 Strukturformel Verapamil .....	46
Abbildung 2-4 Strukturformel KB-R7943.....	48
Abbildung 2-5 Strukturformel Koffein .....	49
Abbildung 2-6 Strukturformel Formamid .....	49
Abbildung 2-7 Strukturformel S66 .....	51
Abbildung 2-8 Strukturformel BTP-2 .....	52
Abbildung 2-9 Strukturformel SKF 96365 .....	53
Abbildung 2-10 Schematischer Aufbau eines Laser-Scanning-Konfokalmikroskops.....	56
Abbildung 2-11 Strukturformel Fluo-4-AM.....	58
Abbildung 2-12 Fluoreszenzspektrum von Fluo-4 .....	58
Abbildung 2-13 Strukturformel di-8-ANEPPS.....	59
Abbildung 2-14 Fluoreszenzspektrum von di-8-ANEPPS .....	59
Abbildung 2-15 Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 der Firma Zeiss.....	62
Abbildung 2-16 Auswertung der SOCE-Amplitude .....	64
Abbildung 2-17 BCA-Reaktion .....	68
Abbildung 2-18 Schematischer Aufbau eines Western Blots.....	72
Abbildung 3-1 Schematische Darstellung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms, der mutmaßlich beteiligten Proteine und der eingesetzten Pharmaka.....	77
Abbildung 3-2 Linescan-Modus.....	78
Abbildung 3-3 Experimentell genutztes Messprotokoll zur Auslösung und Quantifizierung des speichergesteuerten Calcium-Einstroms (SOCE) in Ventrikelmyozyten.....	80
Abbildung 3-4 SR-Ca-Beladung in Ca-freier Messlösung mit Thapsigargin ermittelt durch zweimalige Koffeingabe .....	82
Abbildung 3-5 Der SOCE im Cytoplasma und im Nucleus von Ventrikelmyozyten .....	85

---

Abbildung 3-6 Der SOCE im Cytoplasma und im Nucleus von SHR-Ventrikelmyozyten .....	87
Abbildung 3-7 Vergleich von CaT und vom SOCE in Ventrikelmyozyten aus WKY und SHR .....	89
Abbildung 3-8 Proteinexpression von TRPC1, 3, 4 und 6 sowie STIM1 in Ventrikelgewebe von WKY- und SHR-Herzen.....	90
Abbildung 3-9 Gadolinium hemmt den SOCE in Ventrikelmyozyten .....	92
Abbildung 3-10 Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle mit Einsatz der verschiedenen SOCE-Inhibitoren.....	93
Abbildung 3-11 Der SOCE wird in Ventrikelmyozyten durch die Zugabe von S66, BTP-2, SKF oder der Kombination von S66 mit SKF gehemmt.....	96
Abbildung 3-12 Reduktion der SOCE-Amplitude sowie der normierten SOCE-Amplitude durch S66, BTP-2, SKF oder eine Kombination aus S66 und SKF in Ventrikelmyozyten .....	97
Abbildung 3-13 Die Inkubation mit S66 oder BTP-2 hat in Ventrikelmyozyten keinen Effekt auf die cytoplasmatische oder die nucleäre CaT-Amplitude .....	98
Abbildung 3-14 Di-8-ANEPPS-Färbung von Ventrikelmyozyten.....	100
Abbildung 3-15 Der SOCE in detubulierten Ventrikelmyozyten .....	102
Abbildung 3-16 SR-Ca-Beladung atrialer Kardiomyozyten in Ca-freier Messlösung ermittelt durch Koffeingabe .....	104
Abbildung 3-17 Der SOCE in atrialen Kardiomyozyten.....	106
Abbildung 3-18 Vergleich von CaT- und SOCE-Amplituden in Vorhof- und Ventrikelmyozyten .....	108
Abbildung 3-19 Der SOCE in Vorhofmyozyten wird durch S66, BTP-2, SKF oder der Kombination aus S66 und SKF reduziert.....	109
Abbildung 3-20 Reduktion der atrialen SOCE-Amplitude sowie der normierten SOCE- Amplitude durch S66, BTP-2, SKF oder eine Kombination aus S66 und SKF .....	111
Abbildung 3-21 Effekt der Inkubation mit S66 oder BTP-2 auf die cytoplasmatische und die nucleäre CaT-Amplitude in Vorhofmyozyten.....	112
Abbildung 3-22 Unterschiedliche Proteinexpression von SOCE-Proteinen in Ventrikel- und Vorhofgewebe .....	114
Abbildung 4-1 Der speichergesteuerte Calcium-Einstrom in Ventrikelmyozyten .....	121
Abbildung 4-2 SOCE-Kanäle sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert.....	126
Abbildung 4-3 Gesamtkonzept des speichergesteuerten Calcium-Einstroms in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten.....	134

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Standard Tyrode-Lösung (1000 ml, pH 7,4).....	38
Tabelle 2-2 Lösungen für die Zellisolierung .....	39
Tabelle 2-3 Schema Vorhofadaptation.....	42
Tabelle 2-4 Messlösung (1000 ml, pH 7,4) .....	43
Tabelle 2-5 Ca-freie Messlösung (1000 ml, pH 7,4) .....	44
Tabelle 2-6 2 mM Ca-Messlösung .....	44
Tabelle 2-7 Thapsigargin-Stammlösung .....	46
Tabelle 2-8 Thapsigargin-Messlösung .....	46
Tabelle 2-9 Verapamil-Stammlösung.....	46
Tabelle 2-10 KB-R7943-Stammlösung .....	48
Tabelle 2-11 Koffeinlösung .....	49
Tabelle 2-12 Gd-Stammlösung .....	50
Tabelle 2-13 Gd-Messlösung .....	50
Tabelle 2-14 S66-Stammlösung.....	52
Tabelle 2-15 S66-Messlösung .....	52
Tabelle 2-16 BTP-2-Stammlösung.....	53
Tabelle 2-17 BTP-2- Messlösung.....	53
Tabelle 2-18 SKF-Stammlösung .....	54
Tabelle 2-19 SKF-Messlösung.....	54
Tabelle 2-20 Homogenisierungspuffer (Lysepuffer), 100 ml .....	67
Tabelle 2-21 Inhibitoren für den Homogenisierungspuffer, zugegeben zu 9,22 ml Homogenisierungspuffer .....	67
Tabelle 2-22 BSA-Standardkurve .....	69
Tabelle 2-23 4 x Lämmli Puffer, 20 ml .....	70
Tabelle 2-24 10 x Elektrophoresepuffer, 1000 ml .....	71
Tabelle 2-25 10 x Transferpuffer, 1000 ml .....	72
Tabelle 2-26 20 x TBS-Puffer (1000 ml, pH 7,5).....	73
Tabelle 2-27 Verwendete Primärantikörper .....	74
Tabelle 2-28 Verwendete Sekundärantikörper.....	74

