

Aus dem Bereich Innere Medizin III

Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm

## **Die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase: Yin Yang der antioxidativen Kapazität in Kardiomyozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2017

vorgelegt von

**Albrecht Graf von Hardenberg**

geboren am 29.7.1985 in Kiel, Schleswig-Holstein

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Tag des Kolloquiums:

Berichtersteller:

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Herrn Dr. rer. nat. Alexander Nickel, Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 22.02.2017

(Albrecht Graf von Hardenberg)

## Meinen Eltern

## **INHALTSVERZEICHNIS**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII	
<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Herzinsuffizienz</b>	<b>5</b>
3.1.1	Definition	5
3.1.2	Epidemiologie	5
3.1.3	Symptome	5
3.1.4	Ätiologie	6
3.1.5	Pathophysiologie	7
3.1.6	Therapie	9
<b>3.2</b>	<b>Die Physiologie des Kardiomyozyten</b>	<b>9</b>
3.2.1	Der Kardiomyozyt	10
3.2.2	Die elektromechanische Kopplung	10
3.2.3	Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung	12
<b>3.3</b>	<b>Energieproduktion in den Mitochondrien</b>	<b>13</b>
3.3.1	Kardialer Substratmetabolismus	14
3.3.2	Citratzyklus	14
3.3.3	Die Atmungskette	15
3.3.4	Regulation von Energieangebot und Energienachfrage	16
3.3.5	Sauerstoff	19
3.3.6	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Nitrogen Spezies (RNS)	20
3.3.7	Oxidativer Stress	20
3.3.8	Die Atmungskette als Quelle von ROS	22
3.3.9	Das antioxidative Schutzsystem	24
3.3.10	„Redox-optimized ROS Balance“	25
<b>3.4</b>	<b>Die Nikotinamid-Nukleotid Transhydrogenase (Nnt)</b>	<b>26</b>
3.4.1	Die Nnt-defiziente BL/6J Maus	27

---

3.4.2	Die Nnt und das Herz	28
<b>4</b>	<b>ZIELE DER STUDIE</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Quantitative Messung von Superoxid am Luminometer</b>	<b>31</b>
5.1.1	Lucigenin Assay	32
5.1.2	Proteinbestimmung nach Lowry	33
<b>5.2</b>	<b>Photometer</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Zellkontraktionsanlage</b>	<b>34</b>
5.3.1	Zellisolation	34
5.3.2	Messprotokoll an der Einzelzellkontraktionsanlage	36
5.3.3	NADH/NADPH und FAD Messungen	39
5.3.4	Bestimmung der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Indo-1 AM	39
5.3.5	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials mit TMRM	40
5.3.6	Superoxidradikal Messungen mit Mitosox	40
5.3.7	$\text{H}_2\text{O}_2$ Messungen mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H2-DCF-DA)	40
5.3.8	Lösungen	41
5.3.9	Auswertung der Einzelzell-Experimente	42
5.3.10	Statistik	42
5.3.11	Versuchstiere	43
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
<b>6.1</b>	<b>Vorversuche am Luminometer und Photometer</b>	<b>44</b>
6.1.1	NADPH-induzierte ROS Formation am Luminometer	45
6.1.2	Unterschiede und Interaktion von NADH/NADPH bei der ROS Produktion	48
6.1.3	Die reverse Reaktion der Nnt	51
6.1.4	Kinetik der Nnt Reaktion	53
<b>6.2</b>	<b>Untersuchung der Nnt in isolierten Kardiomyozyten</b>	<b>56</b>
6.2.1	Redoxstatus von NAD(P)H und $\text{FAD}^+$ und Messung des mitochondrialen Membranpotenzials	57
6.2.2	Kalibrierung des Redoxstatus	60
6.2.3	Maximal oxidierbarer Pool von FADH und NAD(P)H	62

---

6.2.4	Superoxid und Wasserstoffperoxid Messung mittels Mitosox und DCF	63
6.2.5	Zellverkürzung während des Stressprotokolls	65
6.2.6	Messung des zytosolischen Calcium mittels Indo	67
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>7.1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>69</b>
7.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	69
7.1.2	Vermehrte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Detektion in BL/6J während reduzierter mitochondrialer Bedingungen	70
7.1.3	Fehlende Oxidation von NADPH in BL/6J unter oxidierten mitochondrialen Bedingungen	72
7.1.4	Pathophysiologische Relevanz der reversen Nnt Reaktion bei der Herzinsuffizienz	73
<b>7.2</b>	<b>Aussichten und Aspekte</b>	<b>76</b>
7.2.1	Die klinische Bedeutung der reversen Nnt Reaktion	76
7.2.2	Oxidativer Stress als pharmakologisches Target der HF Therapie	78
7.2.3	Methodische Grenzen der Differenzierung von NADPH und NADH	79
7.2.4	Maximale ROS Detektion durch reverse Nnt Reaktion	81
7.2.5	Die physiologische Funktion der Nnt	82
7.2.6	The Black Six Strain	83
<b>7.3</b>	<b>Schlusswort</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>102</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt (acute myocardial infarct)
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CHF	chronische Herzinsuffizienz
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
DCF	Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DM	Diabetes Mellitus
EF	Ejektionsfraktion
ETC	Atmungskette (electron transport chain)
FCCP	Carbonylcyanid p-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazon
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HF	Herzinsuffizienz (heart failure)
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (heart failure with reduced EF)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (heart failure with preserved EF)
HZV	Herzeitvolumen
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IDHm	Mitochondriale Isocitratdehydrogenase
IMM	innere mitochondriale Membran
LTCC	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal
LV	linker Ventrikel (left ventricular)

---

MCU	mitochondrialer $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter
MEPm	mitochondriales Malatenzym
MRS	magnetische Resonanzspektroskopie
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NF	Gesunde Vergleichsherzen (non failing)
Nnt	Nikotinamid Nukelotid Transhydrogenase
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PDP	Pyruvatdehydrogenasephosphatase
PKA	Proteinkinase A
PRX	Peroxiredoxin
$Q_{\text{ROS}}$	Netto ROS-Produktion
QTL	Quantitative Trait Locus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
R-ORB	„Redox optimized ROS balance “
RLU	relative Lichteinheiten (relative Light Units)
RNS	Reaktive Nitrogenspezies (reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	Relaxationszeit (relaxation time)
RyR <sub>2</sub>	Ryanodinrezeptor
SERCA	SR $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
SL	Sarkomerlänge (sarcomere length)
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	Aortenkonstriktion (trans aortic constriction)
TCA	Citratzyklus, Krebszyklus (tricarboxylic acid cycle)
TR	Thioredoxinreduktase
TRX	Thioredoxin
TTP	Zeit bis zum Peak (time to peak)
UCP	Entkopplungsproteine (uncoupling protein)

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1 Elektromechanische Kopplung .....	11
Abbildung 2 Mitochondriale Prozesse .....	18
Abbildung 3 Oxidativer Stress .....	22
Abbildung 3a Redox optimizied ROS balance nach Aon et al. ....	25
Abbildung 4 Vorwärtsreaktion der Nnt.....	28
Abbildung 5 Rückwärtsreaktion der Nnt .....	29
Abbildung 6 Schema des Epifluoreszenz-Setups .....	38
Abbildung 7 Schema zu den Vorversuchen .....	44
Abbildung 8 Bestimmung der ROS Formation am Luminometer .....	47
Abbildung 9 Bestimmung von ROS (Luminometer) und NAD(P)H Extinktion (Photometer) ..	50
Abbildung 10 Messung der reversen Nnt Reaktion am Photometer .....	52
Abbildung 11 Kinetik der Nnt Reaktion.....	55
Abbildung 12 Redoxstatus (NAD(P)H/FAD <sup>+</sup> ) und mitochondriales Membranpotenzial ( $\Delta\psi_m$ )	59
Abbildung 13 Unterschiede in der Kalibrierung von NAD(P)H .....	61
Abbildung 14 Maximal oxidierbarer Pool von NAD(P)H .....	62
Abbildung 15 Superoxid und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Messung mittels Mitosox und DCF .....	64
Abbildung 16 Zellverkürzungsmessung .....	66
Abbildung 17 Messung des zytosolischen Calcium mittels Indo 1AM .....	68
Abbildung 19 Calcium reduziert die mitochondriale Redoxenviroment .....	71
Abbildung 20 ADP induzierte die reverse Nnt Reaktion durch Oxidation von NADH.....	73
Abbildung 21 Arbeitslasterhöhung in Herztrabekeln auf drei unterschiedliche Weisen .....	75
Abbildung 22 Mitochondriale Oxidation und Herzinsuffizienz .....	77
Abbildung 23 Nnt Aktivität in intakten Mitochondrien (Klingenberg et al.) .....	80
Abbildung 24 Nnt als Differential mitochondrialer Vorgänge .....	83

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Oxidativer Stress ist von großer Bedeutung für die Entstehung und Progression einer Herzinsuffizienz und bezeichnet ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die wichtigsten Quellen von ROS im Herzen sind die NADPH Oxidase (NOX) und Mitochondrien. Die Mechanismen der mitochondrialen ROS-Emission sind unvollständig verstanden.

Die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) katalysiert in Mitochondrien die Reaktion  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NADP}^+$ , und das Gleichgewicht der Reaktion ist wegen ihrer Kopplung an den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran zugunsten der NADPH Regeneration verschoben. In Mitochondrien erhält NADPH die antioxidative Kapazität, damit kommt der Nnt in erster Linie eine antioxidative Funktion zu. Eine häufig verwendete Mauslinie, die C57BL/6 Maus der Jackson Laboratories (BL/6J) weist eine Mutation auf, die zu einem Funktionsverlust der Nnt führt, während die C57BL/6N Mauslinie über eine intakte Nnt verfügt.

Ziel der Arbeit: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Nnt für die antioxidative Kapazität in Herzmuskelzellen genauer zu charakterisieren. Es wurde die Hypothese untersucht, ob ein Fehlen der Nnt zu vermehrten oxidativen Stress führt. Hierfür wurden oben genannte Mausmodelle verwendet.

Methoden: Die Experimente wurden an isolierten Herzmuskelzellen und homogenisiertem Myokard durchgeführt. Bei Experimenten an intakten Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) wurde in diesen entweder die Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD, oder alternativ das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) mit TMRM zusammen mit zytosolischen Calcium-Konzentrationen (mit Indo-1), die mitochondriale Superoxidproduktion (mit MitoSOX) oder die zelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Akkumulation (mittels DCF) bestimmt. Darüber hinaus wurde die Sarkomerverkürzung der Zellen während elektrischer Stimulation mit einer CCD-Kamera gemessen. Bei den Experimenten an homogenisiertem Myokard wurde die Produktion von Superoxid mit Lucigenin sowie die Autofluoreszenz von NAD(P)H bestimmt.

Ergebnisse: In isolierten Kardiomyozyten, die einer physiologischen Stimulation mit

Anheben der Stimulationsfrequenz von 0.5 auf 5 Hz unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ausgesetzt wurden, traten keine Unterschiede zwischen BL/6J und BL/6N hinsichtlich Sarkomerverkürzung, intrazellulärer Calcium-Konzentration, mitochondrialem Membranpotential oder Superoxidproduktion auf. Allerdings kam es in BL/6J Mäusen zu einer stärkeren Akkumulation von  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ), was ggf. auf das Fehlen der für die antioxidative Kapazität benötigten Vorwärts-Reaktion der Nnt mit NADPH-Regeneration zurückzuführen ist. Während der Kalibrierung des NAD(P)H Redoxstatus wurden -durch Applikation des Atmungsketten-Entkopplers FCCP-Bedingungen simuliert, die zu einer selektiv erhöhten Arbeitslast durch Verbrauch von NADH an der Atmungskette führen. Hierbei kam es zu einer stärkeren Oxidation des gesamten NAD(P)H Pools in BL/6N als in den BL/6J Myozyten, was auf das Fehlen des NADPH-Verbrauchs über die reverse Nnt Reaktion in BL/6J Myozyten zurückgeführt wurde. Deshalb wurde in den BL/6J Myozyten nur der NADH-, aber nicht der NADPH Pool verbraucht. In BL/6N Myozyten kam es hingegen durch die reverse Nnt Reaktion nach Verbrauch von NADH über die Atmungskette auch zu einer vollständigen Oxidation von NADPH. Als Positivkontrolle diente die Applikation von  $H_2O_2$ , welches in beiden Genotypen die komplette Oxidation des NADH und NADPH Pools verursachte. In homogenisiertem Myokard konnte die reverse Nnt Reaktion durch Bedingungen reproduziert und quantifiziert werden, in denen die Konzentrationen von NADPH und  $NAD^+$  hoch-, und von  $NADP^+$  und NADH niedrig waren.

Schlussfolgerungen: Die bekannte antioxidative Rolle der Nnt, die durch ihre Vorwärtsreaktion und NADPH Regeneration erklärt wird, konnte mit der Beobachtung einer erhöhten  $H_2O_2$  Detektion in Nnt-defizienten BL/6J Myozyten während physiologischem Stress untermauert werden. Bei pathologischer Arbeitslast überschreitet der NADH-Verbrauch an der Atmungskette die NADH-Regeneration im Citratzyklus, und die resultierende NADH Netto-Oxidation provoziert die Umkehr der Nnt Reaktion ( $NADPH + NAD^+ \rightarrow NADH + NADP^+$ ), was NADPH Oxidation und vermehrte  $H_2O_2$  Emission herbeiführt.

Mit dieser überraschenden Erkenntnis über die reverse Nnt Reaktion bietet diese Arbeit einen neuen zentralen pathophysiologischen Mechanismus der Herzinsuffizienz, der oxidativen Stress durch eine erhöhte Arbeitslast erklärt.

## 2 ABSTRACT

The nicotinamide nucleotide transhydrogenase: Yin Yang of antioxidative capacity in cardiomyocytes

Background: Oxidative stress is causally linked to the onset and progression of heart failure and refers to an imbalance between production and elimination of reactive oxygen species (ROS). Important sources of ROS in the heart are the NADPH oxidase (NOX) and mitochondria. The mechanisms of mitochondrial ROS emission are incompletely resolved.

In mitochondria, the nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) catalyzes the reaction  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+$ . Through coupling to the proton gradient across the inner mitochondrial membrane, the equilibrium of this reaction shifts towards NADPH regeneration. Since NADPH maintains the antioxidative capacity in mitochondria, the Nnt has primarily an antioxidative function. A widely-used mouse strain, the C57BL/6 by Jackson laboratories (BL/6J) has a loss-of-function mutation of the Nnt, while the C57BL/6N strain has an intact Nnt.

The aim of the thesis was to resolve the interplay between Nnt and antioxidative capacity. We hypothesized that Nnt deficiency triggers oxidative stress in cardiac myocytes.

Methods: Experiments were performed on isolated cardiac myocytes and homogenated myocardium. In cardiac myocytes, the autofluorescence of NAD(P)H and FAD or alternatively, the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ; with TMRM) was determined together with cytosolic calcium concentrations (using Indo-1). In further experiments, mitochondrial superoxide production (via MitoSOX) or  $\text{H}_2\text{O}_2$  accumulation (with DCF) were determined. Furthermore, sarcomere shortening during electrical stimulation was recorded by a CCD-camera. In experiments using homogenated myocardium, superoxide production was detected by lucigenin and the NAD(P)H redox state by its autofluorescence.

Results: In isolated cardiac myocytes exposed to an increased stimulation frequency from 0.5 to 5 Hz under  $\beta$ -adrenergic stimulation, sarcomere shortening, intracellular calcium concentrations, mitochondrial membrane potential and superoxide production

were similar between BL/6J and BL/6N myocytes. In contrast, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation was more pronounced in Nnt-deficient BL/6J myocytes ( $p < 0.05$ ). This may be explained by the lack of NADPH regeneration by the Nnt which may deteriorate the antioxidative capacity. During the calibration of the NAD(P)H redox state, conditions of a selective increase of workload by consumption of NADH via the electron transport chain (ETC) are simulated via applications of the ETC uncoupler FCCP. During this condition, a more pronounced oxidation of the NAD(P)H pool in BL/6N versus BL/6J myocytes was observed, explained by the missing NADPH consumption via the reverse Nnt reaction in BL/6J. Therefore, only NADH, but not NADPH were oxidized. In contrast, in the BL/6N myocytes, NADPH is converted to NADH while NADH is consumed by the ETC. As a positive control, exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidized both NADH and NADPH in both mouse strains. In homogenized myocardium, the reverse mode of the Nnt was quantified by NADH regeneration in the presence of high NADPH and NAD<sup>+</sup> concentrations.

Conclusions: During a physiological increase in workload, the Krebs cycle regenerates sufficient amounts of NADH to support the forward reaction of the Nnt, which regenerates NADPH which in turn fuels the anti-oxidative capacity to eliminate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In contrast, during pathological workload, excessive oxidation of NADH provokes the reversal of the Nnt reaction, which then regenerates NADH from NADPH and thereby, depletes the antioxidative capacity.

With this surprising finding of the reverse Nnt mode, this work identifies a novel and possibly central pathophysiological mechanism for heart failure, which could explain the onset of oxidative stress during a pathological increase of workload.

