

Sebastian Thorge Segin
Dr. med.

Die kardiomyozytenspezifische Deletion von Orai 1 enthüllt seine protektive Funktion bei Angiotensin II-induziertem kardialen Remodelling

Fach: Pharmakologie
Doktorvater: Prof. Dr. Marc Freichel

Im Rahmen kardialer Umbauprozesse („Remodeling“) mit der Entstehung von Myokardhypertrophie, Fibrosierung und Herzinsuffizienz führen neuroendokrine Faktoren wie Angiotensin II zur Aktivierung von calciumvermittelten Signalwegen in Kardiomyozyten. Als grundlegende Prozesse des pathologischen kardialen Remodelings sind Veränderungen der Calciumhomöostase der Kardiomyozyten bereits vorbeschrieben und Calcium selbst spielt hierbei eine wichtige Rolle als second Messenger. In nicht erregbaren Zellen wird ein Teil der Calciumhomöostase über den *Store Operated Calcium Entry* reguliert und stellt ein System mit einem im Sarkoplasmatischen Retikulum befindlichen Calcium Sensor (Stromal interaction molecule – Stim) und darüber gesteuerten Calciumeinstrom über calciumselektive Orai 1 Kanäle in der Plasmamembran dar. In dieser Arbeit soll die Rolle der Orai 1 Proteine in zyklisch erregbaren Kardiomyozyten im Hinblick auf die Entwicklung einer durch neurohumorale Stimuli ausgelösten kardialen Hypertrophie untersucht werden. Dabei war der Einfluss in adulten Kardiomyozyten weitestgehend unklar und bislang nur durch Knock-down Modelle in neonatalen Kardiomyozyten untersucht worden. Sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch im intakten Herzen in vivo sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein kardiomyozytenspezifischer Knock out von Orai 1 eine schützende Funktion gegenüber hypertrophieauslösenden Reizen darstellt und ob ein Fehlen von Orai 1 Auswirkungen auf die kontraktile Funktion des adulte Herzens hat. Zunächst konnte in embryonalen Mauskardiomyozyten mittels Immunozytochemie die Präsenz von Orai 1 Proteinen unter Verwendung von Orai 1 Knock out Kardiomyozyten (Orai 1^{-/-}) als Kontrolle gezeigt werden. Durch Angiotensin II Stimulation konnte in Orai 1 Knock out Kardiomyozyten schließlich im Gegensatz zu Orai 1^{+/+} Kontrollkardiomyozyten und auch gegenüber heterozygoten Orai 1^{+/-} Zellen keine Zunahme der Zellquerschnittsfläche als Parameter für eine Kardiomyozytenhypertrophie nachgewiesen werden. Aufbauend auf diesen Resultaten wurde eine Mauslinie generiert, in der durch eine kardiomyozytenspezifische Expression einer Cre-Rekombinase eine zeitlich gesteuerte Deletion von Orai 1 in Kardiomyozyten induziert wurde (Orai 1^{fx/fx}/αMHC Cre bzw. Orai 1^{CM KO}). Die induzierbare Orai 1 Deletion zeigte sich unter anderem deswegen als notwendig, da sich ein bereits bei Geburt bestehender Orai 1 Knock out in Mäusen als postnatal letal erweist. Die Orai 1^{CM KO} Mäuse konnten 3 Wochen nach Abschluss der Induktion der Orai 1 Deletion im Hinblick auf histologische Veränderungen wie Fibrosierung und der Kardiomyozytenquerschnittsfläche sowie auf funktionelle kardiale Veränderungen hin untersucht werden. Die kardiale Funktion wurde mittels Druck-Volumen-Kurven über einen intraventrikulär platzierten Katheter aufgezeichnet und konnte somit nach Etablierung eines dazu entwickelten Untersuchungsprotokolls sehr präzise charakterisiert werden. In der kardialen Funktionsanalyse konnte unter basalen Bedingungen kein Unterschied zwischen den kardiomyozytenspezifischen Orai 1 Knock

out Tieren (Orai 1^{CM KO}) und der Kontrollgruppe gefunden werden. Histologische Analysen der Fibrosierung sowie der Zellquerschnittsfläche der Kardiomyozyten ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

In den Orai 1^{CM KO} Mäusen erfolgte im weiteren Untersuchungsverlauf eine Stimulation der kardialen Hypertrophie durch Angiotensin II Behandlung über osmotische Minipumpen. Als Kontrollgruppe wurden zum einen Cre-negative Tiere herangezogen, welche keine Orai 1 Deletion zeigten und zum anderen Tiere ohne Angiotensin II Stimulation (Minipumpen mit 0,9% NaCl), sodass insgesamt vier Gruppen resultierten. Es zeigte sich sowohl in Orai 1 Knock out Mäusen (Cre positiv), als auch in den Kontrolltieren (Cre negativ) eine Hypertrophieantwort auf das Angiotensin II im Sinne einer makroskopischen Größenzunahme des Herzens. Jedoch war eine schützende Wirkung, vergleichbar zu den Zellkulturexperimenten, nicht zu beobachten. Entgegen der Erwartung, ausgehend von den Zellkulturexperimenten, zeigte sich bei der Betrachtung der Fibrosierung und der Zunahme der Kardiomyozytenquerschnittsfläche sogar ein signifikant gesteigertes pathologisches Remodelling in Orai 1 Knock out Mäusen nach Angiotensin II Stimulation. Die Analyse der kardialen Funktion zeigte eine verminderte Ejektionsfraktion und ein vermindertes Schlagvolumen in den Angiotensin II behandelten Orai 1^{CM KO} Mäusen gegenüber den Kontrolltieren (Cre negativ).

Da diese Differenzen zwischen Orai 1 Knock out Mäusen und Kontrolltieren ohne Hypertrophiestimulation nicht feststellbar waren, scheint Orai 1 in adulten Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen eine abweichende Rolle von der in neonatalen kardialen Zellen zu spielen. Die hypertrophieschützende Funktion des Orai 1 Knock outs in der Zellkultur lässt sich im Mausmodell nicht mehr reproduzieren, sondern es zeigt sich sogar eine Verschlechterung der kardialen Situation bei Betrachtung histologischer und funktioneller Aspekte. Die Unterschiede zwischen den in vivo Versuchen mit adulten Zellen und den in vitro Versuchen mit embryonalen Zellen könnte auf das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, wie Fibroblasten, in denen Orai 1 weiterhin aktiv war, und Kardiomyozyten zurückzuführen sein. So sind Interaktionen zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten bekannt. Auch die beschriebenen weiteren Subtypen Orai 2 und 3 könnten einen Kompensationsmechanismus für das Fehlen von Orai 1 realisieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein differierender Einfluss von Orai 1 zwischen adulten und embryonalen Kardiomyozyten identifiziert werden. Während in embryonalen Kardiomyozyten Orai 1 scheinbar eine Notwendigkeit zur kardialen Hypertrophie darstellt, so repräsentiert es in adulten Zellen eine steuernde, teils sogar schützende Komponente im kardialen Remodelling unter prohypertrophen Bedingungen. Unter Ruhebedingungen erscheint Orai 1 hingegen in adulten Kardiomyozyten sogar verzichtbar.

Demnach stellt Orai 1 eine wichtige Rolle im Netzwerk der regulierenden Faktoren einer pathologischen kardialen Hypertrophie dar und kann nicht nur als rein pro- oder antihypertropher Faktor betrachtet werden.