## 7 Literaturverzeichnis

- Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Chen, X., & Levine, J. D. (2009). TRPC1 and TRPC6 Channels Cooperate with TRPV4 to Mediate Mechanical Hyperalgesia and Nociceptor Sensitization. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6217–6228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-09.2009>
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., & Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: Mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *Journal of Cell Science*, 113(10), 1651–1659. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.10.1651>
- Andersen, T., López, C., Manczak, T., Martinez, K., & Simonsen, H. (2015). Thapsigargin—From Thapsia L. to Mipsagargin. *Molecules*, 20(4), 6113–6127. <https://doi.org/10.3390/molecules20046113>
- Anderson, M. E., Brown, J. H., & Bers, D. M. (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.012>
- Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., & Reißig, D. (2020). *Aumüller Anatomie* (5., korrigierte Auflage). Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-007-170976>
- Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J. A., & Smani, T. (2018). The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Frontiers in Physiology*, 9, 257. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00257>
- Backs, J., & Olson, E. N. (2006). Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation. *Circulation Research*, 98(1), 15–24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f>
- Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S., & Olson, E. N. (2006). *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. 12.
- Bartoli, F., Bailey, M. A., Rode, B., Mateo, P., Antigny, F., Bedouet, K., Gerbaud, P., Gosain, R., Plante, J., Norman, K., Gomez, S., Lefebvre, F., Rucker-Martin, C., Ainscough, J. F. X., Kearney, M. T., Bruns, A.-F., Shi, J., Appleby, H. L., Young, R. S., ... Sabourin, J. (2020). Orai1 Channel Inhibition Preserves Left Ventricular Systolic Function and Normal Ca<sup>2+</sup> Handling After Pressure Overload. *Circulation*, 141(3), 199–216. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038891>
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bers, D. M. (2002). *Cardiac excitation–contraction coupling*. 415, 8.
- Bers, D. M. (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 23–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455>
- Bird, G. S., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., & Putney, J. W. (2008). Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*, 46(3), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.009>
- Bird, G. S., & Putney, J. W. (2017). Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels. In J. A. Kozak & J. W. Putney (Hrsg.), *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells* (1. Aufl., S. 311–324). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315152592-16>
- Bird, G. St. J., & Putney, J. W. (2005). Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells: Calcium entry and oscillations. *The Journal of Physiology*, 562(3), 697–706. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.077289>
- Bisping, E., Wakula, P., Poteser, M., & Heinzl, F. R. (2014). Targeting Cardiac Hypertrophy: Toward a Causal Heart Failure Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 64(4), 293–305. <https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000126>

- Blatter, L. A., Kockskämper, J., Sheehan, K. A., Zima, A. V., Hüser, J., & Lipsius, S. L. (2003). Local calcium gradients during excitation–contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 546(1), 19–31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.025239>
- Bootman, M. D., Fearnley, C., Smyrniak, I., MacDonald, F., & Roderick, H. L. (2009). An update on nuclear calcium signalling. *Journal of Cell Science*, 122(14), 2337–2350. <https://doi.org/10.1242/jcs.028100>
- Bootman, M. D., Higazi, D. R., Coombes, S., & Roderick, H. L. (2006). Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *Journal of Cell Science*, 119(19), 3915–3925. <https://doi.org/10.1242/jcs.03223>
- Bootman, M. D., & Rietdorf, K. (2017). Tissue Specificity: Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Cardiac Myocytes. In K. Groschner, W. F. Graier, & C. Romanin (Hrsg.), *Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) Pathways* (Bd. 993, S. 363–387). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_19)
- Bootman, M. D., Smyrniak, I., Thul, R., Coombes, S., & Roderick, H. L. (2011). Atrial cardiomyocyte calcium signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 922–934. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.030>
- Brandenburg, S., Arakel, E. C., Schwappach, B., & Lehnart, S. E. (2016). The molecular and functional identities of atrial cardiomyocytes in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(7), 1882–1893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.025>
- Brandenburg, S., Kohl, T., Williams, G. S. B., Gusev, K., Wagner, E., Rog-Zielinska, E. A., Hebisch, E., Dura, M., Didié, M., Gotthardt, M., Nikolaev, V. O., Hasenfuss, G., Kohl, P., Ward, C. W., Lederer, W. J., & Lehnart, S. E. (2016). Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria. *Journal of Clinical Investigation*, 126(10), 3999–4015. <https://doi.org/10.1172/JCI88241>
- Brandes, R., Lang, F., & Schmidt, R. F. (Hrsg.). (2019). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4>
- Brette, F., Komukai, K., & Orchard, C. H. (2002). Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(4), H1720–H1728. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00347.2002>
- Brette, F., Sallé, L., & Orchard, C. H. (2004). Differential Modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> Current by SR Ca<sup>2+</sup> Release at the T-Tubules and Surface Membrane of Rat Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 95(1). <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000135547.53927.F6>
- Brette, F., Sallé, L., & Orchard, C. H. (2006). Quantification of Calcium Entry at the T-Tubules and Surface Membrane in Rat Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 90(1), 381–389. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069013>
- Brodde, O.-E., Bruck, H., & Leineweber, K. (2006). Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), 323–337. <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ06001X>
- Brooksby, P., Levi, A. J., & Jones, J. V. (1993). Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular Research*, 27(7), 1268–1277. <https://doi.org/10.1093/cvr/27.7.1268>
- Bush, E. W., Hood, D. B., Papst, P. J., Chappo, J. A., Minobe, W., Bristow, M. R., Olson, E. N., & McKinsey, T. A. (2006). Canonical Transient Receptor Potential Channels Promote Cardiomyocyte Hypertrophy through Activation of Calcineurin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33487–33496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605536200>
- Camacho Londoño, J. E., Tian, Q., Hammer, K., Schröder, L., Camacho Londoño, J., Reil, J. C., He, T., Oberhofer, M., Mannebach, S., Mathar, I., Philipp, S. E., Tabellion, W., Schweda, F., Dietrich, A., Kaestner, L., Laufs, U., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Freichel, M., & Lipp, P. (2015). A background Ca<sup>2+</sup> entry pathway mediated by

- TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *European Heart Journal*, 36(33), 2257–2266. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv250>
- Capelson, M., Doucet, C., & Hetzer, M. W. (2010). Nuclear Pore Complexes: Guardians of the Nuclear Genome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75(0), 585–597. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.059>
- Chapman, R. A., & Tunstall, J. (1987). The calcium paradox of the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 50(2), 67–96. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(87\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0079-6107(87)90004-6)
- Chen-Izu, Y., Chen, L., Bányász, T., McCulle, S. L., Norton, B., Scharf, S. M., Agarwal, A., Patwardhan, A., Izu, L. T., & Balke, C. W. (2007). Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(6), H3301–H3310. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00259.2007>
- Christensen, S. B., Andersen, A., & Smitt, U. W. (1997). Sesquiterpenoids from *Thapsia* Species and Medicinal Chemistry of the Thapsigargin. In W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, & Ch. Tamm (Hrsg.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Bd. 71, S. 129–167). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6529-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6529-4_2)
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>
- Collins, H. E., Zhu-Mauldin, X., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2013). STIM1/Orai1-mediated SOCE: Current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(4), H446–H458. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00104.2013>
- Correll, R. N., Goonasekera, S. A., van Berlo, J. H., Burr, A. R., Accornero, F., Zhang, H., Makarewich, C. A., York, A. J., Sargent, M. A., Chen, X., Houser, S. R., & Molkenin, J. D. (2015). STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca<sup>2+</sup> handling and cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.032>
- Delcarpio, J. B., Claycomb, W. C., & Moses, R. L. (1989). Ultrastructural morphometric analysis of cultured neonatal and adult rat ventricular cardiac muscle cells. *American Journal of Anatomy*, 186(4), 335–345. <https://doi.org/10.1002/aja.1001860403>
- Dewenter, M., von der Lieth, A., Katus, H. A., & Backs, J. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 121(8), 1000–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310355>
- Di Sabatino, A., Rovedatti, L., Kaur, R., Spencer, J. P., Brown, J. T., Morisset, V. D., Biancheri, P., Leakey, N. A. B., Wilde, J. I., Scott, L., Corazza, G. R., Lee, K., Sengupta, N., Knowles, C. H., Gunthorpe, M. J., McLean, P. G., MacDonald, T. T., & Kruidenier, L. (2009). Targeting Gut T Cell Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels Inhibits T Cell Cytokine Production and T-Box Transcription Factor T-Bet in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3454–3462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802887>
- Doggrell, S., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, 39(1), 89–105. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00076-5)
- Doleschal, B., Primessnig, U., Wolkart, G., Wolf, S., Schernthaner, M., Lichtenegger, M., Glasnov, T. N., Kappe, C. O., Mayer, B., Antoons, G., Heinzl, F., Poteser, M., & Groschner, K. (2015). TRPC3 contributes to regulation of cardiac contractility and arrhythmogenesis by dynamic interaction with NCX1. *Cardiovascular Research*, 106(1), 163–173. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv022>
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., & Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. 392, 4.
- Domeier, T. L., Zima, A. V., Maxwell, J. T., Huke, S., Mignery, G. A., & Blatter, L. A. (2008). IP<sub>3</sub> receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), H596–H604. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01155.2007>

- Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J.-P., & Gómez, A. M. (2012). The other side of cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling: Transcriptional control. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00452>
- Echevarría, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., & Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology*, 5(5), 440–446. <https://doi.org/10.1038/ncb980>
- Eder, P., & Molkentin, J. D. (2011). TRPC Channels As Effectors of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 108(2), 265–272. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225888>
- Elliott, A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1). <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of Physiology*, 249(3), 469–495. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011026>
- Fauconnier, J., Lanner, J., Sultan, A., Zhang, S., Katz, A., Bruton, J., & Westerblad, H. (2007). Insulin potentiates TRPC3-mediated cation currents in normal but not in insulin-resistant mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 73(2), 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.018>
- Fawcett, D. W., & McNutt, N. S. (1969). THE ULTRASTRUCTURE OF THE CAT MYOCARDIUM. *Journal of Cell Biology*, 42(1), 1–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.1.1>
- Fearnley, C. J., Roderick, H. L., & Bootman, M. D. (2011). Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a004242–a004242. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004242>
- Feske, S. (2010). CRAC channelopathies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(2), 417–435. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0777-5>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Freichel, M., Berlin, M., Schürger, A., Mathar, I., Bacmeister, L., Medert, R., Frede, W., Marx, A., Segin, S., & Londoño, J. E. C. (2017). TRP Channels in the Heart. In T. L. R. Emir (Hrsg.), *Neurobiology of TRP Channels* (1. Aufl., S. 149–185). CRC Press. <https://doi.org/10.4324/9781315152837-9>
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., & Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart: Regional ion channel subunit gene expression in the human heart. *The Journal of Physiology*, 582(2), 675–693. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126714>
- Gao, H., Wang, F., Wang, W., Makarewich, C. A., Zhang, H., Kubo, H., Berretta, R. M., Barr, L. A., Molkentin, J. D., & Houser, S. R. (2012). Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels and transient receptor potential channels activates pathological hypertrophy signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 53(5), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.08.005>
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W.-N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>
- Genka, C., Ishida, H., Ichimori, K., Hirota, Y., Tanaami, T., & Nakazawa, H. (1999). Visualization of biphasic Ca<sup>2+</sup>-diffusion from cytosol to nucleus in contracting adult rat cardiac myocytes with an ultra-fast confocal imaging system. *Cell Calcium*, 25(3), 199–208. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0026>
- Gensburger, C., Freyermuth, S., Klein, C., & Malviya, A. N. (2003). In vivo nuclear Ca<sup>2+</sup>-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(4), 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00500-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00500-X)
- Goel, M., Zuo, C.-D., Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2007). TRPC3 channels colocalize with Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and Na<sup>+</sup> pump in axial component of transverse-axial