## **3 EINLEITUNG**

### **3.1 Herzinsuffizienz**

#### **3.1.1 Definition**

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes Syndrom, bei welchem ein Patient typische Symptome wie Luftnot, Müdigkeit und körperliche Abgeschlagenheit und typische klinische Zeichen, wie Tachykardie, pulmonale Rasselgeräusche, Ödeme oder Jugularvenenstauung aufweist, denen eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt. Bei den meisten Patienten bestehen in Ruhe oder unter Belastung Anzeichen für eine systolische und diastolische Dysfunktion. Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz haben Symptome und Zeichen der Herzinsuffizienz bei einer erhaltenen linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) über 50% (McMurray et al. 2012).

#### **3.1.2 Epidemiologie**

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz liegt im Schnitt bei 2-3%, bei 70- bis 80-Jährigen zwischen 10-20%. Die Prognose der Herzinsuffizienz wird u. a. von der Ätiologie, dem Alter, den Komorbiditäten und der individuellen Progression beeinflusst. Insgesamt verstirbt die Hälfte der Patienten binnen 4 Jahren. Von den wegen Herzinsuffizienz hospitalisierten Patienten, werden 40% binnen eines Jahres wieder in ein Krankenhaus aufgenommen oder versterben (Roger 2013). Etwa die Hälfte der Patienten mit Herzinsuffizienz weisen eine erhaltene systolische Funktion auf (LVEF >50%; *heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF). Während initiale Daten suggerierten, dass die Prognose dieser Patienten ähnlich ungünstig wie bei systolischer Herzinsuffizienz sei, zeigen neuere Daten, dass die Prognose der HFpEF besser ist als die der systolischen Herzinsuffizienz (Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC) 2012).

#### **3.1.3 Symptome**

Viele Symptome der Herzinsuffizienz sind unspezifisch und besitzen nur einen geringen diagnostischen Wert. Ursächlich für die meisten Zeichen und Symptome sind Natrium und Wasserretention. Diese Symptome sprechen gut auf eine Diuretika-

Therapie an (McMurray et al. 2012). In Tabelle 1 werden die wichtigsten Zeichen und Symptome aufgezählt. Die Kachexie des Herzkranken wurde bereits von Hippocrates 400 Jahre vor Christus beschrieben: "Das Fleisch wird verbraucht und wird zu Wasser, das Abdomen füllt sich mit Wasser, die Füße und Beine schwellen an, die Schultern, die Claviculae, die Brust und die Oberschenkel schmelzen dahin" (Katz 1962).

Tabelle 1 Typische Symptome und Zeichen der Herzinsuffizienz (McMurray et al. 2012)

Symptome	Zeichen
typische	spezifischer
Kurzatmigkeit	erhöhter jugulärer Venendruck
Orthopnoe	hepatojugulärer Reflux
paroxysmale nächtliche Dyspnoe	dritter Herzton
reduzierte Belastungstoleranz	nach lateral verschobener Herzspitzenstoß
Fatigue, Müdigkeit, verlängerte Erholungszeit nach Belastung	auskultatorische Nebengeräusche
geschwollene Knöchel	
Weniger typisch	weniger spezifisch
nächtlicher Husten	periphere Ödeme
Asthma kardiales	pulmonale Krepitationen
Gewichtsverlust (>2kg/Woche)	Pleuraergüsse
aufgedunsenes Gefühl	Tachykardie
Appetitverlust	Irregulärer Puls
Verwirrtheit	Hepatomegalie
Depression	Aszites
Palpitationen	Kachexie
Synkopen	

### 3.1.4 Ätiologie

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom vielfältiger Ätiologie. Häufig ist der Verlust von funktionellem Myokard der Ausgangspunkt der Entstehung einer Herzinsuffizienz, insbesondere bei einer ischämischen Genese, wenn ein Myokardinfarkt diesen Verlust herbeiführt (Packer 1992). Neben direktem Verlust von funktionellem Myokard führen auch maladaptive Veränderungen des Myokards durch Druckbelastung (Stenosen, Hypertonie), Volumenbelastung (Klappenvitien, Niereninsuffizienz) oder durch genetische Erkrankungen (HCM, DCM) zu einer Herzinsuffizienz. Vielfach kommt es zu einer Überlappung der unterschiedlichen

Ursachen mit der Folge einer Kombination von strukturellen und funktionellen Störungen des Myokards. Tabelle 2 fasst mögliche Ursachen zusammen.

Tabelle 2 Ursachen der Herzinsuffizienz (McMurray et al. 2012)

Ursachen der Herzinsuffizienz	
1. Ischämie	Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt
2. Hypertonie	arterielle und pulmonale Hypertonie
3. Infektionserkrankungen	virale Myokarditiden, Chagas-Krankheit, HIV-Infektion
4. dauerhaft oder temporär erhöhtes HZV	Shuntvitien, AV Fisteln, Sepsis, Anämie, Hyperthyreose, Schwangerschaft, renale/iatrogene Volumenüberladung
5. Kardiomyopathie	dilatativ, hypertroph, restriktiv, arrhythmogen, rechtsventrikulär, unklassifiziert
6. Medikamente	Überdosierung Betablocker, Calciumantagonisten, Antiarrhythmika, Chemotherapeutika (z.B. Anthracycline)
7. Toxine	Alkohol, Kokain, Emetin, Schwermetalle (Arsen, Kobalt, Kupfer, Blei, Eisen)
8. endokrinologisch	Diabetes Mellitus, Hyper-/Hypothyreose, Phäochromozytom, Nebenniereninsuffizienz, Akromegalie, Chushing-Syndrom
9. alimentär/metabolisch	Thiaminmangel, Selenmangel, Carnitinmangel, Hypophosphatämie, Hypokalziämie
10. infiltrativ	Amyloidose, Hämochromatose, Sarkoidose, Bindegewebskrankungen, eosinophile oder lymphozytäre Infiltration, Malignom
11. andere	Perikarderguss, Perikarditis calcarea, peripartale Kardiomyopathie, Tachykardien, Bradykardien

### 3.1.5 Pathophysiologie

Die Herzinsuffizienz lässt sich unter anderem mit Hilfe der Ejektionsfraktion (EF) klassifizieren. Man unterscheidet die "HFrEF" (Heart failure with reduced EF, <35%) und die "HFpEF" (Heart failure with preserved EF, >50%). HFpEF Patienten haben in der Regel eine diastolische Dysfunktion, während bei den HFrEF Patienten immer die systolische und i. d. R. auch die diastolische Funktion gestört sind. Im Folgenden wird die Pathophysiologie der HFrEF beschrieben.

Bei Patienten mit linksventrikulärer systolischer Dysfunktion kommt es nach kardialer Schädigung in den überlebenden Kardiomyozyten und der extrazellulären Matrix zu maladaptiven Veränderungen, die zu einem maladaptiven Remodeling führen. In der Folge kommt es zu einer Dilatation und zur Beeinträchtigung der Kontraktion. Die Progression des Remodeling und die Verschlechterung der Ejektionsfraktion sind charakteristisch für die unbehandelte systolische Herzinsuffizienz. Zwei Mechanismen spielen dabei eine zentrale Rolle, zum einen das Fortschreiten der kardialen Schädigung und zum anderen die neurohumorale Aktivierung als systemische Antwort auf die abnehmende systolische Funktion. Zwei neurohumorale Schlüsselsysteme werden dabei aktiviert: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das sympathische Nervensystem. Neben der direkten Schädigung des Myokards haben die Systeme bei dauerhafter Aktivierung schädliche Auswirkungen auf andere Organsysteme und führen zu einem „Teufelskreis“. Die Unterbrechung dieses „Teufelskreis“ durch Blockierung dieser Systeme ist die Basis der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz (Böhm et al. 2014).

Bei der progredienten myokardialen Schädigung spielt das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle und führt zu oxidativem Stress (Maack et al. 2003). Die Progression der myokardialen Schädigung hängt kausal mit der Menge des oxidativen Stresses zusammen (Nakamura et al. 2002; Li et al. 1995; (Giordano 2005), da oxidativer Stress das maladaptive Remodeling des Herzens induziert. So aktivieren ROS die multifunktionale Calmodulin abhängige Proteinkinase II (Erickson et al. 2008), was Hypertrophie und Apoptose induziert (Joiner et al. 2012). ROS führt weiterhin zu einem HDAC II Export aus dem Nukleus, was ebenfalls Hypertrophie induziert (Ago et al. 2008) und ist wichtiger Aktivator der Apoptose und Nekrose (Giorgio et al. 2005; Halestrap 2005). Durch ROS kommt es außerdem zu Störungen der  $Ca^{2+}$ -Homöostase mit der Folge einer kontraktilen Dysfunktion und Arrhythmien (Maack et al. 2009; Zeitz et al. 2002; Flesch et al. 1999; Akar et al. 2005). Die gestörten intrazellulären Prozesse bei der Herzinsuffizienz werden im Unterpunkt 3.2.3 beschrieben.

### **3.1.6 Therapie**

Zu den Behandlungszielen der Herzinsuffizienz gehören die Sterblichkeitssenkung, die Progressionshemmung, die Verbesserung der Beschwerden, die Senkung der Hospitalisationsrate und eine günstige Beeinflussung bzw. Verminderung nachteiliger Effekte einer möglicherweise vorliegenden Komorbidität. Nach Ausschöpfung der Möglichkeiten einer kausalen Therapie, zum Beispiel einer Katheterintervention bei koronarer Herzkrankheit oder der Behandlung einer Anämie, erfolgt eine medikamentöse Therapie mit dem Ziel der Hemmung der neurohumeralen Aktivierung, also des RAAS und des Sympathikus. Symptome, welche durch Volumenretention hervorgerufen werden, können durch Diuretika verbessert werden (McMurray et al. 2012).

## **3.2 Die Physiologie des Kardiomyozyten**

Bei der elektromechanischen Kopplung erfordern die Ionen-Homöostase und die Kontraktion große Mengen an Energie in Form von ATP (Jafri et al. 2001). Diese Energie wird durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien generiert. Mitochondrien machen ein Drittel des Volumens eines Kardiomyozyten aus. Während eines Herzschlags werden ca. 2% des zellulären ATP verbraucht und der gesamte ATP Pool der Zelle wird in weniger als einer Minute komplett umgesetzt (Harris 1991; Balaban 2002; (Mootha et al. 1997). Dabei verbraucht das Herz 8-15 ml O<sub>2</sub>/min/100g Gewebe in Ruhe. Zum Vergleich benötigt das Gehirn 3 ml O<sub>2</sub>/min/100g. Unter maximaler Beanspruchung kann der kardiale O<sub>2</sub>-Verbrauch bis auf 70 ml O<sub>2</sub>/min/100g wachsen (Giordano 2005). Um die ständigen dynamischen Veränderungen der Energienachfrage an das Energieangebot anzupassen, wird der Redoxstatus des Mitochondriums und der Elektronenfluss über der Atmungskette engmaschig reguliert (Maack & O'Rourke 2007; Brandes & Bers 1997; Balaban 2009; Cortassa et al. 2006). Dabei spielen Ca<sup>2+</sup> und ADP als Regulationsfaktoren eine herausragende Rolle. Die zeitliche und räumliche Abstimmung findet mit Hilfe von Mikrodomänen zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb der Kardiomyozyten statt (Rizzuto et al. 2006; Saks et al. 2005).

### 3.2.1 Der Kardiomyozyt

Elektronenmikroskopisch wird die gleichmäßig strukturierte Architektur der Kardiomyozyten aus Myofilamenten, Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sichtbar. Diese hochorganisierte Architektur ist Voraussetzung für die Mikrodomänen, welche die Kommunikation zwischen den Kompartimenten ermöglichen. Mitochondrien sind entlang der ATP konsumierenden Myofilamente angeordnet und eng mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wie dem SR verwoben und strategisch in der unmittelbaren Nähe der sog. „Diaden“ positioniert, d.h., einer Mikrodomäne zwischen Zellmembran und SR, in denen die Aktivierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR über Ryanodinrezeptoren (RyR) triggert. Dieser Vorgang wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bezeichnet (Kohlhaas & Maack 2013; McNutt & Fawcett 1969).

Lichtmikroskopisch zeigen sich 10–25  $\mu\text{m}$  dicke und 50–100  $\mu\text{m}$  lange Zellen. Kardiomyozyten sind miteinander über die Disci intercalares verzahnt. In den Disci intercalares findet Kommunikation über Gap junctions (Nexus) und mechanische Kopplung über die Fasciae adhaerentes und die Maculae adhaerentes (Desmosomen) statt. Aufgrund dieser engen Verknüpfung der Kardiomyozyten spricht man beim Myokard von einem funktionellen Synzytium (Van Breemen 1953).

### 3.2.2 Die elektromechanische Kopplung

*"Of the ions involved in the intricate workings of the heart, calcium is considered perhaps the most important. It is crucial to the very process that enables the chambers of the heart to contract and relax, a process called excitation–contraction coupling."*  
(Bers 2002)

Wird über die Gap junctions im Arbeitsmyokard ein Aktionspotenzial (AP) weitergeleitet, kommt es in den Kardiomyozyten zu einem  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC). Dieser primäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom triggert eine viel größere Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR über den Ryanodinrezeptor (RyR2). Das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR bindet an Troponine am Myosin und induziert so die Kontraktion der Herzmuskelzelle. Während der Diastole wird der Anteil an  $\text{Ca}^{2+}$ , welcher über den LTCC in die Zelle gelangt ist, über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) exportiert,

während der Anteil, welcher über den RyR2 aus dem SR kam, über die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) zurück ins SR gepumpt wird (Bers 2002). Im menschlichen Kardiomyozyten, und im Meerschweinchen und Kaninchenmyozyten verhält sich der Anteil von LTCC  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in etwa 70/30, während in kleineren Nagetieren, wie Ratten oder Mäuse der Beitrag vom SR-  $\text{Ca}^{2+}$  mit ca. 90/10 deutlich höher ist (Bers 2008). Das Zusammenspiel zwischen LTCC und RyR2 erfordert eine enge räumliche Nähe zwischen dem Sarkolemm der T-Tubuli und dem SR. Diese Nähe ermöglicht zum einen die oben bereits erwähnte Diade, in der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR zeitlich kurz und räumlich begrenzt sehr hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen erzeugen, die die durchschnittliche zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) um ein Vielfaches übersteigen. Diese  $\text{Ca}^{2+}$  "hot spots" verlieren durch Diffusion schnell an Konzentration (Peskov & Langer 1998; Rizzuto & Pozzan 2006). Dies ist das Konzept der Mikrodomäne; zum einem sind die Mikrodomänen für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR wichtig, zum anderen bestehen sie auch zwischen dem SR und den Mitochondrien. Hier ermöglichen sie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien. Dieser Prozess passt die Energienachfrage der Zelle durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Energieverbrauch an den Myofilamenten und der SERCA an das Energieangebot der Zelle durch  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Citratzyklus-Aktivität an.

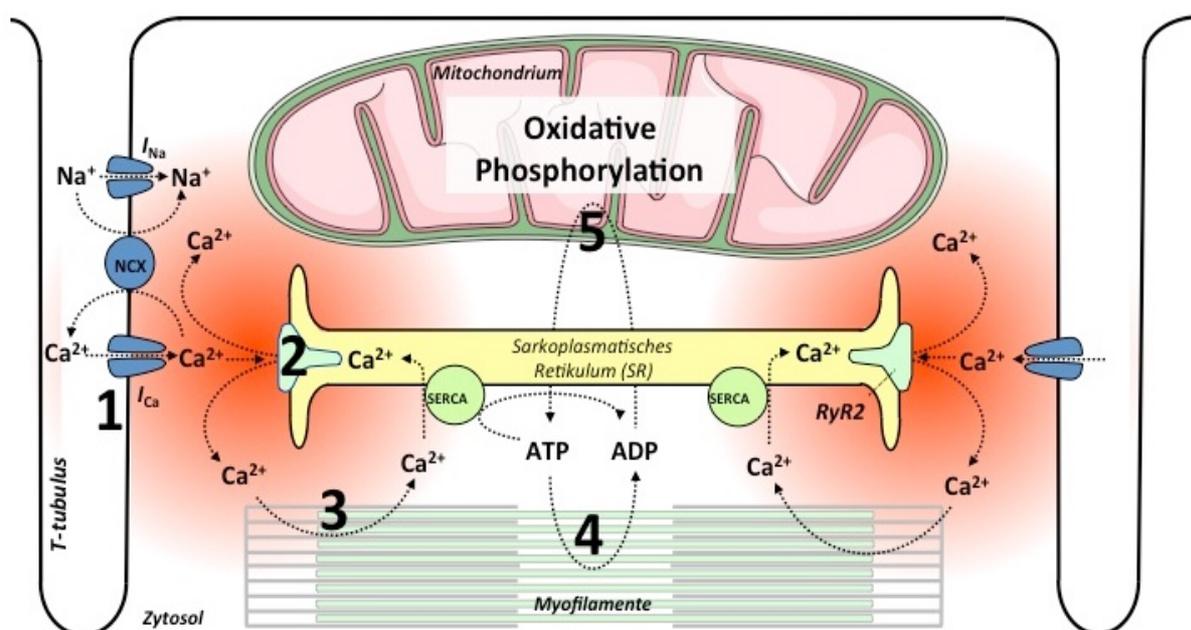


Abbildung 1 Elektromechanische Kopplung (modifiziert nach Maack et al. 2007)

1. Während eines Aktionspotenzials tritt  $\text{Ca}^{2+}$  über den LTCC ins Zytosol. 2. Dabei triggert der initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den LTCC die Öffnung des RyR2, was zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR führt. 3. Das  $\text{Ca}^{2+}$  führt an den Myofilamenten zur Kontraktion. 4. Der Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  und der Kontraktionsvorgang benötigen ATP. 5. ATP wird über die OXPHOS in Mitochondrien regeneriert.

