

Leon Carl Kiper  
Dr. med.

## **Store-Operated Calcium Entry Associated Regulatory Factor – A Regulator of Survival and Growth in Cardiac Myocytes?**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. Mirko Völkers

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss des Proteins *Store-Operated Calcium Entry Associated Regulatory Factor* (SARAF) in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (engl. neonatal rat ventricular cardiac myocytes, NRVCN) auf Zellwachstum, Calciumhaushalt und die *Unfolded Protein Response* (dt. ungefaltete Proteinantwort, UPR). SARAF ist ein im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Protein, das hauptsächlich als negativer Regulator vom *Store-Operated Calcium Entry* (dt. speichergesteuerter Calcium-Einstrom, SOCE) fungiert.

In dieser Arbeit wurden etablierte und validierte Methoden verwendet, wobei alle Experimente in vitro an primären Kardiomyozytenkulturen aus den Ventrikeln neonataler Rattenherzen durchgeführt wurden. Die Genexpression wurde auf Transkriptionsebene mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert, während die Proteindetektion und -quantifizierung mit Hilfe von Western Blot und Densitometrie erfolgten. Der Knockdown von SARAF gelang mit Hilfe eines small interfering RNA (siRNA)-vermittelten Ansatzes, während die Überexpression spezifischer Genprodukte mittels adenoviraler Genübertragung erreicht wurde. Die Zellgröße wurde durch Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts bestimmt, Calcium-Parameter wurden mittels Immunfluoreszenz gemessen. Die Zellviabilität wurde mit einem MTT-Assay quantifiziert und Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die mRNA Transkripte von SARAF wurden erfolgreich in NRVCM nachgewiesen und mittels siRNA herunterreguliert. Die Expression von SARAF auf Ebene der Transkription blieb nach pharmakologisch induziertem Zellwachstum unverändert. Darüber hinaus führte die Dezimierung von SARAF nicht zu einem veränderten Zellwachstum oder Expressionsmuster der Hypertrophiemarker ANP und BNP nach pharmakologisch induzierter Hypertrophie. Während die diastolischen Calciumwerte nach dem Ausschalten von SARAF anstiegen, blieben die SOCE-Aktivität, die Amplituden der elektrisch induzierten Calciumtransienten und die basalen Calciumwerte unverändert.

Nach Induktion von ER-Stress mittels Thapsigargin oder Tunicamycin fand sich ein deutlicher Anstieg der SARAF-Expression. Die adenovirale Überexpression der Transkriptionsfaktoren ATF6 und XBP1 führte zu einer erhöhten SARAF-Expression, während die Überexpression einer dominant-negativen Form von ATF6 die Hochregulierung von SARAF nach Thapsigargin-Behandlung verhinderte. Die Viabilität SARAF-dezimierter Zellen war im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant vermindert und dieser Effekt wurde nach Behandlung mit Thapsigargin noch weiter verstärkt. Darüber hinaus ging die Reduktion von SARAF mit einer signifikant niedrigeren Expression der protektiven Chaperone GRP78, GRP94 und PDIA6 nach Thapsigargin-Behandlung einher.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SARAF für pharmakologisch induziertes Zellwachstum in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten in vitro entbehrlich ist. Weitere Studien konnten jedoch zeigen, dass SARAF kardiales Zellwachstum in vivo und nach Überexpression auch in vitro beeinflusst. Darüber hinaus scheint SARAF in NRVCM keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität des *Store-Operated Calcium Entry* zu haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch den Schluss zu, dass SARAF ein integraler Bestandteil insbesondere des ATF6-Signalweges der *Unfolded Protein Response* ist und durch Modulation der Chaperonspiegel im endoplasmatischen Retikulum zum Schutz der Zellen vor Thapsigargin-vermitteltem ER-Stress beiträgt.