- tubular system of rat ventricle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), H874–H883. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00785.2006>
- Hänsel, R., & Sticher, O. (2010). *Pharmakognosie—Phytopharmazie* (9., überarb. und aktualisierte Aufl). Springer Medizin Verlag.
- He, L.-P., Hewavitharana, T., Soboloff, J., Spassova, M. A., & Gill, D. L. (2005). A Functional Link between Store-operated and TRPC Channels Revealed by the 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazole Derivative, BTP2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 10997–11006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411797200>
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), 589–600. <https://doi.org/10.1038/nrm1983>
- Heinzel, F. R., Bito, V., Biesmans, L., Wu, M., Detre, E., von Wegner, F., Claus, P., Dymarkowski, S., Maes, F., Bogaert, J., Rademakers, F., D'hooge, J., & Sipido, K. (2008). Remodeling of T-Tubules and Reduced Synchrony of Ca<sup>2+</sup> Release in Myocytes From Chronically Ischemic Myocardium. *Circulation Research*, 102(3), 338–346. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160085>
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., & Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.102596199>
- Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.110>
- Hohendanner, F., Maxwell, J. T., & Blatter, L. A. (2015). Cytosolic and nuclear calcium signaling in atrial myocytes: IP<sub>3</sub>-mediated calcium release and the role of mitochondria. *Channels*, 9(3), 129–138. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1040966>
- Hohendanner, F., McCulloch, A. D., Blatter, L. A., & Michailova, A. P. (2014). Calcium and IP<sub>3</sub> dynamics in cardiac myocytes: Experimental and computational perspectives and approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00035>
- Hoth, M., & Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of Physiology*, 465(1), 359–386. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019681>
- Huang, H., Wang, W., Liu, P., Jiang, Y., Zhao, Y., Wei, H., & Niu, W. (2009). *TRPC1 expression and distribution in rat hearts*. 8.
- Hulot, J.-S., Fauconnier, J., Ramanujam, D., Chaanine, A., Aubart, F., Sassi, Y., Merkle, S., Cazorla, O., Ouillé, A., Dupuis, M., Hadri, L., Jeong, D., Mühlstedt, S., Schmitt, J., Braun, A., Bénard, L., Saliba, Y., Lagerbauer, B., Nieswandt, B., ... Engelhardt, S. (2011). Critical Role for Stromal Interaction Molecule 1 in Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 124(7), 796–805. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.031229>
- Hunton, D. L., Lucchesi, P. A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L. J., & Marchase, R. B. (2002). Capacitative Calcium Entry Contributes to Nuclear Factor of Activated T-cells Nuclear Translocation and Hypertrophy in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14266–14273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107167200>
- Hunton, D. L., Zou, L., Pang, Y., & Marchase, R. B. (2004). Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(3), H1124–H1132. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00162.2003>
- Hüser, J., Lipsius, S. L., & Blatter, L. A. (1996). Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *The Journal of Physiology*, 494(3), 641–651. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021521>
- Hutchings, D. C., Madders, G. W. P., Niort, B. C., Bode, E. F., Waddell, C. A., Woods, L. S., Dibb, K. M., Eisner, D. A., & Trafford, A. W. (2022). Interaction of background Ca<sup>2+</sup> influx, sarcoplasmic reticulum threshold and heart failure in determining propensity for

- Ca<sup>2+</sup> waves in sheep heart. *The Journal of Physiology*, 600(11), 2637–2650. <https://doi.org/10.1113/JP282168>
- Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T., Takezawa, R., Ichikawa, A., Kubota, H., & Yamada, T. (2003). A Pyrazole Derivative, YM-58483, Potently Inhibits Store-Operated Sustained Ca<sup>2+</sup> Influx and IL-2 Production in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 170(9), 4441–4449. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4441>
- Iwamoto, T., Watano, T., & Shigekawa, M. (1996). A Novel Isothiourea Derivative Selectively Inhibits the Reverse Mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange in Cells Expressing NCX1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22391–22397. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22391>
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M., & Carafoli, E. (1989). Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 342(6245), 90–92. <https://doi.org/10.1038/342090a0>
- Jaskulska, A., Janecka, A. E., & Gach-Janczak, K. (2020). Thapsigargin—From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 4. <https://doi.org/10.3390/ijms22010004>
- Jayasinghe, I. D., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2009). Organization of Ryanodine Receptors, Transverse Tubules, and Sodium-Calcium Exchanger in Rat Myocytes. *Biophysical Journal*, 97(10), 2664–2673. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.036>
- Jiang, Y., Huang, H., Liu, P., Wei, H., Zhao, H., Feng, Y., Wang, W., & Niu, W. (2014). Expression and localization of TRPC proteins in rat ventricular myocytes at various developmental stages. *Cell and Tissue Research*, 355(1), 201–212. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1733-4>
- Johnson, I., & Spence, M. (2010). *The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* (11th ed). Live Technologies Corporation.
- Kawai, M., Hussain, M., & Orchard, C. H. (1999). Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(2), H603–H609. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.2.H603>
- Kiess, T.-O., & Kockskämper, J. (2019). SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10, 56. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00056>
- Kockskämper, J. (2016). Excitation–Contraction Coupling of Cardiomyocytes. In K.-D. Schlüter (Hrsg.), *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease* (S. 67–96). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31251-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31251-4_3)
- Kockskämper, J., Seidlmayer, L., Walther, S., Hellenkamp, K., Maier, L. S., & Pieske, B. (2008). 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. *Journal of Cell Science*, 121(2), 186–195. <https://doi.org/10.1242/jcs.021386>
- Kockskämper, J., Sheehan, K. A., Bare, D. J., Lipsius, S. L., Mignery, G. A., & Blatter, L. A. (2001). Activation and Propagation of Ca<sup>2+</sup> Release during Excitation-Contraction Coupling in Atrial Myocytes. *Biophysical Journal*, 81(5), 2590–2605. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75903-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75903-6)
- Kockskämper, J., Zima, A. V., Roderick, H. L., Pieske, B., Blatter, L. A., & Bootman, M. D. (2008). Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(2), 128–147. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.014>
- Kojima, A., Kitagawa, H., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., & Nosaka, S. (2010). Ca<sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes: Ca<sup>2+</sup> paradox mediated through TRPC channels. *British Journal of Pharmacology*, 161(8), 1734–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00986.x>
- Kojima, A., Kitagawa, H., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., & Nosaka, S. (2012). Presence of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *British Journal of Anaesthesia*, 109(3), 352–360. <https://doi.org/10.1093/bja/aes212>

- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. W. (2008). Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, 414(3), 441–452. <https://doi.org/10.1042/BJ20080489>
- Kurien, B., & Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Kurreck, J., Engels, J. W., & Lottspeich, F. (Hrsg.). (2022). *Bioanalytik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61707-6>
- Kawahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3114–3126. <https://doi.org/10.1172/JCI27702>
- Lacruz, R. S., & Feske, S. (2015). Diseases caused by mutations in *ORAI1* and *STIM1*: Mutations in *ORAI1* and *STIM1*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356(1), 45–79. <https://doi.org/10.1111/nyas.12938>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Ledeer, R. W., & Wu, G. (2007). Sodium-Calcium Exchangers in the Nucleus: An Unexpected Locus and an Unusual Regulatory Mechanism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099(1), 494–506. <https://doi.org/10.1196/annals.1387.057>
- Lee, M. A., Dunn, R. C., Clapham, D. E., & Stehno-Bittel, L. (1998). Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium*, 23(2–3), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(98\)90107-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(98)90107-5)
- Lee, S.-H., Hadipour-Lakmehsari, S., Miyake, T., & Gramolini, A. O. (2018). Three-dimensional imaging reveals endo(sarco)plasmic reticulum-containing invaginations within the nucleoplasm of muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(3), C257–C267. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2017>
- Lemonnier, L., Trebak, M., & Jr, J. W. P. (2009). *Complex Regulation of the TRPC3,6,7 Channel Subfamily by Diacylglycerol and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. 16.
- Li, J., McKeown, L., Ojelabi, O., Stacey, M., Foster, R., O'Regan, D., Porter, K. E., & Beech, D. J. (2011). Nanomolar potency and selectivity of a Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor against store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and migration of vascular smooth muscle cells: Vascular Orai1 and CRAC inhibition. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 382–393. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01368.x>
- Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L., & Birnbaumer, L. (2008). Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2895–2900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712288105>
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., & Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9301–9306. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702866104>
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store-Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Current Biology*, 15(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Lipp, P., Laine, M., Tovey, S. C., Burrell, K. M., Berridge, M. J., Li, W., & Bootman, M. D. (2000). Functional InsP3 receptors that may modulate excitation–contraction coupling in the heart. *Current Biology*, 10(15), 939–S1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00624-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00624-2)
- Ljubojevic, S., & Bers, D. M. (2015). Nuclear Calcium in Cardiac Myocytes: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3), 211–217. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000174>
- Ljubojevic, S., Radulovic, S., Leitinger, G., Sedej, S., Sacherer, M., Holzer, M., Winkler, C., Pritz, E., Mittler, T., Schmidt, A., Sereinig, M., Wakula, P., Zissimopoulos, S., Bisping, E., Post, H., Marsche, G., Bossuyt, J., Bers, D. M., Kocksämper, 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>
- Ljubojević, S., Walther, S., Asgarzoei, M., Sedej, S., Pieske, B., & Kockskämper, J. (2011). In Situ Calibration of Nucleoplasmic versus Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Concentration in Adult Cardiomyocytes. *Biophysical Journal*, 100(10), 2356–2366. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.060>
- Louch, W. E., Sheehan, K. A., & Wolska, B. M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(3), 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.06.012>
- Luo, X., Hojaye, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Tandan, S., Rakalin, A., Rothermel, B. A., Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.11.003>
- Lyon, A. R., MacLeod, K. T., Zhang, Y., Garcia, E., Kanda, G. K., Lab, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E., & Gorelik, J. (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6854–6859. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809777106>
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(8), 919–939. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2038>
- Makarewich, C. A., Zhang, H., Davis, J., Correll, R. N., Trappanese, D. M., Hoffman, N. E., Troupes, C. D., Kubo, H., Madesh, M., Chen, X., Gao, E., & Houser, S. R. (2015). *Transient Receptor Potential Channels Contribute to Pathological Structural and Functional Remodeling After Myocardial Infarction*. 29.
- Marius, P., Guerra, M. T., Nathanson, M. H., Ehrlich, B. E., & Leite, M. F. (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.09.010>
- Mattiazzi, A., Bassani, R. A., Escobar, A. L., Palomeque, J., Valverde, C. A., Vila Petroff, M., & Bers, D. M. (2015). Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 308(10), H1177–H1191. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00007.2015>
- McMullen, J. R., & Jennings, G. L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(4), 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04585.x>
- Melrose, D. G., Dreyer, B., Bentall, H. H., & Baker, J. B. (1955). Elective cardiac arrest. *Lancet (London, England)*, 269(6879), 21–22. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(55\)93381-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(55)93381-x)
- Merritt, J. E., Armstrong, W. P., Benham, C. D., Hallam, T. J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B. K., McCarthy, S. A., Moores, K. E., & Rink, T. J. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochemical Journal*, 271(2), 515–522. <https://doi.org/10.1042/bj2710515>
- Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope: Memoir on Inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4), 128–138. <https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>
- Minta, A., Kao, J. P. Y., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8171–8178. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83165-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83165-9)
- Mitcheson, J., Hancox, J. C., & Levi, A. J. (1998). Cultured adult cardiac myocytes Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Research*, 39(2), 280–300. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00128-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00128-X)
- Mohl, M. C., Iismaa, S. E., Xiao, X.-H., Friedrich, O., Wagner, S., Nikolova-Krstevski, V., Wu, J., Yu, Z.-Y., Feneley, M., Fatkin, D., Allen, D. G., & Graham, R. M. (2011). Regulation