### 3.2.3 Pathophysiologie der elektromechanischen Kopplung

Bei der chronischen Herzinsuffizienz führen Defekte der elektromechanischen Kopplung zu einer systolischen und diastolischen Dysfunktion des Kardiomyozyten (Maack & O'Rourke 2007; Bers 2006; Houser et al. 2003). Eine frühe Beobachtung stellte die Abflachung und Verlangsamung des Aktionspotenzials bei der Herzinsuffizienz dar (Beuckelmann et al. 1991). Dieser Beobachtung liegen verschiedene Veränderungen der Ionen-Homöostase in den Kardiomyozyten zugrunde. Ein zentraler Defekt der Ionen-Homöostase ist die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR (Lindner et al. 1998), welche auf eine verminderte Aktivität der SERCA und auf ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem RyR2 zurückzuführen ist. Zudem ist die dreidimensionale Architektur der Kardiomyozyten in zahlreichen Modellen der Herzinsuffizienz gestört. Die Folge ist eine zeitliche und räumliche Asynchronie der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Heinzel et al. 2011; Bito et al. 2008; Lyon et al. 2009).

Die erhöhte zytosolische Natriumkonzentration ( $[\text{Na}^+]_i$ ) wurde initial für einen adaptiven Mechanismus bei der Herzinsuffizienz gehalten. Die erhöhte  $[\text{Na}^+]_i$  geht u. a. auf eine erhöhte Aktivität des späten Natriumeinstroms („late  $I_{\text{Na}}$ “) und/oder einer erhöhten Aktivität des NCX zurück (Despa et al. 2002; Pieske et al. 2003; O'Rourke & Maack 2007; Baartscheer, Schumacher, van Borren, et al. 2003). Durch die erhöhte  $[\text{Na}^+]_i$  zusammen mit der verringerten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und der Überexpression des NCX wird allerdings auch der Rückwärtsmodus des NCX favorisiert, d.h. es kommt während des AP zu einem Import von  $\text{Ca}^{2+}$  über den NCX und während der Repolarisierung zu einem verminderten Export von  $\text{Ca}^{2+}$  (Despa et al. 2002; Pieske & Houser 2003; Baartscheer et al. 2003; Armoundas et al. 2003; Weber et al. 2003; Piacentino et al. 2003). So wird angenommen, dass das erhöhte  $[\text{Na}^+]_i$  teilweise die verminderte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung kompensiert und die Kontraktion im insuffizienten Herz verbessert (Bers 2006; Baartscheer, Schumacher, Belterman, et al. 2003; Armoundas et al. 2003; Weber et al. 2003; Piacentino et al. 2003; Weisser-Thomas et al. 2003;

Dipla et al. 1999). Das erhöhte  $[Na^+]_i$  hat zudem Auswirkungen auf die mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme und den mitochondrialen Redoxstatus (Maack et al. 2006).

$\beta$ -adrenerge Stimulation steuert die elektromechanische Kopplung durch Phosphorylierung von  $Ca^{2+}$ -regulierenden Proteinen wie beispielsweise dem LTCC. Die Phosphorylierung wird insbesondere durch die Proteinkinase A (PKA) und durch die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II reguliert (CaMKII) (Grimm & Brown 2010; Maier et al. 2007). In der Herzinsuffizienz kommt es zu einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation und nachfolgend zu einer Herabregulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren (Brodde 1993) und zu einer Dysregulation der durch die PKA und die CaMKII regulierten Phosphorylierung. Diese Vorgänge tragen grundlegend zu den maladaptiven Veränderungen der elektromechanischen Kopplung bei (Grimm & Brown 2010; Maier et al. 2007; Wagner et al. 2006). Als weiterer zentraler Mechanismus kommt es zu einem energetischen Defizit (Ingwall & Weiss 2004; Weiss et al. 2005) und mitochondrialem oxidativen Stress (Giordano 2005; Yibing Li et al. 1995), welcher kausal zur Progression und Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen kann.

Zusammenfassend zeichnet sich die Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene durch drei wesentliche Merkmale aus, die eng miteinander verzahnt sind: Defekte in der elektromechanischen Kopplung, ein energetisches Defizit und oxidativer Stress (Kohlhaas & Maack 2011). Vermutlich kommt es nachfolgend zu einer Veränderung der Genexpression (Hohl et al. 2013).

### 3.3 Energieproduktion in den Mitochondrien

*"Understanding the biochemistry of ATP in the myocyte is fascinating, challenging and fun!"* (Ingwall 2002)

Das Herz des Menschen schlägt durchschnittlich 72 Mal in der Minute, also ca. 100.000 Mal am Tag und pumpt dabei fast 10 Tonnen Blut durch den Kreislauf. Bei jedem Schlag wird das Blut durch ein Gefäßnetz mit ca. 100.000 km Länge gepumpt. Um die permanenten rhythmischen Kontraktionen zu gewährleisten, muss eine konstante Generation von Energie stattfinden. Daher ist es nicht überraschend, dass das Myokard eines der energiehungrigsten Gewebe des Körpers ist. Das menschliche

Herz verbraucht durchschnittlich 6kg ATP am Tag, die durch die Mitochondrien generiert werden (Marín-García 2005).

### **3.3.1 Kardialer Substratmetabolismus**

Das Herz besitzt ein hocheffizientes System, um aus chemischen Bindungen Energie freizusetzen und Reduktionsäquivalente für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zur Verfügung zu stellen. Das Herz benötigt einen ununterbrochenen Nachschub von "Kraftstoffen", um die Energienachfrage zu stillen. Dabei werden unterschiedliche Moleküle zu Wasser und CO<sub>2</sub> abgebaut. Der Substratmetabolismus wird durch die Expression der Enzyme reguliert und durch die Energiebedürfnisse des Herzens kontrolliert. Das Herz verwendet unterschiedliche Moleküle als "Kraftstoffe", die metabolischen "Pathways" dieser Kraftstoffe sind zu einem Netz verwoben. Diese Redundanz an metabolischen Möglichkeiten ermöglicht es dem Herzen, die Kraftstoffe variabel untereinander auszutauschen und zu kombinieren. So bedient sich das Herz der am energetisch günstigsten verfügbaren Kraftstoffen seiner Umgebung und konvertiert alle diese Kraftstoffe in Energie in Form von ATP. Postprandial und unter Ruhebedingungen stellen Fettsäuren und Glucose den Energieträger dar. Das Herz ist ein „Omnivore“ (Allesfresser), so kann es neben Glucose und Fettsäuren auch Lactat, Keton-Körper und Aminosäuren verstoffwechseln. Wenn die Arbeitslast unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation steigt, werden Kohlenhydrate (Glykogen, Glucose und Lactat) zum Hauptkraftstoff (Taegtmeyer 2007). Bei der chronischen Herzinsuffizienz verändert sich auch der Substratmetabolismus. Dabei kommt es zu einer Herabregulation der Fettsäuren-Oxidation, was zu einem relativen Anstieg der Glukose-Utilisation führt (Neubauer 2007). Ein Hauptproblem bleibt dabei allerdings, dass trotz erhöhter Aufnahme von Fettsäuren und Glukose in die Zellen ihre Oxidation in Mitochondrien abnimmt, was zu einem Aufstau von metabolischen Intermediären im Zytosol führt, die zu maladapativem Remodeling beitragen können (Nickel et al. 2013).

### **3.3.2 Citratzyklus**

In der mitochondrialen Matrix stellt der Citratzyklus (auch Krebszyklus) einen offenen Kreislauf von biochemischen Reaktionen dar (Krebs & Johnson 1980). Der Citratzyklus

ist Ausgangspunkt und Endpunkt des Stoffwechsels von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten. Die bei der Oxidation der Nahrungsstoffe anfallenden Elektronen werden auf die Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> zur Energiegewinnung übertragen. Die energieerzeugende Re-Oxidation von NADH und FADH<sub>2</sub> findet anschließend an der Atmungskette statt.

Ein wichtiger Kontrollpunkt vor dem Citratzyklus ist der mitochondriale Pyruvat-Dehydrogenase Komplex, welcher das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, als Acetyl-CoA in den Citratzyklus speist. Die Aktivität des Komplexes wird durch Phosphorylierung mit Hilfe der Pyruvatdehydrogenase Kinasen (PDK) und durch Dephosphorylierung mit Hilfe der Pyruvatdehydrogenase Phosphatase (PDP) gesteuert. NADH, Acetyl-CoA und ATP sprechen für eine hohe Energieladung und hemmen den Komplex über die Kinasen, während mitochondriales Ca<sup>2+</sup> den Enzymkomplex über die Phosphatase aktiviert (Denton et al. 1975; Sugden & Holness 2006; Patel et al. 2001). Die Aktivität des Citratzyklus wird über Substratangebot und Produkthemmung reguliert, ein weiterer Regulationsmechanismus von besonderer Bedeutung ist mitochondriales Ca<sup>2+</sup>, es aktiviert neben der PDP die Isocitratdehydrogenase und die  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase. Durch die Regulation an diesen Schlüsselenzymen durch Ca<sup>2+</sup> kann der Substratfluss im Citratzyklus gesteuert werden.

### 3.3.3 Die Atmungskette

*"Of course, I might have been wrong, and in any case, was it not the great Max Planck who remarked that a new scientific idea does not triumph by convincing its opponents, but rather because its opponents eventually die?"* (Peter Mitchell, Nobel lecture 1978)

Die Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> geben im nächsten Schritt Elektronen an die Komplexe I und II der Atmungskette ab. Die Oxidation findet in der Atmungskette in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten statt, bei jedem Schritt wird Energie frei, während das Redoxpotenzial der Produkte stufenweise kleiner wird. Dieser Prozess benötigt mehrere Redox-Zentren, die entlang der inneren mitochondrialen Membran in vier Proteinkomplexen angeordnet sind. Zusammengenommen bilden sie die Atmungskette (Venditti et al. 2013; Navarro et al. 2007).

Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Oxidoreduktase) und Komplex II (Succinat-Coenzym-Q-Oxidoreduktase) übertragen die Elektronen hinunter auf das niedrigere Redoxpotenzial des membranständigen Transporters, Ubiquinon (Coenzym Q), welches dann zu Ubiquinol reduziert. Von hier gelangen die Elektronen auf Komplex III (Coenzym-Q-Cytochrom-C-Oxidoreduktase) und von da weiter hinunter auf einen weiteren membranständigen Elektronentransporter, das Cytochrom c. Cytochrom c überträgt die Elektronen auf Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase), von wo aus sie auf den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen werden und Wasser entsteht (Venditti et al. 2013). Die durch die Folge von schrittweise ablaufenden Redoxreaktionen freiwerdende Energie ermöglicht die Translokation von Protonen aus der Matrix über die innere mitochondriale Membran (IMM). Durch den so induzierten Protonengradienten ( $\Delta\mu_H$ ) entsteht ein Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) über der inneren mitochondrialen Membran (Mitchell & Moyle 1965), welches die treibende Kraft für die  $F_1F_0$ -ATPase darstellt. Sie ist ein winziger molekularer Motor, der ATP, den universalen Energieträger der Zelle, regeneriert (Walker et al. 1995).

### 3.3.4 Regulation von Energieangebot und Energienachfrage

*"The story of ATP and the Heart is the story of how the myocyte accomplishes this extraordinary achievement. It is neither a short nor a simple story, because how this is accomplished changes during development, in disease (molecular reprogramming), and as fuels available for ATP synthesis change during the course of a day. It is an extraordinarily dynamic process."*

Unter physiologischen Bedingungen *in vivo* wird die kardiale Arbeitslast normalerweise durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation erhöht. Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung von  $Ca^{2+}$ -regulierenden Proteinen wie dem LTCC und RyR2 mit der Folge einer Steigerung der Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Transienten, die wiederum zu einer Erhöhung des ATP Verbrauchs an den Myofilamenten und der SERCA führen. Die vermehrte Hydrolyse des ATP führt über ADP zu einer Beschleunigung der Regeneration von ATP an der  $F_1F_0$ -ATPase, hierbei wird der Protonengradient ( $\Delta\mu_H$ ) dissipiert. Um das Membranpotenzial aufrechtzuerhalten, werden NADH und  $FADH_2$  an Komplex I und II der Atmungskette oxidiert. Da durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation die Rate und

Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten gesteigert wird, kommt es über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) (Baughman et al. 2011; De Stefani et al. 2011) und womöglich auch andere mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (O-Uchi et al. 2012) zu einem vermehrten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Mitochondrium. Hier beschleunigt  $\text{Ca}^{2+}$  den Substratfluss und somit die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  und FAD (Brandes & Bers 1997; Cortassa et al. 2006; Brandes & Bers 1996; Brandes et al. 1999; Brandes & Bers 2002; Kohlhaas et al. 2010; Maack et al. 2006; Cortassa et al. 2003; Cortassa et al. 2009). Neben Schlüsselenzymen des Citratzyklus reguliert mitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  auch verschiedene Komplexe der Atmungskette, die  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase sowie den Aspartat-Glutamat Shuttle (Glancy & Balaban 2012).

$\text{Ca}^{2+}$  und ADP passen also Energieangebot und Nachfrage synergistisch an, um den dynamischen Schwankungen der kardialen Arbeitslast gerecht zu werden. Durch die Regulation bleibt die ATP/ADP Ratio konstant (Balaban et al. 1986; Katz et al. 1989) und die  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  Ratio auf einem Level oder erhöht sich bei Steigerung der Arbeitslast (Katz et al. 1987).

Untersucht wurde das Zusammenspiel von  $\text{Ca}^{2+}$  und ADP durch Experimente mit abrupten Veränderungen der kardialen Arbeitslast an isolierten kardialen Trabekeln (Brandes & Bers 1997; Brandes & Bers 1996; Brandes et al. 1999; Brandes & Bers 2002), Kardiomyozyten (Maack et al. 2006; Kohlhaas et al. 2010) und Computermodellen (Cortassa et al. 2006; Cortassa et al. 2003; Cortassa et al. 2009). Während allmählicher Änderungen der kardialen Arbeitslast, wie sie unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation *in vivo* ablaufen, sind die Veränderungen der energetischen Parameter weniger akzentuiert, was für die hohe Effizienz der Regulationsmechanismen durch  $\text{Ca}^{2+}$  und ADP spricht.

Während  $\text{Ca}^{2+}$  den Redoxstatus der Atmungskette reduziert ("push"), also Substratdruck auf die Atmungskette ausübt, übt ADP einen Substratsog ("pull") aus, ADP oxidiert den Redoxstatus der Atmungskette. Halten sich der "Push-Faktor"  $\text{Ca}^{2+}$  und der "Pull-Faktor" ADP optimal die Waage, ist auch Energieangebot und Energienachfrage optimal ausbalanciert und die Zelle arbeitet in einer "Redox-optimierten ROS Balance" (Aon et al. 2010). Ziel der Regulation ist die Bedarfsanpassung der oxidativen Phosphorylierung innerhalb des optimalen

Redoxbereichs. Außerhalb dieses optimalen Bereiches kommt es zu oxidativem Stress (Aon et al. 2010).

Während der Herzinsuffizienz gerät diese feine Abstimmung aus dem Gleichgewicht. Ein erniedrigtes Phosphokreatin (Nascimben et al. 1996) verändert das Verhältnis von ADP und ATP. Während die ATP Spiegel lange konstant bleiben (Beer et al. 2002), steigen die ADP Spiegel an (Neubauer 2007). Erhöhtes ADP führt zu einer beschleunigten Oxidation der mitochondrialen Matrix, während die Reduktion durch vermindertes mitochondriales Calcium gestört ist (Maack et al. 2006).

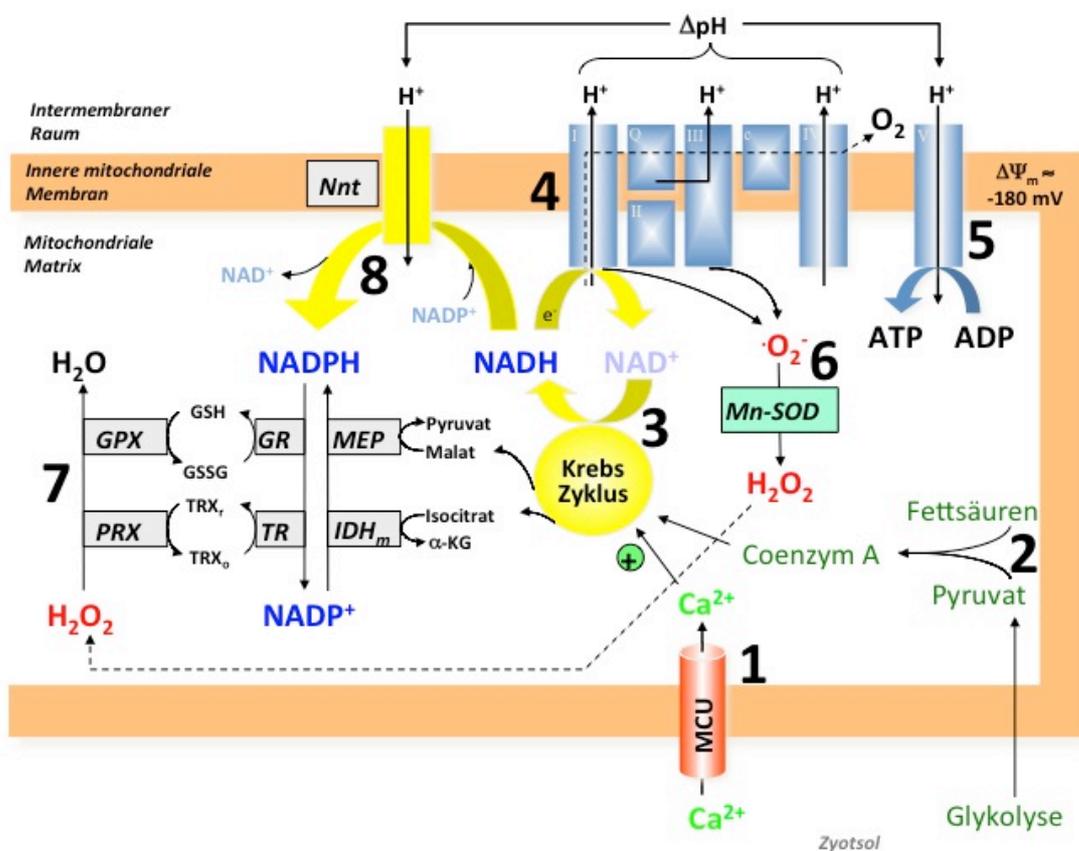


Abbildung 2 Mitochondriale Prozesse (modifiziert nach Kohlhaas et al. 2010)

$Ca^{2+}$  gelangt über den mitochondrialen  $Ca^{2+}$  Uniporter (MCU) in die Matrix und stimuliert die Schlüsselenzyme des Citratzyklus. 2. Fettsäuren und Glucose sind unter Ruhebedingungen Hauptsubstrat des Herzens und werden im Citratzyklus zu  $H_2O$  und  $CO_2$  abgebaut. 3. Im Citratzyklus findet die Endoxidation der Nahrungsmittel statt, dabei freiwerdende Elektronen werden auf die Reduktionsäquivalente  $NAD^+$  und  $FAD$  (hier nicht abgebildet) übertragen. 4. Die Reduktionsäquivalente geben ihre Elektronen an die Atmungskette ab und werden in mehreren energieliefernden Redoxreaktionen auf Sauerstoff übertragen. 5. Die Energie aus den Redoxreaktionen wird genutzt, um Protonen aus der Matrix zu pumpen, dabei entsteht ein Membranpotenzial, welches die Treibkraft für die  $F_1F_0$  ATPase ist. 6. An der Atmungskette entstehen Superoxidradikale, die durch die SOD zu  $H_2O_2$  dismutiert werden. 7.  $H_2O_2$  wird über das Thioredoxin System (Oxidation von Thioredoxin (TRX) durch eine Peroxiredoxin (PRX)

und Reduktion durch die Thioredoxinreduktase (TR)) oder das Glutathion System (Oxidation von Glutathion (GSH) durch die Glutathionperoxidase (GPX) zu Glutathiondisulfid (GSSG) und Reduktion durch die Glutathionreduktase (GR)) zu  $H_2O$  entgiftet. Beide Systeme werden durch NADPH regeneriert. NADPH wird wiederum durch drei Enzyme regeneriert, das Malatenzym (MEP), die Isocitratdehydrogenase (IDHm) und die Transhydrogenase (Nnt). 8. Die Transhydrogenase ist wie die  $F_1F_0$  ATPase an das Membranpotential gekoppelt.

### 3.3.5 Sauerstoff

*"Oxygen is hailed as Elixir of Life - a wonder tonic, a cure for ageing, a beauty treatment and a potent medical therapy. It is also purported to be a fire hazard and a dangerous poison that will kill us in the end."* (Lane 2002)

Sauerstoff ist ein besonderes Molekül für das Leben auf der Erde. Bis auf ein paar anaerobe Organismen brauchen alle Lebewesen Sauerstoff für die Bereitstellung von Energie, welche durch die Übertragung von Elektronen entlang der Atmungskette auf Sauerstoff erfolgt. Dies erscheint seltsam, denn Sauerstoff ist ein giftiges Gas (Gerschman et al. 1954). Aerobe Organismen überleben daher nur, weil sie antioxidative Schutzstrategien entwickelt haben. Dabei lag die Konzentration von Sauerstoff in unserer Atmosphäre nicht immer bei 21%. Vor ca. 2,2 Milliarden Jahren entwickelten sich Prokaryonten namens Cyanobakterien, die mit der Energie der Sonne  $H_2O$  zu Sauerstoff und Wasserstoff spalten konnten. Diesen Prozess nennt man Photosynthese. Aufgrund der steigenden Konzentration von Sauerstoff bildete sich in der Folge die Ozonschicht ( $O_3$ ), welche schädliche Ultraviolette Strahlung absorbierte und das Leben an Land möglich machte. Viele Mikroorganismen starben durch den giftigen Sauerstoff aus, andere entwickelten Schutzstrategien und konnten sich in einem zweiten Schritt den Sauerstoff zu Nutze machen. Daraus wurde ein hocheffizientes System zur Energiebereitstellung (Lane 2002; Halliwell & Gutteridge 2007). Mitochondrien, die der Inbegriff dieses effizienten Systems zur Energiegewinnung sind, entstanden aus dem Verschlingen eines Alpha Proteobacteriums durch einen eukaryotischen Progenitor (Lane & Martin 2010). Diese Symbiose ermöglichte die Entwicklung vielzelliger Organismen und ist die Grundvoraussetzung für energiehungrige Organe wie das Herz (Lane 2006).

### 3.3.6 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Nitrogen Spezies (RNS)

*“All aspects of aerobic life involve free radicals and antioxidants—you cannot escape them, nor should you wish to.”* (Halliwell 2006)

Der Begriff Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet eine Gruppe von Molekülen und freien Radikalen (freies ungepaartes Elektron), die von Sauerstoff abstammen. Sauerstoff ist ein Bi-Radikal, da es zwei ungepaarte Elektronen in der äußeren Hülle hat (auch "triplet state"). Dadurch, dass beide Elektronen den gleichen Spin haben, kann Sauerstoff nur mit einem Elektron reagieren und ist aus diesem Grund nicht sehr reaktiv mit diesen zwei chemisch gebundenen Elektronen. Aber sobald eines der Elektronen angeregt wird und seinen Spin verändert, entsteht ein reaktives Oxidant (single oxygen). Insbesondere an Doppelbindungen kann es zur Reduktion von Sauerstoff durch ein Elektron kommen und es entstehen relativ stabile Intermediate, die Superoxid Anionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), welche die Ausgangsradikale für die Entstehung anderer Radikale sind (Turrens 2003). Superoxid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) dismutiert spontan oder durch die Superoxiddismutase zu Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird entweder vollständig zu Wasser reduziert oder nur teilweise, dann entstehen Hydroxylradikale ( $\text{OH}\bullet$ ) in der Fenton Reaktion. Hydroxylradikale sind sehr reaktive kurzlebige Radikale, ihre Entstehung wird durch Metalle, vor allem Eisen, katalysiert. Dabei wird Eisen zunächst aus Eisenschwefelclustern durch Superoxid freigesetzt (Liochev & Fridovich 1999). Eine mitochondriale Eisenüberladung führt über eine vermehrte Entstehung von Hydroxylradikalen zu einer Kardiomyopathie (Gao et al. 2009; Gao et al. 2010). Zudem kann Superoxid auch mit anderen Radikalen wie Stickstoffmonoxid (NO) reagieren, wobei "reactive nitrogen spezies" (RNS) entstehen. Diese Reaktion wird durch die Diffusionsraten dieser beiden Radikale kontrolliert; als Produkt entsteht Peroxynitrit, ein ebenfalls sehr potentes Oxidant (Radi et al. 2002).

### 3.3.7 Oxidativer Stress

*“Living with the risk of oxidative stress is a price that aerobic organisms must pay for more efficient bioenergetics”* (Skulachev 1996).

Oxidativer Stress darf nicht als bloßer Anstieg der Formation von Sauerstoffradikalen begriffen werden, vielmehr beschreibt er eine Imbalance zwischen Formation von Sauerstoffradikalen und ihrer Entgiftung durch die antioxidativen Systeme (Sies 1997). Dieser Zusammenhang wird in vielen Studien vergessen (Aon et al. 2010). Ob eine Imbalance entsteht, hängt zudem wesentlich von räumlichen und zeitlichen Anpassungsprozessen der Formation und Entgiftung ab. Natürlicherweise scheint stets eine geringfügige Imbalance zugunsten der ROS Formation zu bestehen, die zu kontinuierlich entstehenden oxidativen Schäden führt (Venditti et al. 2013). Dennoch sollte oxidativer Stress nicht *per se* als schädlich betrachtet werden, denn er erfüllt eine Reihe wichtiger Aufgaben im Organismus, wie beispielsweise als potentes Signalmolekül (Dröge 2002) oder für die körpereigene Abwehr (Segal 2005). Ristow et al. schlägt das Konzept der Mitohormesis vor, wonach ROS essentielle Signalmoleküle darstellen, um metabolische Gesundheit und Langlebigkeit herbeizuführen (Ristow & Schmeisser 2011). Unterstützt wird das Konzept durch neuere Studien, die zeigen, dass Antioxidantien Trainingseffekte bei Sportlern unterdrücken (Ristow et al. 2009; Paulsen et al. 2014). Im Herzen und anderen Organen weiß man, dass eine Ischämische Präkonditionierung durch kurze Ischämien ein ROS abhängiger Mechanismus ist, der vor einem Zellschaden durch längere Phasen von Ischämie schützt (Baines et al. 1997; Vanden Hoek et al. 1998).

Ein unkontrollierter Anstieg von oxidativem Stress schädigt jedoch Proteine (Stadtman & Levine 2000), ungesättigte Fettsäuren in Membranen (Kettenreaktionen von Lipidperoxidationen) (Rubbo et al. 1994), Kohlenhydrate und die DNA (Strangbrüche und Mutationen) (Richter et al. 1988; Halliwell & Gutteridge 2007; Kehrer 1993). Die Schädigung der mitochondrialen DNA (mtDNA) unterliegt aufgrund ihrer Rolle in Alterungsprozessen einem besonderen Interesse (Indo et al. 2007; Barja 2004). Die mtDNA liegt räumlich sehr nah am Ort der Formation von ROS (Richter et al. 1988) und RNS (Grishko et al. 1999) und ist besonders ungeschützt durch das Fehlen der stabilisierenden Histone. Die so verursachten Schäden in der mtDNA (de Souza-Pinto et al. 2001) führen zu einer Verschlechterung der ETC Funktion mit erhöhter ROS Formation und sind wahrscheinlich ursächlich für den Abfall der physiologischen Leistungsfähigkeit im Alter (Indo et al. 2007; Corral-Debrinski et al. 1992). Der Prozess führt zudem zu einem Teufelskreis aus durch ROS verursachten Schäden, welche ihrerseits zu einer vermehrten ROS Entstehung führen (Lenaz 1998). Eine Durchbrechung dieses Teufelskreises gelang Pohjoismäki et al. durch eine

Überexpression eines die mtDNA schützenden Proteins, welche SOD-/+ Mäuse vor der Entwicklung einer Kardiomyopathie schützte (Pohjoismäki et al. 2013).

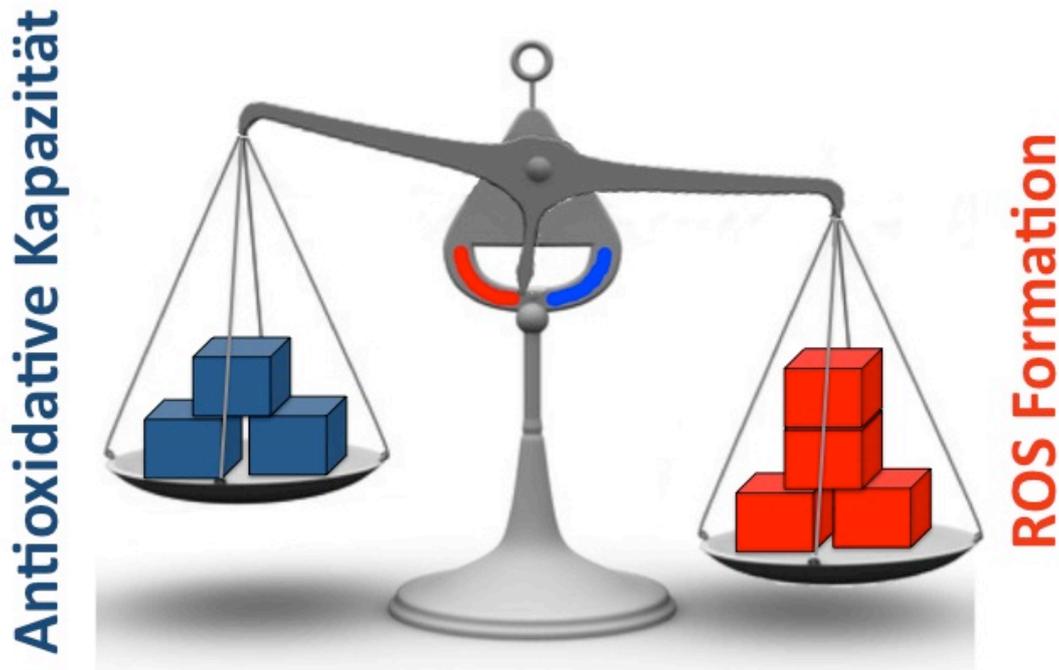


Abbildung 3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist eine Imbalance zwischen Entgiftung und Formation von ROS. Übermäßige Formation von ROS oder/und Verminderung der antioxidativen Kapazität führen zu oxidativem Stress. Ein geringes Maß an oxidativem Stress ist physiologisch, übermäßig führt oxidativer Stress zu Zellschäden bis hin zur Apoptose und Nekrose.

### 3.3.8 Die Atmungskette als Quelle von ROS

*"Oxygen is not reactive in the absence of single-electron donors (hence its accumulation in the air); but single-electron donors are ubiquitous in mitochondria, making them anything other than protective."* (Lane & Martin 2010)

In lebenden Organismen stellen Sauerstoffradikale ein Nebenprodukt des normalen zellulären Stoffwechsels dar. So wird angenommen, dass ca. 0.2% des Sauerstoffverbrauchs auf eine physiologische Generation von Superoxid fallen (Balaban et al. 2005). In Zellen entstehen ROS an vielen unterschiedlichen Orten: Im

Zytosol, den Peroxisomen, an den Membranen der Zelle, und in der Matrix und der Membran des Mitochondriums (Andreyev et al. 2005; Jezek & Hlavatá 2005; Brand et al. 2004). Vieles spricht für die Mitochondrien und ihre Atmungskette als führende Quelle für die Formation von ROS in den meisten Geweben (Lambert & Brand 2009; Turrens 2003).

Bei Andreyev et al. werden die neun bekannten Enzyme, an welchen im Mitochondrium ROS entstehen können, sehr passend als die neun "Nazgûl" aus dem berühmten Roman „Herr der Ringe“ von J.R.R. Tolkien beschrieben. Dieser Vergleich spiegelt die schwere Fassbarkeit ihres relativen Beitrags zur ROS Produktion wieder. Diese schwere Fassbarkeit besteht aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression in unterschiedlichen Geweben und aufgrund dynamischer energetischer Bedingungen. Somit ist es schwer oder sogar unmöglich, eine "Haupt-"Quelle für mitochondriale ROS zu definieren (Andreyev et al. 2005). Aber dennoch zählen Komplex I (Turrens et al. 1980; Liu et al. 2002; Kushnareva et al. 2002) und III (Loschen et al. 1971), die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase (mGPDH) (Orr et al. 2012) und neuerdings auch Komplex II (Quinlan et al. 2012) zu den entscheidenden Quellen (Venditti et al. 2013). Komplex III produziert insbesondere ROS nach Hinzugabe von Antimycin A (Liu et al. 2002).