- of murine cardiac contractility by activation of  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Cardiovascular Research*, 91(2), 310–319. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr081>
- Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin and Beyond: Cardiac Hypertrophic Signaling. *Circulation Research*, 87(9), 731–738. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.9.731>
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*, 63(3), 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.021>
- Molkentin, J. D., Lu, J.-R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., & Olson, E. N. (1998). A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*, 93(2), 215–228. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81573-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81573-1)
- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)
- Moravec, C. S., Reynolds, E. E., Stewart, R. W., & Bond, M. (1989). Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in, vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), 14–18. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92397-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92397-8)
- Moravec, C. S., Schluchter, M. D., Paranandi, L., Czerska, B., Stewart, R. W., Rosenkranz, E., & Bond, M. (1990). Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation*, 82(6), 1973–1984. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.6.1973>
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., & Romanin, C. (2009). A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8421–8426. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800229200>
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K., & Romanin, C. (2008). Dynamic Coupling of the Putative Coiled-coil Domain of ORAI1 with STIM1 Mediates ORAI1 Channel Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 8014–8022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708898200>
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Menzel, S., & Ruth, P. (2013). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie* (10., vollst. überarb. und erw. Aufl.). Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I., & Molkentin, J. D. (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *The FASEB Journal*, 20(10), 1660–1670. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5560com>
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews*, 85(4), 1205–1253. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>
- Ng, S. W., di Capite, J., Singaravelu, K., & Parekh, A. B. (2008). Sustained Activation of the Tyrosine Kinase Syk by Antigen in Mast Cells Requires Local  $\text{Ca}^{2+}$  Influx through  $\text{Ca}^{2+}$  Release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31348–31355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804942200>
- Nikolova-Krstevski, V., Wagner, S., Yu, Z. Y., Cox, C. D., Cvetkovska, J., Hill, A. P., Huttner, I. G., Benson, V., Werdich, A. A., MacRae, C., Feneley, M. P., Friedrich, O., Martinac, B., & Fatkin, D. (2017). Endocardial TRPC-6 Channels Act as Atrial Mechanosensors and Load-Dependent Modulators of Endocardial/Myocardial Cross-Talk. *JACC: Basic to Translational Science*, 2(5), 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.05.006>
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Sato, T., Ono, K., & Ito, H. (2009). Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.117>
- Olivares-Florez, S., Czolbe, M., Riediger, F., Seidlmayer, L., Williams, T., Nordbeck, P., Strasen, J., Glocker, C., Jänsch, M., Eder-Negrin, P., Arias-Loza, P., Mühlfelder, M., Plačkić, J., Heinze, K. G., Molkentin, J. D., Engelhardt, S., Kockskämper, J., & Ritter, O. (2018). Nuclear calcineurin is a sensor for detecting  $\text{Ca}^{2+}$  release from the nuclear

- envelope via IP3R. *Journal of Molecular Medicine*, 96(11), 1239–1249. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1701-2>
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*, 25(22), 5305–5316. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601417>
- Orchard, C. H., Pasek, M., & Brette, F. (2009). The role of mammalian cardiac t-tubules in excitation–contraction coupling: Experimental and computational approaches. *Exp Physiol*, 11.
- Paddock, S. W. (1999). *Confocal Laser Scanning Microscopy*. 27(5), 10.
- Pang, Y., Bounelis, P., Chatham, J. C., & Marchase, R. B. (2004). Hexosamine Pathway Is Responsible for Inhibition by Diabetes of Phenylephrine-Induced Inotropy. *Diabetes*, 53(4), 1074–1081. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1074>
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.025>
- Parekh, A. B., & Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews*, 77(4), 901–930. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.901>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R., & Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 1395–1406. <https://doi.org/10.1172/JCI8551>
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218), 116–120. <https://doi.org/10.1038/nature07338>
- Plačkić, J., & Kockskämper, J. (2018). Isolation of Atrial and Ventricular Cardiomyocytes for In Vitro Studies. In K. Ishikawa (Hrsg.), *Experimental Models of Cardiovascular Diseases* (Bd. 1816, S. 39–54). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_3)
- Plačkić, J., Preissl, S., Nikonova, Y., Pluteanu, F., Hein, L., & Kockskämper, J. (2016). Enhanced nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.11.001>
- Prakriya, M. (2009). The molecular physiology of CRAC channels. *Immunological Reviews*, 231(1), 88–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00820.x>
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2002). Separation and Characterization of Currents through Store-operated CRAC Channels and Mg<sup>2+</sup>-inhibited Cation (MIC) Channels. *The Journal of General Physiology*, 119(5), 487–508. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028551>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 95(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Putney, J. W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 11(10), 611–624. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(90\)90016-N](https://doi.org/10.1016/0143-4160(90)90016-N)
- Putney, J. W. (2014). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci*, 8.

- Putney, J. W., & McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *BioEssays*, 21(1), 38–46. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199901\)21:1<38::AID-BIES5>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<38::AID-BIES5>3.0.CO;2-S)
- Reeves, J. P., & Hale, C. C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12), 7733–7739. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42854-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42854-7)
- Robinson, P. J., & Rhodes, D. (2006). Structure of the '30nm' chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.007>
- Roderick, H. L., Higazi, D. R., Smyrniak, I., Fearnley, C., Harzheim, D., & Bootman, M. D. (2007). Calcium in the heart: When it's good, it's very very good, but when it's bad, it's horrid. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 957–961. <https://doi.org/10.1042/BST0350957>
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Rosenberg, P., Zhang, H., Bryson, V. G., & Wang, C. (2021). SOCE in the cardiomyocyte: The secret is in the chambers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 473(3), 417–434. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02540-3>
- Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A. M., & Benitah, J.-P. (2016a). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 291(25), 13394–13409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693911>
- Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A. M., & Benitah, J.-P. (2016b). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 291(25), 13394–13409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693911>
- Sabourin, J., Robin, E., & Raddatz, E. (2011). A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovascular Research*, 92(2), 226–236. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr167>
- Sagara, Y., & Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(21), 13503–13506. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92726-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92726-2)
- Salas, M. A., Vila-Petroff, M. G., Palomeque, J., Aiello, E. A., & Mattiazzi, A. (2001). Positive Inotropic and Negative Lusitropic Effect of Angiotensin II: Intracellular Mechanisms and Second Messengers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(11), 1957–1971. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1460>
- Saliba, Y., Keck, M., Marchand, A., Atassi, F., Ouillé, A., Cazorla, O., Trebak, M., Pavoine, C., Lacampagne, A., Hulot, J.-S., Farès, N., Fauconnier, J., & Lompré, A.-M. (2015). Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 105(3), 248–259. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu207>
- Satoh, H., Delbridge, L. M., Blatter, L. A., & Bers, D. M. (1996). Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: Species-dependence and developmental effects. *Biophysical Journal*, 70(3), 1494–1504. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79711-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79711-4)
- Satoh, H., Ginsburg, K. S., Qing, K., Terada, H., Hayashi, H., & Bers, D. M. (2000). KB-R7943 Block of Ca<sup>2+</sup> Influx Via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange Does Not Alter Twitches or Glycoside Inotropy but Prevents Ca<sup>2+</sup> Overload in Rat Ventricular Myocytes. *Circulation*, 101(12), 1441–1446. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.12.1441>
- Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I., Glasnov, T., Kappe, C., Romanin, C., & Groschner, K. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry pathways. *British Journal of Pharmacology*, 167(8), 1712–1722. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x>

- Scriven, D. R. L., Asghari, P., & Moore, E. D. W. (2013). Microarchitecture of the dyad. *Cardiovascular Research*, 98(2), 169–176. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt025>
- Scriven, D. R. L., Dan, P., & Moore, E. D. W. (2000). Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 79(5), 2682–2691. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76506-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76506-4)
- Seth, M., Zhang, Z.-S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., Tsiokas, L., Winn, M., Abramowitz, J., Rockman, H. A., Birnbaumer, L., & Rosenberg, P. (2009). TRPC1 Channels Are Critical for Hypertrophic Signaling in the Heart. *Circulation Research*, 105(10), 1023–1030. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206581>
- Shaw, P. J., & Feske, S. (2013). Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. *Front Biosci*, 24.
- Silverthorn, D. U. (2009). *Physiologie* (C. Biele, M. Niehaus, J. Wissmann, & U. Loos, Übers.; 4., aktualisierte Aufl). Pearson Education.
- Singh, A., Hildebrand, M., Garcia, E., & Snutch, T. (2010). The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels: SKF96365 block of T-type calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1464–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00786.x>
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelağ, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smyrnias, I., Mair, W., Harzheim, D., Walker, S. A., Roderick, H. L., & Bootman, M. D. (2010). Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation–contraction coupling and inotropic stimulation. *Cell Calcium*, 47(3), 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.10.001>
- Smyth, J. T., Hwang, S.-Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C., & Putney, J. W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), 2337–2349. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01168.x>
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., & Gill, D. L. (2006). Orai1 and STIM Reconstitute Store-operated Calcium Channel Function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20661–20665. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600126200>
- Soeller, C., & Cannell, M. B. (1999). Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image–Processing Techniques. *Circulation Research*, 84(3), 266–275. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.3.266>
- Stathopoulos, P. B., & Ikura, M. (2017). Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms. *Cell Calcium*, 63, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.11.005>
- Stathopoulos, P. B., Li, G.-Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., & Ikura, M. (2006). Stored Ca<sup>2+</sup> Depletion-induced Oligomerization of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM Region. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35855–35862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608247200>
- Stathopoulos, P. B., Zheng, L., Li, G.-Y., Plevin, M. J., & Ikura, M. (2008). Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry. *Cell*, 135(1), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.006>
- Sweeney, Z. K., Minatti, A., Button, D. C., & Patrick, S. (2009). Small-Molecule Inhibitors of Store-Operated Calcium Entry. *ChemMedChem*, 4(5), 706–718. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800452>
- Talcott, B., & Moore, M. S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. *Trends in Cell Biology*, 9(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(99\)01608-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(99)01608-6)