Der präzise Mechanismus der Sauerstoffradikalformation ist unbekannt. Dennoch lässt sich die globale Formation von ROS ( $Q_{ROS}$ ) durch eine einfache Formel beschreiben:

$$Q_{ROS} = \sum_{site+n}^{site} (K_{Oxsite} E_{Oxsite} \{site\}) \times P_{O_2} \text{ (Balaban et al. 2005)}$$

$E_{ox}$  ist die treibende Kraft für die Reduktion von Sauerstoff.  $E_{ox}$  kann geschätzt werden als die Differenz zwischen dem Redoxpotenzial für die Übertragung von einem Elektron auf Sauerstoff (-160 mV) und dem Redoxpotenzial des bestimmten Elektronendonors am Reaktionsort. Wichtig ist zudem der Sauerstoffpartialdruck ( $p_{O_2}$ ) und die Reaktionskonstante 1. Ordnung ( $K_{ox}$ ) (Balaban et al. 2005). Eine Erhöhung des Faktors  $K_{ox}$  der Atmungsketten-Komplexe, was zu einer vermehrten Radikalformation führt, ist beispielsweise durch ein Mismatch der mitochondrial-

codierten Atmungsketten Bestandteile mit den nukleär-codierten Bestandteilen denkbar. Nach Lane müssen diese optimal aufeinander abgestimmt sein, um einen ungestörten Elektronenfluss -also einen niedrigen Faktor  $K_{ox}$ - zu garantieren (Lane 2012; Lane & Lane 2011).

Veränderungen des Faktors  $E_{ox}$  werden durch Veränderungen des Redoxstatus der jeweiligen Komponente erzeugt. Ein einfaches Beispiel sind die Blocker der Atmungskette, die zu einer Erhöhung des  $E_{ox}$  vor dem geblockten Bereich führen (Loschen et al. 1971). Ein anderes Beispiel für die Erhöhung des Faktors  $E_{ox}$ , welches bei der Herzinsuffizienz eine Rolle spielt (Molyneux et al. 2008), ist der Mangel an Coenzym  $Q_{10}$ . Coenzym  $Q_{10}$  ist wichtig für den Elektronentransport zwischen Komplex I/II und III. Ein Mangel an Coenzym  $Q_{10}$  führt zur vermehrten Formation von Superoxidradikalen (Quinzii et al. 2010).

Zu einer Erhöhung von  $E_{ox}$  und somit zur Formation von Superoxid an den Komplexen der ETC kommt es insbesondere dann, wenn Substrat (Fettsäuren, Glucose) verfügbar ist, aber die Energienachfrage fehlt, denn dann ist die Atmungskette stark reduziert (Korshunov et al. 1997). Diese experimentelle Bedingung an isolierten Mitochondrien nennt man "state 4 respiration", dieser metabolische Zustand lässt sich aber nicht auf das Herz übertragen, denn hier besteht eine dauerhafte Energienachfrage (Kohlhaas & Maack 2013). Unter "state 4 respiration" ist der Redoxstatus des Mitochondriums maximal reduziert (Aon et al. 2010) und die Wahrscheinlichkeit von Elektronenübertragungen auf Sauerstoff ist erhöht. Die Superoxidradikalproduktion an der ETC nimmt zu (Starkov & Fiskum 2003; Balaban et al. 2005). Wenn die Energienachfrage steigt, fällt ADP an, diese beschleunigt die Atmung und oxidiert die ETC (Abnahme von  $E_{ox}$ ). Die Elektronenübertragung ist nun wieder auf den dafür vorgesehenen Ort, Komplex IV (Cytochrome oxidase) der ETC fokussiert, wo  $O_2$  zu  $H_2O$  reduziert wird. Die Superoxidformation an Komplex I und III ist unter diesen Umständen wieder auf niedrigem Niveau.

### 3.3.9 Das antioxidative Schutzsystem

Um zelluläre Schäden durch Sauerstoffradikale zu minimieren, hat die Evolution ein hocheffizientes Schutzsystem hervorgebracht (Yu et al. 1994). Superoxid wird sehr

schnell durch die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid dismutiert. Wasserstoffperoxid wird über die Glutathionperoxidase (GPX) (Wu et al. 2004), die Katalase (Kirkman & Gaetani 1984) und Peroxiredoxin (PRX) zu Wasser entgiftet. Diese Enzyme benötigen zur Regeneration NADPH-abhängige Enzyme wie die Glutathionreduktase (GR) und die Thioredoxinreduktase (TR) (Ying 2008). Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von NADPH bei der Entgiftung von ROS. NADPH wird im Mitochondrium durch drei Enzyme regeneriert. Dazu gehören die NADP<sup>+</sup> abhängige Isocitratdehydrogenase (IDH<sub>m</sub>), das NADP<sup>+</sup> abhängige Malatenzym (MEP) und die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) (Rydström 2006; Vogel et al. 1999; Kohlhaas & Maack 2013).

### 3.3.10 „Redox-optimized ROS Balance“

Durch drei mitochondriale Redoxstatus (reduziert, oxidiert und ausbalancierter Redoxstatus) lassen sich die vorangegangenen Abschnitte nach Aon et al. zusammenführen (Aon et al. 2010).

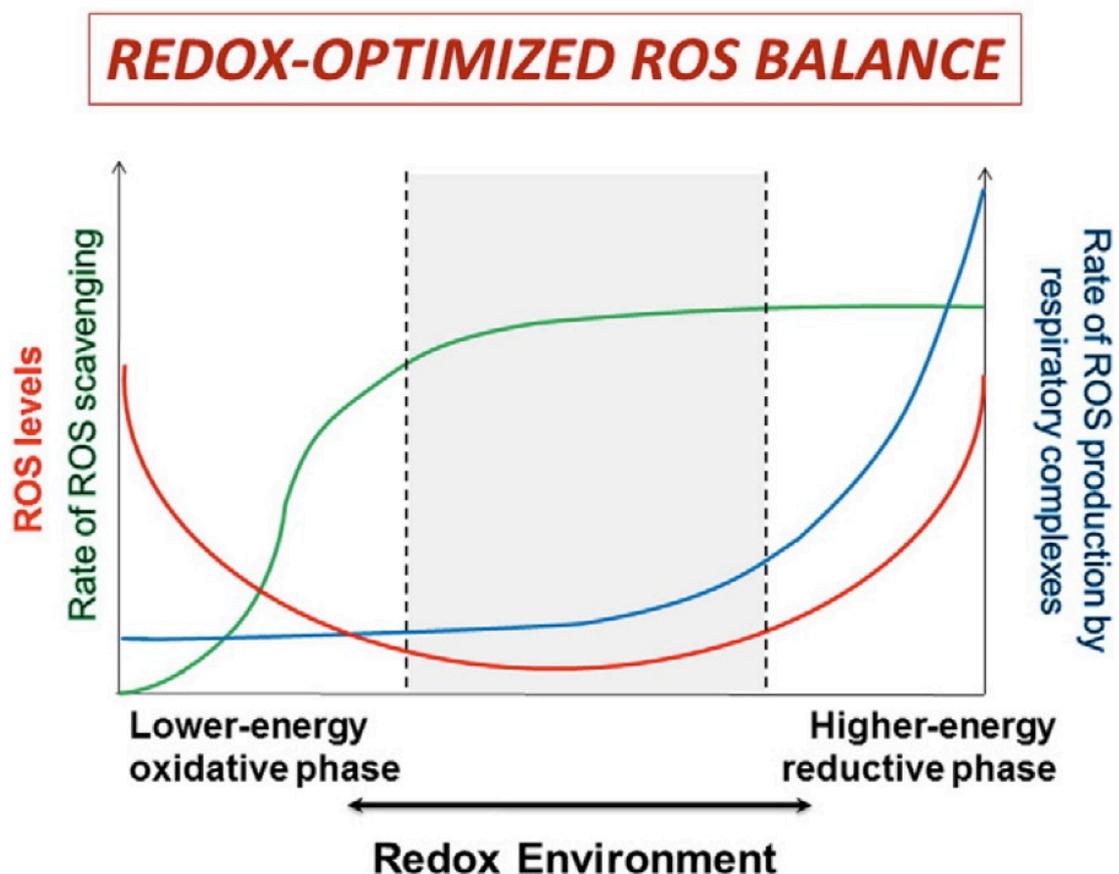


Abbildung 3a Redox optimized ROS balance nach Aon et al. (2010)777

Der Redoxstatus lässt sich durch die Verhältnisse von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  bestimmen. Der ausbalancierte Zustand der Redox Partner wird von Aon et al. als "redox optimized ROS Balance" (R-ORB) bezeichnet (grauer Bereich Abbildung 3a). In diesem Zustand werden nur minimale Mengen an ROS detektierbar und das Mitochondrium arbeitet unter optimalen Bedingungen. Wenn der Redoxstatus sich nun aber in den stark oxidierten Bereich oder in den stark reduzierten Bereich verschiebt, entstehen vermehrt ROS (rote Kurve in Abbildung 3a). Während im stark reduzierten Bereich die Formation von ROS an der ETC (blaue Kurve) die Entgiftungskapazität (grüne Kurve) übersteigt, ist in stark oxidierten Mitochondrien der Verlust der antioxidativen Kapazität die Ursache für oxidativen Stress (grüne Kurve) (Aon et al. 2010; Cortassa et al. 2014).

### 3.4 Die Nikotinamid-Nukleotid Transhydrogenase (Nnt)

Die Nikotinamid-Nukleotid Transhydrogenase (Nnt, E.C.1.6.1.2) ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Das Enzym katalysiert die Reaktion  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+$  (Kaplan et al. 1953). Da die beiden Reaktionspartner praktisch gleiche Standardredoxpotenziale haben, würde man erwarten, dass die Nnt  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  equilibriert. Durch die Kopplung an das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\psi_M$ ) besitzt die Nnt jedoch eine besondere Kinetik, die der Kinetik der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase ähnelt. Man unterscheidet zwei Reaktionen, die energiekonsumierende Vorwärtsreaktion, bei der  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  reduziert wird und die energiefreisetzende Rückwärtsreaktion, bei der  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert wird. Die Vorwärtsreaktion konsumiert Energie durch die Translokalisierung von Protonen in die Matrix, welche über die Atmungskette zuvor hinausgepumpt wurden. Die Rückwärtsreaktion stellt Energie durch Translokalisierung von Protonen aus der Matrix bereit. In energetisierten Mitochondrien findet bevorzugt die Vorwärtsreaktion statt und  $\text{NADP}^+$  wird reduziert (Lee & Ernster 1989; Earle et al. 1978). Dabei findet eine Konformationsänderung in der Nnt von einem inaktiven in einen aktiven Zustand mit Bindungsstellen für  $\text{NAD(H)}$  und  $\text{NADP(H)}$  statt, die sich auf der Matrixseite der inneren Membran (Pedersen et al. 2008; Rydström 2006; Bizouarn et al. 2002) befinden. Basierend auf Flux Studien in *C. elegans* wurde die Nnt als wichtigstes Enzym für die Reduktion von  $\text{NADPH}$  veranschlagt; sie leistet 45% des reduzierten  $\text{NADPH}$  Nachschubs. Andere mitochondriale Quellen sind die Isocitrat

Dehydrogenase (IDH<sub>m</sub>) und das Malatenzym (MEP<sub>m</sub>) (Sauer et al. 2004; Vogel et al. 1999).

### 3.4.1 Die Nnt-defiziente BL/6J Maus

Ein zunächst rätselhaftes vermehrtes Auftreten von Diabetes und einer Glukoseintoleranz in BL/6 Mäusen von Jackson Laboratories (BL/6J) konnte kausal mit einer fehlenden Nnt Aktivität in Verbindung gebracht werden (Freeman, Shimomura, et al. 2006). Hierzu wurden zunächst Quantitative Trait Locus (QTL) Analysen durchgeführt, die drei mögliche Genloci als mögliche Ursache identifizierten (Toye et al. 2005). Einer dieser fehlerhaften Genloci liegt auf Chromosom 13 und codiert für die Nnt. Durch den Verlust der Exons 7 bis 11 im Nnt Gen der BL/6J kann keine funktionstüchtige Nnt mehr exprimiert werden. Ein kausaler Zusammenhang konnte zum einen durch siRNA-induzierte knock-down in Insulin-sezernierenden Zellen gezeigt werden, auch diese entwickelten eine Glucose Intoleranz (Freeman, Shimomura, et al. 2006). Zum anderen wurde dies aber auch durch transgene Expression einer intakten Nnt in den BL/6J Mäusen gezeigt; diese Intervention rekonstituierte die Glucoseintoleranz (Freeman, Freeman, et al. 2006). Der pathophysiologische Mechanismus der Glucoseintoleranz konnte folgendermaßen erklärt werden: Die Insulinsekretion durch die  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas ist abhängig von der intrazellulären ATP-Konzentration (Maechler et al. 2001). Erreicht das Verhältnis von ATP/ADP hohe Werte (wie z. B. bei hohen Plasmakonzentrationen von Glukose, die zu einem erhöhten Substratangebot in den Mitochondrien führen), schließen sich die ATP-sensitiven Kaliumkanäle der Zellmembran; es kommt zur Depolarisation der Membran, zu Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Stimulation der Exozytose von in der Zelle gespeicherten Insulinvesikeln (Ashcroft & Rorsman 2004). In den BL/6J Mäusen tritt durch das Fehlen der Nnt vermehrt oxidativer Stress auf, welcher die Entkopplung des mitochondrialen Membranpotenzials durch Entkopplungsproteine (UCP2) triggert. Die Folge ist eine Dissipation des mitochondrialen Membranpotenzials. Dadurch kann keine ausreichende ATP/ADP Ratio mehr erreicht werden, um eine ausreichende Insulinsekretion hervorzurufen (Freeman, Shimomura, et al. 2006).

### 3.4.2 Die Nnt und das Herz

Über die Rolle der Nnt im Herzen ist wenig bekannt, obwohl die Nnt gerade dort in besonders hohen Konzentrationen vorliegt, bzw. besonders stark exprimiert wird. Daher wurden zur Untersuchung der Nnt durch Pioniere wie Kaplan und Ernester auch Mitochondrien aus dem Herzen benutzt. Es konnte gezeigt werden, dass nach einem genetischen Knock-Out der mitochondrialen Superoxiddismutase (Mn-SOD) die Lebenszeit durch eine dilatative Kardiomyopathie bei BL/6J Mäusen im Vergleich zu Mäusen mit einer intakten Nnt besonders verkürzt war. Die Mäuse mit einer intakten Nnt lebten ca. 14 Tage, die BL/6J Mäuse lebten nicht länger als 2 Tage, wobei >50% bereits intrauterin verstarben (Huang et al. 2006). Durch QTL Analysen konnte wiederum die Nnt als entscheidender Unterschied zwischen den Mauslinien festgestellt werden (Huang et al. 2006). Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist die Aktivität der Nnt im Myokard um 18% reduziert, was mit einer vermehrten Oxidation von NADPH in diesen Herzen assoziiert war (Sheeran et al. 2010).