- Tian, C., Du, L., Zhou, Y., & Li, M. (2016). Store-operated CRAC channel inhibitors: Opportunities and challenges. *Future Medicinal Chemistry*, 8(7), 817–832. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0024>
- Tojyo, Y., Morita, T., Nezu, A., & Tanimura, A. (2014). Key Components of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Non-Excitable Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 125(4), 340–346. <https://doi.org/10.1254/jphs.14R06CP>
- Touchberry, C. D., Elmore, C. J., Nguyen, T. M., Andresen, J. J., Zhao, X., Orange, M., Weisleder, N., Brotto, M., Claycomb, W. C., & Wacker, M. J. (2011). Store-operated calcium entry is present in HL-1 cardiomyocytes and contributes to resting calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(1–2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.133>
- Troupes, C. D., Wallner, M., Borghetti, G., Zhang, C., Mohsin, S., von Lewinski, D., Berretta, R. M., Kubo, H., Chen, X., Soboloff, J., & Houser, S. (2017). Role of STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) in Hypertrophy-Related Contractile Dysfunction. *Circulation Research*, 121(2), 125–136. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311094>
- Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I., Nishi, M., & Takeshima, H. (2002). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*, 31(2), 89–96. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0257>
- van Breemen, C., Farinas, B. R., Gerba, P., & Mcnaughton, E. D. (1972). Excitation-Contraction Coupling in Rabbit Aorta Studied by the Lanthanum Method for Measuring Cellular Calcium Influx. *Circulation Research*, 30(1), 44–54. <https://doi.org/10.1161/01.RES.30.1.44>
- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., & Birnbaumer, L. (1999). Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2060–2064. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2060>
- Vega, R. B., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2003). Control of Cardiac Growth and Function by Calcineurin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 36981–36984. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300023200>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Verdin, E., Dequiedt, F., & Kasler, H. G. (2003). Class II histone deacetylases: Versatile regulators. *Trends in Genetics*, 19(5), 286–293. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00073-8)
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J.-P., & Penner, R. (2006). CRACM1 Multimers Form the Ion-Selective Pore of the CRAC Channel. *Current Biology*, 16(20), 2073–2079. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.085>
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., & Kinet, J.-P. (2006). CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Science*, 312(5777), 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>
- Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., Frank, D., Dolatabadi, N., Frey, N., Gude, N., Friedrich, O., Koch, W. J., Katus, H. A., Sussman, M. A., & Most, P. (2010). Orai1 and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6), 1329–1334. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.01.020>
- Walden, A. P., Dibb, K. M., & Trafford, A. W. (2009). Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(4), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.11.003>
- Ward, M.-L., Williams, I. A., Chu, Y., Cooper, P. J., Ju, Y.-K., & Allen, D. G. (2008). Stretch-activated channels in the heart: Contributions to length-dependence and to cardiomyopathy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 97(2–3), 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.009>

- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., & Ito, H. (2008). TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 118(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.03.008>
- Wen, H., Zhao, Z., Fefelova, N., & Xie, L.-H. (2018). Potential Arrhythmogenic Role of TRPC Channels and Store-Operated Calcium Entry Mechanism in Mouse Ventricular Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 9, 12.
- Wolkowicz, P. E., Huang, J., Umeda, P. K., Sharifov, O. F., Tabengwa, E., Halloran, B. A., Urthaler, F., & Grenett, H. E. (2011). Pharmacological evidence for Orai channel activation as a source of cardiac abnormal automaticity. *European Journal of Pharmacology*, 668(1–2), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.025>
- Worley, P. F., Zeng, W., Huang, G. N., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Lee, M. G., & Muallem, S. (2007). TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium*, 42(2), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.03.004>
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., & Lewis, R. S. (2006). Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 174(6), 803–813. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604014>
- Wu, M. M., Covington, E. D., & Lewis, R. S. (2014). Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions. *Molecular Biology of the Cell*, 25(22), 3672–3685. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-06-1107>
- Wu, X., & Bers, D. M. (2006). Sarcoplasmic Reticulum and Nuclear Envelope Are One Highly Interconnected Ca<sup>2+</sup> Store Throughout Cardiac Myocyte. *Circulation Research*, 99(3), 283–291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000233386.02708.72>
- Wu, X., Eder, P., Chang, B., & Molkentin, J. D. (2010). TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7000–7005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001825107>
- Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T. A., Dedman, J. R., Olson, E. N., Chen, J., Brown, J. H., & Bers, D. M. (2006). Local InsP<sub>3</sub>-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 675–682. <https://doi.org/10.1172/JCI27374>
- You, J., Wu, J., Zhang, Q., Ye, Y., Wang, S., Huang, J., Liu, H., Wang, X., Zhang, W., Bu, L., Li, J., Lin, L., Ge, J., & Zou, Y. (2017). Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, ajpheart.00212. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00212.2017>
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y.-J., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biology*, 11(3), 337–343. <https://doi.org/10.1038/ncb1842>
- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., & Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology*, 9(6), 636–645. <https://doi.org/10.1038/ncb1590>
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), 902–905. <https://doi.org/10.1038/nature04147>
- Zhang, T., & Brown, J. H. (2004). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, 63(3), 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.026>
- Zhang, Y.-H., Wu, H.-J., Che, H., Sun, H.-Y., Cheng, L.-C., Li, X., Au, W.-K., Tse, H.-F., & Li, G.-R. (2013). Functional transient receptor potential canonical type 1 channels in human atrial myocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 465(10), 1439–1449. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1291-3>
- Zhao, G., Li, T., Brochet, D. X. P., Rosenberg, P. B., & Lederer, W. J. (2015). STIM1 enhances SR Ca<sup>2+</sup> content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1423295112>

## 8 Publikationen

### Kongressbeiträge

**7th German Pharm-Tox Summit**, Digital, März 2022, Online-Posterpräsentation

Hermes, J., Kockskämper, J.: "Store-operated calcium entry differs between atrial and ventricular myocytes"

Abstract publiziert in: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 395, Suppl. 1 (2022)

**100. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG)**; Frankfurt, Oktober 2021, Posterpräsentation

Hermes, J., Kockskämper J.: "Store-operated calcium entry increases nuclear calcium concentration in rat ventricular myocytes"

**5th German Pharm-Tox Summit**, Leipzig, März 2020, *Posterpräsentation*

Hermes, J., Borisova, V., Kockskämper, J.: "Store-operated calcium entry in cytoplasm and nucleus of rat ventricular myocytes"

Abstract publiziert in: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 393, Suppl. 1 (2020)

**BPC Retreat**, Rauschholzhausen, Mai 2019, Posterpräsentation

Hermes, J., Kockskämper, J.: „Store-operated calcium entry in cytoplasm and nucleus of rat ventricular myocytes"

## 9 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Regulation der cytoplasmatischen und nucleären Calcium-Konzentration durch den speichergesteuerten Calcium-Einstrom in adulten Kardiomyozyten“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 15.09.2022

.....  
(Julia Madeleine Hermes)

## 10 Lebenslauf

Zum Schutz personenbezogener Daten steht der Lebenslauf in der Online-Version nicht zur Verfügung.

## 11 Danksagung

Zum Schutz personenbezogener Daten steht die Danksagung in der Online-Version nicht zur Verfügung.