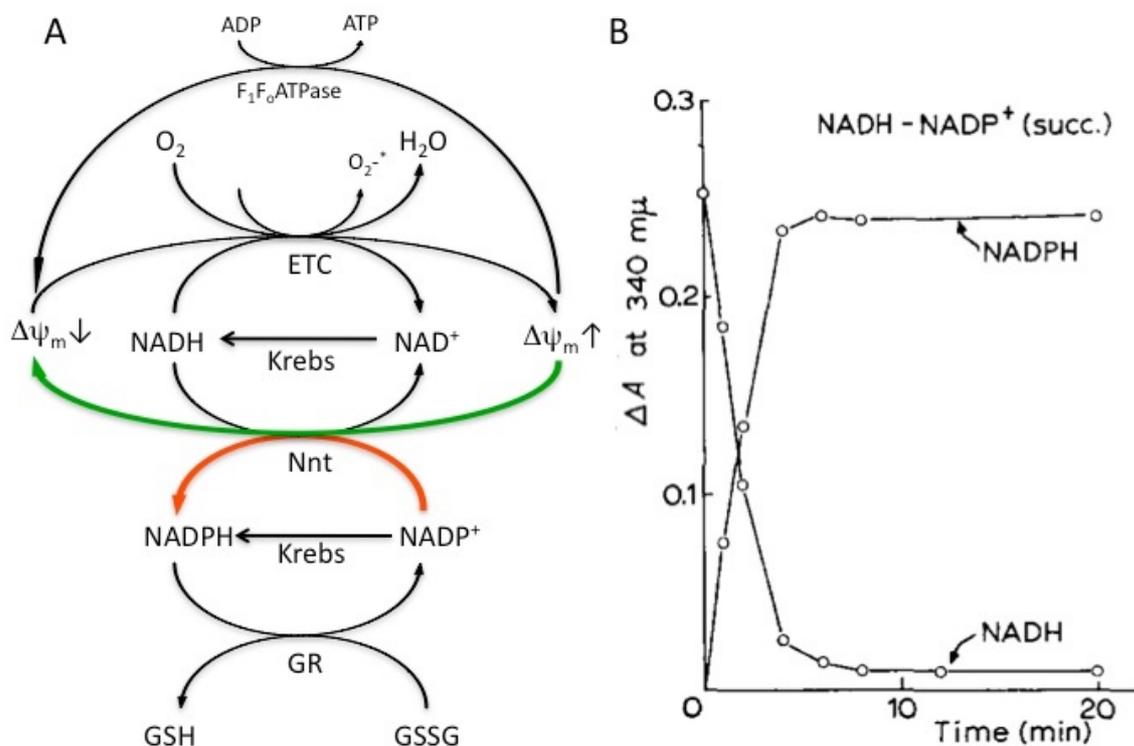


Abbildung 4 Vorwärtsreaktion der Nnt

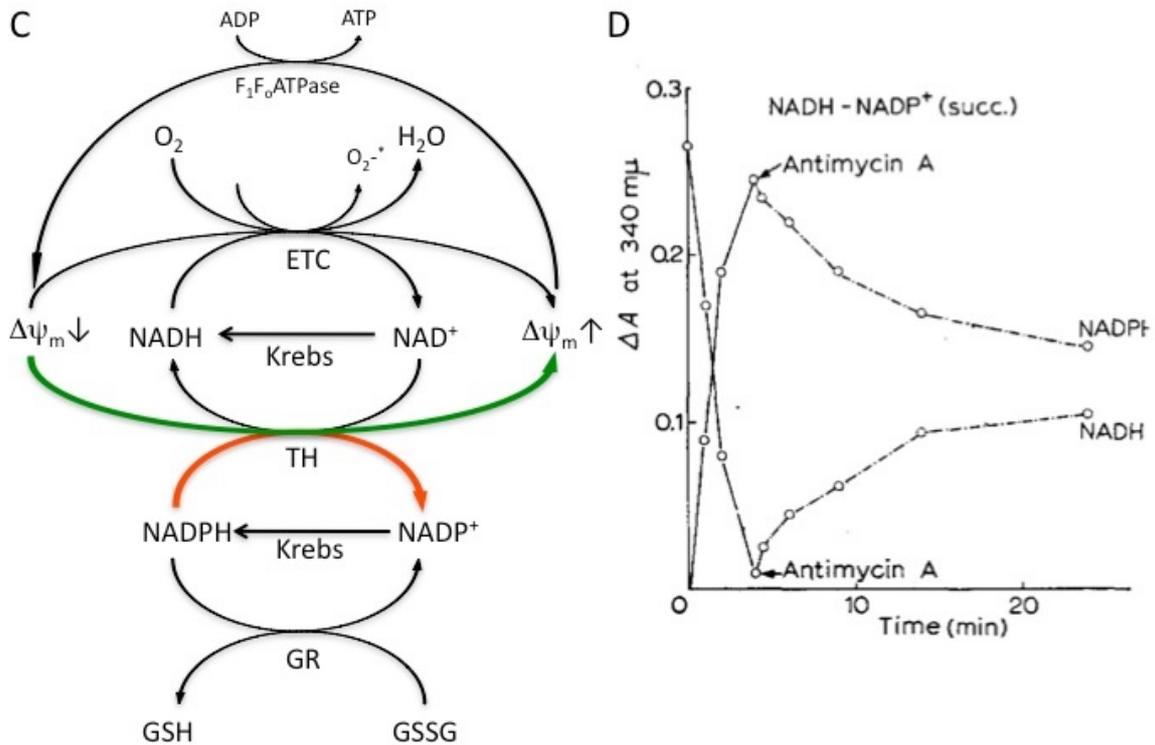


Abbildung 5 Rückwärtsreaktion der Nnt

Abbildung 4A und 5C stellen schematische Darstellungen der Vorwärts- und Rückwärtsreaktion in Zusammenschau der wichtigsten mitochondrialen Reaktionen unter den gegebenen Umständen dar. Abbildung 4B und 5D aus der Publikation von Lee und Ernster (Lee & Ernster 1989) zeigen an submitochondrialen Partikeln aus Rinderherzen den zeitlichen Verlauf der Vorwärts- 4B und Rückwärtsreaktion 5D der Nnt. In Abb. 4B werden die Mitochondrien mittels Succinat energetisiert, die gleichzeitige Hinzugabe von Rotenon verhindert die Oxidation von NADH über den Komplex I der Atmungskette. In den energetisierten Mitochondrien stellt sich rapide ein Gleichgewicht deutlich zu Gunsten von NADPH ein. Wird wie in Abb. 5D die Energetisierung (Aufbau eines mitochondrialen Membranpotenzials) durch Antimycin A gestoppt verläuft die Nnt Reaktion rückwärts ab. Es stellt sich ein neues Gleichgewicht ein. Die schematischen Darstellungen sind den Versuchsdarstellungen passend gegenübergestellt.

#### **4 ZIELE DER STUDIE**

Die Funktion der Nnt im Herzen ist unvollständig verstanden, obwohl die Nnt durch die Kopplung von NADH und NADPH und durch die Kopplung an das mitochondriale Membranpotenzial eine zentrale Stellung im mitochondrialen Energiestoffwechsel hat. Ziel der Studie ist es, ein besseres Verständnis über die Funktion der Nnt für die Regeneration von NADPH und der daran gekoppelten antioxidative Kapazität im Herzen zu erlangen.

Wir spekulieren, dass der Nnt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von NADPH in der mitochondrialen Matrix zukommt. Dies könnte insbesondere während erhöhter Lastbedingungen unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation in Kardiomyozyten der Fall sein.

Zur Erhöhung der Lastbedingungen werden isolierte Kardiomyozyten einem Stressprotokoll mit  $\beta$ -adrenerger Stimulation und hohen Stimulationsfrequenzen unterzogen.

## **5 MATERIAL UND METHODEN**

Bei der Messung von Sauerstoffradikalen gibt es folgende Punkte zu beachten. Sauerstoffradikale haben nur eine sehr kurze Halbwertszeit und es erfolgt eine schnelle Entgiftung durch zelluläre Abwehrsysteme. So steht jede Messmethode zur Bestimmung von Radikalen in Konkurrenz mit den endogenen Entgiftungsmechanismen. Die Interaktion von Messmethoden mit den Sauerstoffradikalen kann beispielsweise zu einer vermehrten Radikalproduktion führen. Die Differenzierung der Radikale ist bei den meisten Messmethoden ungenau (Chance et al. 1979).

### **5.1 Quantitative Messung von Superoxid am Luminometer**

Das Luminometer (Firma: Berthold, Model: Lumat IB 9507) misst Photonenemissionen, welche durch Chemolumineszenz und Biolumineszenz generiert werden, im Wellenlängenbereich zwischen 390nm-620nm mittels eines Photomultipliers. Die Chemolumineszenz entsteht durch die Reaktion von Lucigenin mit  $O_2^-$  Radikalen und als Signal vom Luminometer verstärkt und digital detektiert. Die angegebene Einheit ist RLU (= "relative light units"). Die RLU-Einheit gibt die direkt gezählten Impulse dividiert durch 10 und anschließend multipliziert mit dem gerätespezifischen RLU-Faktor an. Der RLU-Faktor ist ein Korrekturfaktor, der spezifisch für jedes Gerät ist und die individuellen Fluktuationen der Kathoden Sensitivität des Photomultipliers kompensiert, um die Vergleichbarkeit zwischen den Geräten herzustellen.

Gemessen wurde an homogenisiertem Rattenmyokard. Zur Gewinnung des Rattenmyokards wurden die männlichen Ratten mit einer intraperitonealen Applikation von Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100mg/kg) und Rompun® (Xylazinhydrochlorid 10 mg/kg) betäubt, nach Verlust der Schmerzreflexe wurden die Ratten auf der Operationsfläche fixiert, das Herz entnommen und in der Perfusionsanlage nach Langendorff mit einem auf 37°C erwärmten  $Ca^{2+}$ -freien Perfusionspuffer (siehe 5.3.8) für 10 min retrograd perfundiert, um die Koronarien von Blutbestandteilen freizuspülen. Hierzu wird die Aorta kanüliert, sodass die Perfusionslösung durch den Schluss der Aortenklappe mittels retrograder Perfusion in die Koronarien gelangt. Dieser Prozess

wird durch das Verblassen der epikardial gelegenen Koronarien sichtbar. Dabei ist darauf zu achten, dass die Aortenklappe bei der Kanülierung nicht beschädigt wird, denn andernfalls ist der Perfusionsdruck nicht ausreichend, um die Koronarien zu spülen.

Nach der retrograden Perfusion wird das Herz abgenommen und unter Kühlung das Herzgewebe mit einem Potter in einem Kalium-Phosphat-Puffer (siehe 5.3.8) mit einer „Complete“ Tablette (Protease Inhibitoren von Roche Diagnostics) bei 4°C homogenisiert. Bei diesem Vorgang wird die Integrität der Zellen zerstört, folglich stellt das entstehende Homogenat ein Gemisch aus Zellmembranbruchstücken, zerstörten und intakten Organellen und Zytoplasma dar. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat wird nach Lowry (Lowry et al. 1951) durchgeführt.

### **5.1.1 Lucigenin Assay**

Lucigenin ist ein häufig verwendeter Verstärker der Chemolumineszenz. Durch die aufeinanderfolgenden Reaktionen mit zwei Superoxidradikalen entsteht ein energiereiches Dioxetan, welches beim spontanen Rückfall in den Ruhezustand Photonen unterschiedlicher Wellenlänge emittiert (Y Li et al. 1998; Münzel et al. 2002). Lucigenin kann insbesondere in höheren Konzentrationen zu einem "Redox-Cycling" führen (Liochev et al. 1997). Bei Konzentrationen von 5 µM Lucigenin lassen sich qualitative Aussagen über die Beteiligung von Superoxidradikalen machen (Tarpey et al. 2004).

Es werden 0.5 mg/ml Protein pro Messung eingesetzt. Mit dem Kalium Phosphat Puffer wird auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt. Es werden 100 µl NADPH Puffer, 500 µl Lucigenin Puffer und 250 µl Probe in Kalium Phosphat Puffer in das Messröhrchen gegeben. Die Messröhrchen (12 x 75 mm Länge mit rundlichem Boden) werden in die Messkammer des Luminometers gestellt und es wird zunächst eine Bestimmung des Hintergrundsignals durchgeführt. Die kontinuierliche Messung erfolgt im "RATEMETER"-Modus. Nach fünf Messpunkten wird die Küvette entnommen und zur Sauerstoffaufsättigung mittels Vortexer durchmischt. Die Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Veränderung des Hintergrundrauschens durch eine elektrostatische Aufladung der Tubes aufgrund des

Vortexen konnte durch nasses Abstreifen der Tubes verhindert werden. Die gesamte Versuchszeit variierte zwischen 10 und 20 min. Es wurden Experimente mit Zugabe unterschiedlicher Substanzen durchgeführt. Die Experimente wurden in der Abwesenheit und Gegenwart folgender Substanzen durchgeführt (Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ ): NADH 100, NADPH 100, Apocynin 300, DPI 3, Antimycin 2, Rotenon 3.

Die Auswertung erfolgt mittels manueller Übertragung der Messwerte von einem Messpapiersteifen in das Statistikprogramm Excel (Microsoft Corporation). Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde das Statistikprogramm Prism 5 (GraphPad Software) verwendet.

### **5.1.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der verdünnten Homogenate wurde die Methode nach Lowry verwendet (Lowry et al. 1951). Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion. Durch die Reaktion zwischen den Peptidbindungen mit zweiwertigen Kupferionen entsteht in wässrig-alkalischer Lösung ein blauvioletter Komplex. Im zweiten Schritt wird das zweiwertige Kupfer zu einwertigem Kupfer reduziert und reagiert mit dem Folin Ciocalteu Reagenz. Es entsteht eine blaue Lösung, dessen Intensität bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer bestimmt werden kann. Anhand einer Eichkurve und Dreifachmessungen kann eine quantitative Aussage über die Proteinkonzentration getroffen werden (Lowry et al. 1951).

## **5.2 Photometer**

Mit einem Eppendorf-Photometer (Spectrophotometer, DU730 Beckman Coulter) werden Messungen zur Bestimmung der Kinetik von NAD(P)H durchgeführt. Die Extinktion von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde ein Extinktionskoeffizient von  $6.220 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet.

Das Myokard wurde wie unter Punkt 4.1.1 dargestellt vorbereitet und in einem Kaliumphosphat-Puffer gelöst. Die Proteinkonzentrationen wurden wie in Punkt 4.1.2 beschrieben bestimmt. Die Extinktionswerte mit ihrem zeitlichen Verlauf können vom Photometer auf einen PC übertragen werden und hier mittels Excel und Prism ausgewertet werden. In manchen Versuchen wurde zur Hemmung der Nikotinamid

Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) der Inhibitor NBD Chlorid (40  $\mu\text{M}$ ) verwendet (Persson et al. 1988; Sheeran et al. 2010).

### **5.3 Zellkontraktionsanlage**

Im Unterpunkt 4.3 werden Messungen an isolierten Kardiomyozyten beschrieben. Diese komplexe Methode erfordert die Beschreibung unterschiedlicher Anlagen und Schritte. Der erste Schritt ist die Isolation intakter Kardiomyozyten. Der zweite Schritt ist die Erstellung eines Protokolls, mit Festlegung von Stimulationsfrequenzen und Infusionszeitpunkten bestimmter Lösungen. Der dritte Schritt ist die Vorbereitung der Zellen und ggf. Inkubation mit unterschiedlichen Farbstoffen. Der vierte Schritt ist die Verwendung der IONOPTIX Anlage mit Mikroskop, Laser, Lichtfilter, Stimulation, Zellkammer, Absaugung und Infusionssystem. Der letzte Schritt ist die Datenverarbeitung, wobei die Systemsoftware von Ion Optix, aber auch Microsoft Excel und Prism verwendet werden.

#### **5.3.1 Zellisolation**

Die Isolation intakter Kardiomyozyten aus einem Maus Herzen erbrachte eine Ausbeute von ca. 1 Millionen „Baumstamm“-förmiger („rod-shaped“) Zellen pro Herz. Es wird das sog. „AfCS-Protokoll“ (AfCS Procedure Protocol PP00000125) in modifizierter Form verwendet.

Zunächst erfolgte hierfür die Vorbereitung des Perfusionspuffers, des Myozyten Verdauungspuffers, des Myozyten Stop Puffers 1 und 2, des Myozyten Ausplattier-Mediums, des Myozyten Kulturmediums; und der Laminin bedeckten Schalen. Perfusionspuffer und Verdauungspuffer sollten vor Gebrauch auf 37°C erwärmt werden. Das Ausplattieren im Kulturmedium erfolgt bei 37°C und 2% CO<sub>2</sub> in einem speziellen Zell-Inkubator für ca. 2 h.

Die Perfusionsapparatur besteht aus der Kanüle, an die das Herz zur Perfusion angehängt wird, aus einem gewärmten Zylinder, der während der Perfusion das Herz umgibt und vor Kühlung von außen schützt und zwei Kolben mit spiralförmigen Glaskapillaren zum Erwärmen der Perfusions- und Verdauungslösung. Diese Kolben dienen zum Wärmen der Lösungen. Zwei Pumpsysteme werden für den

kontinuierlichen Fluss während des Perfusionsvorganges verwendet. Ein Dreiwegehahn ist der Aufhängung vorgeschaltet und ermöglicht das Umschalten zwischen Perfusionspuffer und Verdauungspuffer.

Zur Vorbereitung der Perfusionsapparatur erfolgt die Erwärmung des Wasserbads (37°C). Die Flussgeschwindigkeit der Perfusionsanlage beträgt ca. 3 ml/min. Zunächst wird das System mit 100 ml AquaDest und anschließend für 5 min mit Perfusionspuffer gespült. Ein Kolben wird mit Verdauungspuffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Herzentnahme wurde der Maus 0.1 mg Heparin gelöst in Phosphatpuffer (PBS) intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde mit dreiprozentigem Isofluran und 100% O<sub>2</sub> in einer Kammer anästhesiert. Nach Eintreten der Narkose wurde sie in den Operationsbereich verbracht und dort weiter mit Isofluran mit Hilfe einer Maske begast. Die Isofluran-Narkose wurde vertieft und die Narkosetiefe klinisch geprüft, wobei Bewegungen der Maus eine zu schwache und eine irreguläre Atmung eine zu starke Narkose indizierten. Nach Ausfall der Schmerzreflexe wurden die Peritonealhöhle und das Diaphragma mit einer kleinen Schere eröffnet. Durch das Anheben des Thorax mit einer Pinzette war der Blick auf das schlagende Herz frei. Nun konnte das Herz vorsichtig angehoben und nach Identifikation der Pulmonalarterien diese durchschnitten werden, damit die Aorta leichter identifiziert werden konnte. Die Aorta wurde etwa 0.5 cm vor ihrem Eintritt in das Herz durchschnitten. Das Herz wurde in einer 60 mm Petrischale mit Perfusionspuffer unter einem OP-Mikroskop kanüliert und durch Umschlingen der Kanüle mit einem Faden fixiert. Hierbei war die Lage der Kanüle vor der Aortenklappe wichtig, damit das Herz retrograd über die Koronarien perfundiert werden konnte.

Das kanülierte Herz konnte nun an die Perfusionsanlage gehängt werden und für vier Minuten mit dem Perfusionspuffer perfundiert werden, um das restliche Blut aus den Koronarien zu spülen. Ebenfalls wurde das extrazelluläre Ca<sup>2+</sup> herausgespült, um die Kontraktion zu stoppen. Über den Dreiwegehahn erfolgte der Wechsel auf den Verdauungspuffer, um das Herz für weitere acht bis zehn Minuten zu perfundieren. Die Verdauungszeit konnte von Herz zu Herz leicht variieren. Wenn die Perfusion des Herzens während der enzymatischen Verdauung gut war, schwoll das Herz an und

wurde etwas fahl, sodass man die Separation von einzelnen Muskelfasern beobachtet werden konnte.

Nach abgeschlossener Verdauung konnte das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Kanüle steril heruntergeschnitten werden. Das Herz wurde in eine 60 mm-Schale mit 2.5 ml Verdauungspuffer gesetzt. Von nun an wurde unter einer sterilen Arbeitsbank gearbeitet. Das Herz wurde in zwei Hälften geschnitten und vorsichtig mit einer Pinzette zerteilt. Anschließend wurde es mit einer sterilen Transfer-Pipette (2 mm Öffnung) mehrere Male pipettiert. Dieser Prozess dauerte 60 bis 90 s. Die zellhaltige trübe Flüssigkeit wurde in ein 15 ml Röhrchen transferiert. Mit „Stop-Puffer 1“ wurde das Röhrchen auf 5 ml aufgefüllt. Der Stop Puffer 1 sorgte dafür, dass die Proteasen inaktiviert wurden und somit die Verdauung gestoppt wurde.

Innerhalb von zehn Minuten bildete sich ein Sediment, dessen Überstand abgenommen wird und in einem neuen Falcon-Röhrchen für eine Minute mit 1000 rpm zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Die beiden Pellets wurden mit Stopp-Puffer zweimal resuspendiert und in eine 66 mm-Schale überführt, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau durchzuführen. Alle vier Minuten wurde hierfür die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht. Erst wurden 100  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (10 mM), dann erneut 100  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (10 mM) und danach 30  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (100 mM) und schließlich 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (100 mM) hinzugefügt. Am Ende war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1 mM erhöht worden.

Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, erneut für zehn Minuten ruhen gelassen und der Überstand abgenommen. Dieser wurde eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Der neue Überstand wurde verworfen. Die beiden Pellets wurden mit insgesamt 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine Dichte von 25.000 Zellen/ml mit Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 2%  $\text{CO}_2$  aufbewahrt.

### **5.3.2 Messprotokoll an der Einzelzellkontraktionsanlage**

Zunächst wurden die Messkammern vorbereitet. Die Messkammer wurde zur Dichtigkeit ringsherum mit einem dünnen Streifen Silikonpaste umspritzt. Anschließend konnte die Kammer mit einem Deckgläschen verschlossen werden. Auf

das Deckgläschen wurde Laminin gegeben, welches im Versuch die Haftung der Zellen auf dem Deckgläschen garantieren sollte. Nach ca. drei Minuten konnten die Zellen in die Messkammer gegeben werden. Diese benötigen ca. fünf Minuten, um sich abzusetzen und an das Laminin anzuhafte, bevor eine Messung möglich war.

Das Objektiv wurde nun geölt und die Messkammer in das Mikroskop eingesetzt. An die Messkammer wurden die Heizungsdrähte und Temperaturfühler angeschlossen, um während der Messung eine Temperatur von ca. 37°C zu erreichen. Es wurden der Schlauch für den Lösungseingang und der Schlauch für den Lösungsausgang fixiert. Wichtig war hierbei, dass der Flüssigkeitsspiegel konstant blieb, um nicht artifizielle Schwankungen in den Messungen hervorzurufen. Als letzter Schritt wurden die Stimulationselektroden angeschlossen.

Nun konnte das Objektiv vorsichtig an die Messkammer herangefahren werden. Eine Zelle wurde im Sichtfeld eingestellt und die Stimulation eingeschaltet. Es wurde mit einer niedrigen Stromstärke (ca. 3 mA) begonnen und diese langsam erhöht, um die Zellen bei möglichst niedriger Stromstärke (A) zu stimulieren. Nun konnte der Fluoromat (Fluro System Interface) eingeschaltet werden und die Messung begonnen werden.

Zunächst begann die Vorphase des Protokolls mit einer Stimulation von 0.5Hz für ca. 60s unter ständigem Zulauf der Tyrode. Dann wurde Isoprenalin (30 nM) eingewaschen. An der PC-basierten Auswertung der Sarkomerverkürzung mittels CCD Kamera erkennt man den Beginn der Isoprenalinwirkung an der Zunahme der Amplitude der Sarkomerverkürzung. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Stimulationsfrequenz für drei Minuten auf 5Hz erhöht, um eine physiologische Zunahme der Arbeit zu simulieren. Dann wurde Isoprenalin mit der Tyrode ausgewaschen und eine Erholungsphase bei einer Stimulation von 0.5Hz für eine Minute durchgeführt. Je nach erfolgter Messung wurde nun eine Kalibrierung mit abschließender Hintergrundmessung nach Wegspülen der Zelle durchgeführt. Eine Kalibrierung des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub>/FAD erfolgt durch das Einwaschen von zunächst FCCP (6 µM) und anschließend von Cyanid (4 µM). Nach einer DCF-Messung wurde zuletzt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) zur Kalibrierung eingewaschen. Bei den Messungen mit Mitosox wurde Antimycin (2 µM) zur Kalibrierung verwendet.

Nach abgeschlossener Messung wurde die Messkammer ausführlich gespült, um alle Zellgifte vor der nächsten Messung zu entfernen.

Zur Durchführung der Messungen wurde das Fluoreszenz-Setup der Firma ION OPTIX verwendet (Abb. 7). Die Kardiomyozyten wurden mittels einer CDD-Kamera (Myocam) am Inversionsmikroskop (Nikon Eclipse TE200-U) in ein Computerprogramm (IONWizard Acquire Version 4.) projiziert, welches die Sarkomerlänge bestimmen kann.

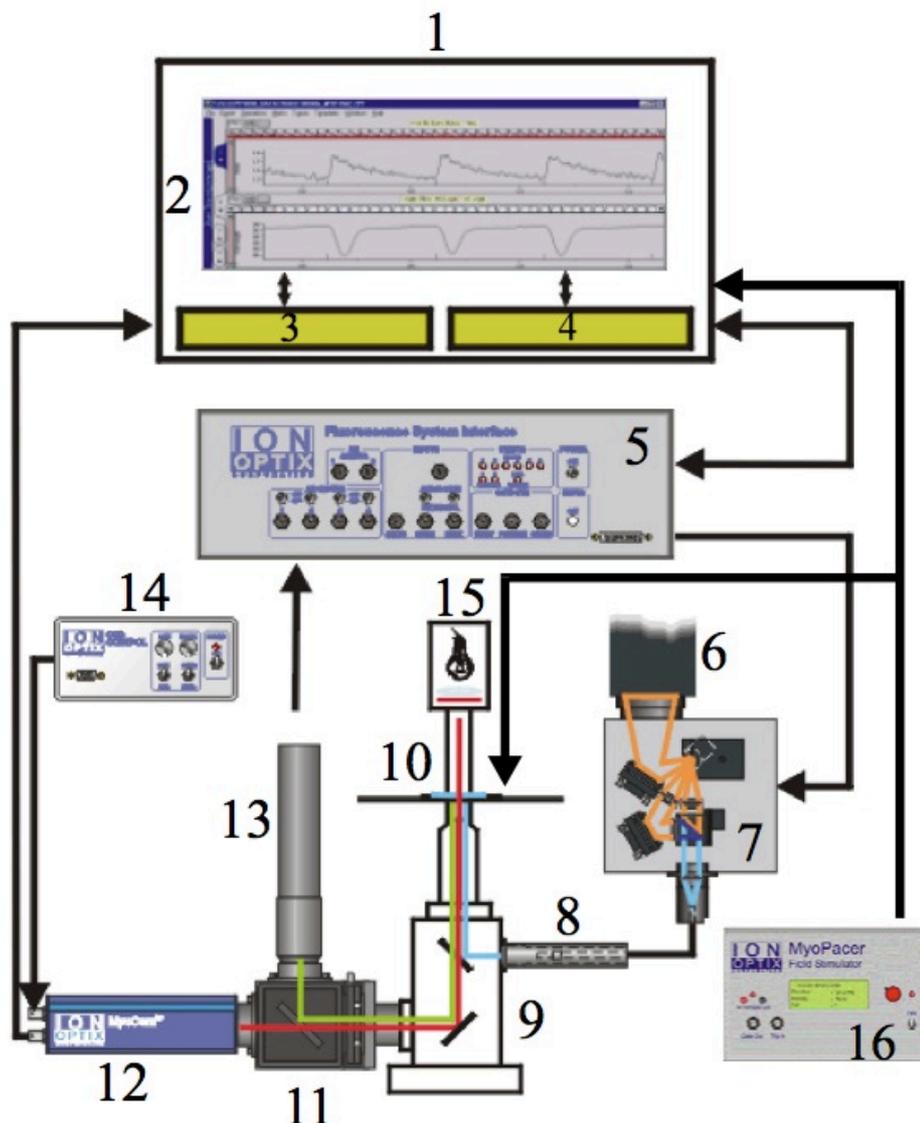


Abbildung 6 Schema des Epifluoreszenz-Setups

Diese Abbildung zeigt schematisch das Fluoreszenz-Setup nach ION OPTIX modifiziert von M. Kohlhaas (Kohlhaas 2007). Die schwarzen Pfeile deuten die Vernetzung der Geräte untereinander an. Die blaue Linie stellt das Anregungslicht und die grüne Linie das Emissionslicht dar. Die rote Linie stellt das Durchlicht dar, welches von der Kamera aufgenommen wird. 1. Computer; 2. Computerprogramm IONWizard; Wandler: 3. „Frame Grabber“ und 4. „Digital IO“; 5. Fluoreszenz System Interface; 6. UV-Lichtquelle; 7. Hyper-

Switch; 8. Lichtleitereinkoppler; 9. Mikroskop Nikon Eclipse TE 2000; 10. Messkammer (s. Abb. 2.13); 11. Zell-Frame-Adapter; 12. CCD Kamera; 13. Photomultiplier eins bis drei; 14. Energiezufuhr & Regulationseinheit für die Kamera; 15. Durchlichtquelle; 16. Stimulationsgerät

### 5.3.3 NADH/NADPH und FAD Messungen

Die Autofluoreszenzen von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>/FAD wurden bei Excitationswellenlängen von 340 nm und 485 nm angeregt, was zur Emission einer Fluoreszenz bei den Wellenlängen von 450 nm und 525 nm für reduziertes NAD(P)H bzw. oxidiertem FAD führte. Die Kalibrierung erfolgte mit FCCP (6 µM) und Cyanid (4 µM) (Eng et al. 1989).

### 5.3.4 Bestimmung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit Indo-1 AM

Das Medium mit Kardiomyozyten wurde in eine mit Laminin beschichtete Messkammer gegeben, und die Zellen mit dem Ca<sup>2+</sup>-Fluoreszenzfarbstoff Indo-1AM (10 µM) für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Anschließend konnte die Versuchskammer mit den Myozyten in die Halterung im Mikroskop eingespannt werden und der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff, der nicht von den Zellen aufgenommen worden war, für mindestens fünf Minuten mit Messtyrode ausgewaschen werden. Nun konnte begonnen werden, die Verkürzung und die Veränderung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Zelle in oben beschriebenem Stressprotokoll zu messen. Nur in der Acetyloxymethyl-Ester-Form ist Indo-1 AM membrangängig. Intrazelluläre Esterasen spalten die Acetylgruppe ab, so kann Indo-1AM die Zelle nicht mehr verlassen.

Nachdem Indo-1AM mittels einer UV-Lampe (XENON SHORT ARC Lamp Typ UXL-75XE von USHIO Inc., Japan) bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt wurde, konnte der Verlauf des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen ratiometrisch gemessen werden. Ca<sup>2+</sup>-gebundenes Indo-1AM emittiert bei einer Wellenlänge zwischen 405 bis 485nm. Indo, welches kein Calcium geladen hat, emittiert Licht mit 510 nm.

Die Vorteile von Indo-1AM sind die Genauigkeit der Messung durch die ratiometrischen Eigenschaften, die Persistenz in der Zelle und die leichte Handhabung. Gegen Indo-1AM spricht allerdings, dass es zur Pufferung der

intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt und somit die Kontraktion und andere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse beeinflusst (Grynkiewicz et al. 1985).

### **5.3.5 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials mit TMRM**

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials während des physiologischen Stressprotokolls wurden die Kardiomyozyten für 10 min bei 25°C mit TMRM inkubiert. Bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm emittiert TMRM Licht bei 605 nm. TMRM akkumuliert in den Mitochondrien in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotenzial (Scaduto et al. 1999).

### **5.3.6 Superoxidradikal Messungen mit MitoSOX**

Zur Detektion von Superoxid Radikalen wurden die Kardiomyozyten mit MitoSOX beladen (20µl Pluronic auf 50µg MitoSOX für 30 Minuten bei 37°C). Die Anregungswellenlänge dieses Fluoreszenzfarbstoffes liegt bei 380 nm und er emittiert bei 580 nm. Als Positiv-Kontrolle wurden nach Durchführung des Stressprotokolls Antimycin A (150 µM) hinzugegeben.

### **5.3.7 $\text{H}_2\text{O}_2$ Messungen mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate ( $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ )**

Vor einer Messung mit DCF wurden die 2 ml der Zell-Suspension zusammen mit  $\text{H}_2\text{DCF}$  (0.4 µM) für 10 min in einem Röhrchen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abzentrifugiert und verworfen. Die Tube wird mit Messtyrode auf 2 ml aufgefüllt.

DCF ist ein Fluoreszenzfarbstoff, er wird von den Kardiomyozyten aufgenommen (Swift & Sarvazyan 2000) und intrazellulär durch Esterasen die Acetatgruppe abgespalten. Das nicht fluoreszierende  $\text{H}_2\text{-DCF}$  wird durch ROS zu DCF oxidiert und wird dabei zu dem Flurochrom DCF umgeformt (Hempel et al. 1999). Dieses Flurochrom kann bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden und emittiert dann Licht bei einer Wellenlänge von 525 nm (Halliwell & Whiteman 2004), welches durch die Ion Optix Anlage detektiert werden kann. Die Oxidation von  $\text{H}_2\text{-DCF}$  ist nicht spezifisch (Jakubowski 2000), neben der Auto-Oxidation stellen die Bildung von ROS

aus der Reaktion von H<sub>2</sub>-DCF mit Peroxiden und intrazellulären Peroxidasen Limitationen der qualitativen Messung von ROS dar (LeBel et al. 1992). Eine weitere Limitation besteht in der kurzzeitigen intrazellulären Retention der oxidierten Form DCF in der Zelle (Swift & Sarvazyan 2000).

### **5.3.8 Lösungen**

#### **Lösungen zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten**

##### **Perfusionspuffer (Vorrat)**

113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.032 mM Phenolrot, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 30 mM Taurin.

##### **Perfusionspuffer**

0.98 x Perfusionspuffer (Vorrat), 10 mM BDM (2.3-Butandion-Monoxim), 5.5 mM Glukose

##### **Verdauungspuffer**

1 x Perfusionspuffer, 0.14 mg/ml Trypsin, 12.5 µM CaCl<sub>2</sub>

##### **Stopp-Puffer 1**

1 x Perfusionspuffer, 10% BCS (Bovines Serum), 12.5 µM CaCl<sub>2</sub>

##### **Stop-Puffer 2**

1 x Perfusionspuffer, 5% BCS (Bovines Serum), 12.5 µM CaCl<sub>2</sub>

##### **Plattierungsmedium**

0.9 x MEM, 5% BCS (Bovines Serum), 10 mM BDM, 100 U/ml Penicillin, 2 mM L-Glutamin

##### **Kulturmedium**

1 x MEM 0.1 mg/ml BSA 100 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin

##### **Messtyrode**

140mM NaCl, 4mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES, 10 mM Glucose

## **Weitere Lösungen**

### **Kalium-Phosphat Puffer**

50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM Saccharose, pH 7.0

### **Lucigenin Puffer**

Kalium-Phosphat Puffer + 10µM Lucigenin

### **NADPH Puffer**

Kalium-Phosphat Puffer + 1mM NAD(P)H,

## **5.3.9 Auswertung der Einzelzell-Experimente**

Der erste Schritt der Auswertung der Einzelzell-Experimente erfolgte durch ein spezielles Computerprogramm (IONWizard von ION OPTIX). Aufgrund limitierter Möglichkeiten dieses Programmes mussten die Daten im zweiten Schritt ins Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corporation) importiert werden, um die Auswertung abzuschließen. Bei den Fluoreszenzversuchen wurden alle Messpunkte in die Auswertung aufgenommen. Die Sarkomerverkürzung wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Vorphase, Beginn der Isoprenalinwirkung, Stressphase, Erholungsphase) erfasst. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils vier Verkürzungsamplituden gemittelt. Das F/F<sub>0</sub> der NAD(P)H, Mitosox, DCF und TMRM Messungen, Kinetik-Daten (RT50%, RT80%, RT90%, TTP) des Verkürzungsvorgangs und der Calcium Transienten wurden mittels Kalkulationen in Excel bestimmt.

## **5.3.10 Statistik**

Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaarten oder ungepaarten t-Test und für wiederholte Messungen mittels dem two-way-ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest und den Programmen Excel und GraphPad-Prism (GraphPad Prism Software inc.) ermittelt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung des Mittelwertes ( $SEM = \text{Varianz} / \sqrt{n}$ ;  $n =$

Anzahl der Experimente) aus den jeweiligen gemessenen Einzelwerten berechnet und dargestellt.

### **5.3.11 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche, 11 bis 18 Wochen alte Mäuse. Die Tiere besitzen zwei unterschiedliche genetische Hintergründe, die BL/6J von Jackson Laboratories und die BL/6NCrl von Charles River. Zur photometrischen Bestimmung der NAD(P)H-Kinetik und für Lucigenin-Assays wurden Ratten und DBA Mäuse verwendet. Die Versuchstiere wurden in den üblichen Käfigen der Tierhaltung bei einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten dabei freien Zugang zu Wasser und Futter.

## **6 ERGEBNISSE**

### **6.1 Vorversuche am Luminometer und Photometer**

Die ursprüngliche Intention bei der Durchführung der Vorversuche war es herauszufinden, welche Quellen es für ROS im Herzen gibt und welchen Beitrag die einzelnen Quellen für die Gesamtformation von ROS leisten. Das finale konkrete Ziel dieser Studie - ein besseres Verständnis der Funktion der Nnt im Herzen zu erlangen - entstand während der Durchführung und laborinternen Diskussion der Vorversuche.

Das vorrangige Untersuchungsobjekt der Vorversuche war daher zunächst die NADPH-Oxidase, welche als wichtige Quelle (Kuroda et al. 2010) von ROS im Herzen (insbesondere die NOX2 und NOX4 (Zhang et al. 2010)) beschrieben wurde.

In allen Vorversuchen wurde entweder homogenisiertes ventrikuläres Rattenmyokard oder Mausmyokard verwendet. Die Versuche deuten darauf hin, dass es zu einer Fragmentierung der Mitochondrien kommt. Folgen der Fragmentierung sind die Dissipation des mitochondrialen Membranpotenzials, aber auch die Messbarkeit von in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Enzymen im Zell-Homogenat.

Als Methoden wurde der Lucigenin Assay zur Bestimmung von Superoxidradikalen (in Abbildung 7 grün hinterlegter Bereich) und photometrische Messungen zur Bestimmung von NAD(P)H (Abbildung 7: blau hinterlegter Bereich) durchgeführt. Die Versuchszeiten liegen zwischen 60 und 100 min. Bei allen Versuchen handelt es sich um einfache Messungen. Zur Charakterisierung der Reaktionsabläufe wurde mit unterschiedlichen Blockern experimentiert. Die NADPH Oxidase wurde mit DPI und Apocynin blockiert (Abbildung 7) und die Atmungskette wurde mit klassischen Blockern wie Rotenon und Antimycin A an Komplex I und Komplex III blockiert. Die Nnt konnte mit NBD-Chlorid blockiert werden. Anhand der Abbildung 7 lassen sich die Versuchsanordnungen der Vorversuche schematisch nachvollziehen.

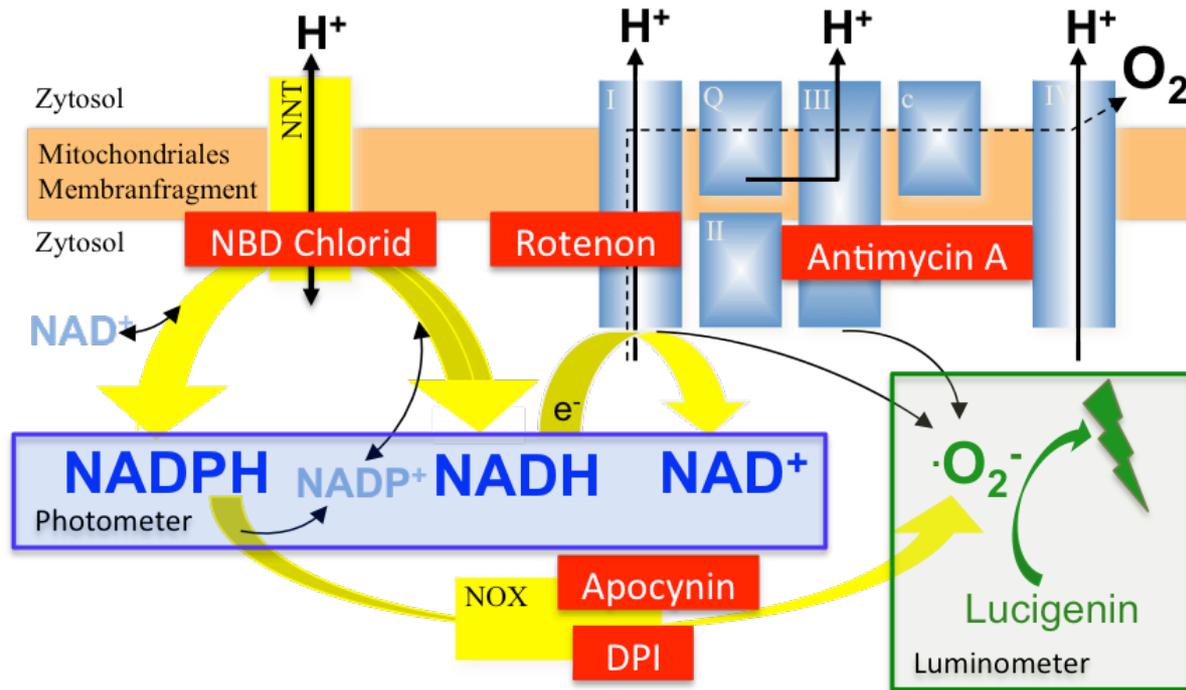


Abbildung 7 Schema zu den Vorversuchen

### 6.1.1 NADPH-induzierte ROS Formation am Luminometer

Mit dem Lucigenin Assay konnte in Anwesenheit von NADPH eine Radikalproduktion detektiert werden (Abbildung 8A-C). Die genauere Charakterisierung dieser Radikalproduktion sollte durch die Hemmstoffe der NADPH Oxidase (NOX) Apocynin und DPI (Williams & Griendling 2007) erfolgen. Die Aussage, ob es sich tatsächlich um eine Radikalproduktion der NOX handelt, konnte aber mit diesen Versuchen nicht ausreichend beantwortet werden, da DPI in Versuch A zwar eine vollständige Blockade der Radikalproduktion erzielte, aber bekanntermaßen unspezifisch Flavinygruppen hemmt (Brandes et al. 2010), die sich beispielsweise auch in der ETC befinden (Yunbo Li & Trush 1998). Apocynin hatte in Versuch A nur einen sehr geringen Effekt auf die Radikalproduktion. Ursächlich dafür ist am ehesten, dass Apocynin kein direkter Inhibitor der NOX ist, sondern die Zusammensetzung der NOX aus mehreren Proteinen hemmt, also eine intakte Zellumgebung benötigt, um zu wirken (Brandes et al. 2010). Folglich stellte sich eine selektive inhibitorische Blockade der NOX mit Apocynin und DPI unter den gewählten Versuchsbedingungen als nicht möglich heraus.

In den folgenden Versuchen (Abbildungen 8B und 8C) wurde dann zusätzlich mit Antimycin A (Potter & Reif 1952) und Rotenon (Lindahl & Öberg 1961) experimentiert. Beide Moleküle sind Inhibitoren der Atmungskette. Rotenon hemmt die Übertragung von Elektronen von Komplex I auf Ubiquinon, und Antimycin A hemmt die Oxidation von Ubiquinol an Komplex III (siehe Abbildung 7). Nach Zugabe von Antimycin A kam es zu einer Steigerung der Radikalproduktion, nach anschließender Hinzugabe von Rotenon sank die Radikalproduktion wieder (Abbildung 8B). Wir schlussfolgerten, dass trotz alleiniger Hinzugabe von NADPH, welches kein Substrat der NADH Dehydrogenase (Komplex I) ist, neben der NOX die Atmungskette eine Bedeutung bei der Radikalproduktion haben musste. Die Verknüpfung zwischen NADPH und der Atmungskette wird im Unterpunkt 6.1.2. weiter geklärt.

Nach Antimycin A kommt es bekannterweise zu einer höheren Radikalproduktion an der Atmungskette als nach Rotenon Zugabe (Aon et al. 2010; N Li 2002). Eine Beeinflussung der NADPH Oxidase durch Rotenon und Antimycin A ist nicht bekannt. Die Beobachtung in Versuch B lässt sich daher folgendermaßen erklären: Nach alleiniger Rotenon Zugabe entstehen Radikale nur am reduzierten Komplex I und nach alleiniger Antimycin A Zugabe können Radikale zusätzlich im Q-Zyklus des Komplex III und an Komplex II entstehen. Dass sich die höhere Antimycin A Radikalproduktion mit Rotenon wieder reduzieren lässt, kann man durch die Blockade des Elektronentransports in den Q-Zyklus des Komplex III und somit auf das Wegfallen dieser Komplexe als Radikalquellen erklären (siehe Abbildung 7).

Die Inhibition der Radikalproduktion nach Hinzugabe von DPI (Abbildung 8C) zeigt, dass DPI auch die von der Atmungskette abhängige Radikalproduktion hemmt, was aufgrund der Bedeutung von Flavingruppen, welche unspezifisch durch DPI gehemmt werden, für die Redoxreaktionen in der Atmungskette nicht überrascht.

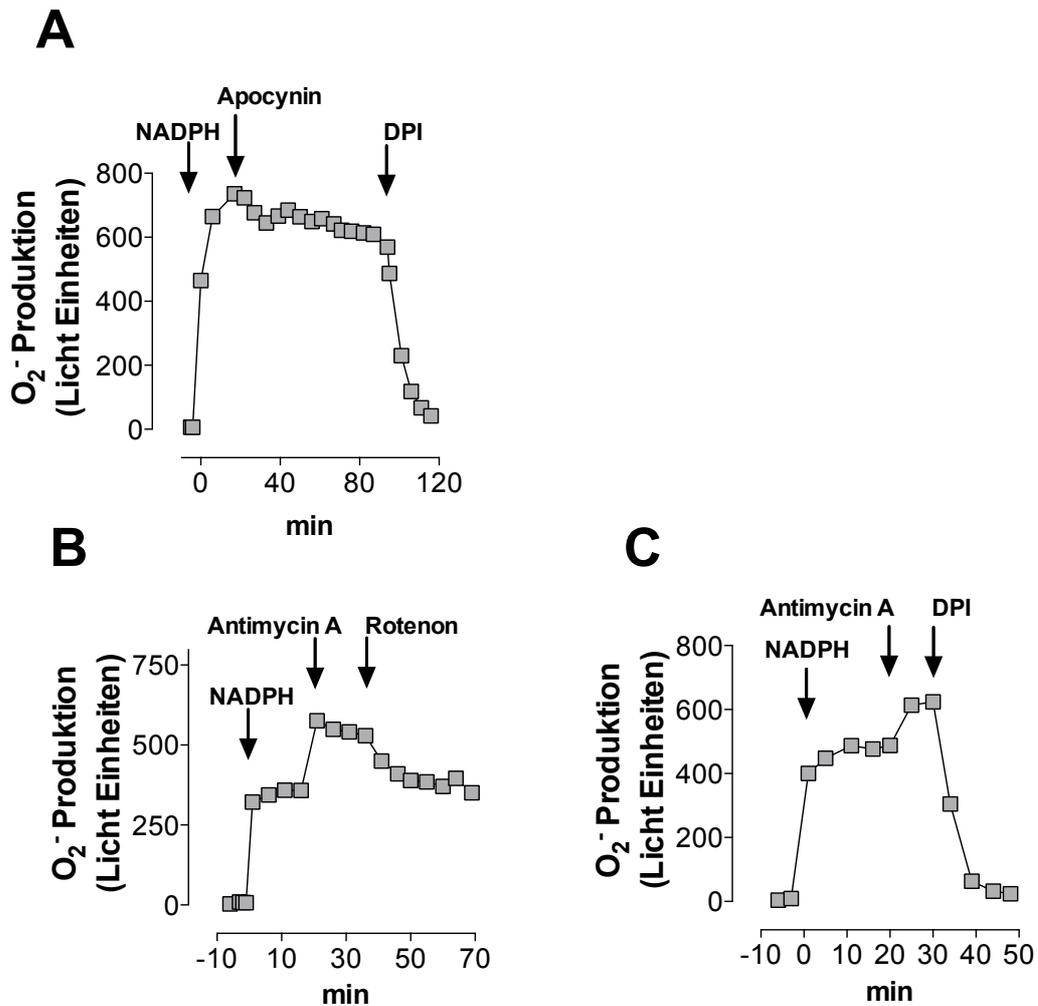


Abbildung 8 Bestimmung der ROS Formation am Luminometer

**A:** Vollständige Blockade der NADPH-induzierten ROS-Formation durch DPI; nur geringe Blockade durch Apocynin **B:** Steigerung der NADPH induzierten Sauerstoffradikalformation durch den Komplex III-Inhibitor Antimycin A; Reduktion der Antimycin A-induzierten ROS Produktion durch den Komplex I-Inhibitor Rotenon **C:** Gesteigerte Radikalproduktion unter Antimycin A durch DPI inhibierbar.

## 6.1.2 Unterschiede und Interaktion von NADH/NADPH bei der ROS

### Produktion

Um der Frage nach der Ursache der unklaren NADPH-abhängigen Radikalproduktion an der Atmungskette weiter nachzugehen, wurden Experimenten mit NADH als Substrat von Komplex I der Atmungskette durchgeführt. Die Effekte von NADH wurden zusätzlich zu dem Luminometer auch am Photometer untersucht, um Veränderungen der NAD(P)H Konzentrationen zu erfassen (Versuch in Abb. 9D).

Nach Hinzugabe von NADH zum Myozyten-Homogenat kam es nur zu einem kurzen Anstieg der Superoxidproduktion mit geringerer Amplitude gegenüber der Superoxidproduktion nach Zugabe von NADPH. Zudem kam es nach Zugabe von NADH zu einem schnellen Sistieren der Superoxidproduktion. Wir nehmen an, dass es bei der Homogenisierung der Kardiomyozyten zwar zu einer Fragmentierung der Mitochondrien kommt, allerdings ist zu vermuten, dass die Komplexe I-IV der Atmungskette noch in Form sog. „Superkomplexe“ miteinander verbunden sind. Die Ursache für den schnellen Abfall der NADH-induzierten ROS Produktion ist daher am ehesten eine rasche Oxidation des NADH durch die Atmungskette mit Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff am Komplex IV. Nach Hinzugabe von NADPH kommt es hingegen zu der bereits bekannten beständigen Radikalproduktion mit hohem Niveau und langsamem Abfall. Es ist hierbei nicht genau nachvollziehbar, welcher Anteil dabei von der NADPH Oxidase bzw. der ETC kommt.

Wird der Elektronenfluss in Versuch B nach Hinzugabe von NADH an Komplex I durch Rotenon am distalen Ende des Komplex inhibiert, kommt es zu einer kontinuierlicheren Radikalproduktion an der Atmungskette. Blockiert man jedoch Komplex III mit Antimycin A, sind, wie bereits beschrieben, mehrere Komplexe (I+II+III) reduziert, und es entstehen daher mehr Radikale als durch die alleinige Blockierung nur des Komplex I. Das Ausmaß der Radikalproduktion ist hierbei etwa doppelt so hoch wie unter Rotenon, in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur (Turrens 2003).

Bei den Versuchen in Abbildung 9C und 9D kommt es nach Hinzugabe von NADH zu NADPH zu einem schnellen, kurzen zusätzlichen Anstieg und anschließend zu einem deutlichen Abfall der Radikalproduktion in Versuch 9C. Parallel dazu kommt es auch zu einer Abnahme der Gesamtmenge an NADH und NADPH (die Absorption

---

unterscheidet sich für NADH und NADPH nicht). Um diese Beobachtungen zu erklären, vermuten wir, dass die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) im reversen Modus verantwortlich sein könnte (Mitchell 2011):

- Nach Hinzugabe von NADH kommt es zu einer schnellen Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  an der ETC.
- Das anfallende  $\text{NAD}^+$  wird anschließend durch das vorhandene NADPH über den reversen Modus der Nnt wieder zu NADH reduziert ( $\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{NADP}^+$ ; siehe Abbildung 7).
- Das neu gebildete NADH wird kontinuierlich unter geringerer ROS Produktion an der ETC oxidiert, da hierbei die meisten Elektronen (bei weiterhin Bestehen von respiratorischen Superkomplexen, bestehend aus den Komplexen I-IV) am Komplex IV auf  $\text{O}_2$  übergehen, ohne hierbei Superoxid als Zwischenprodukt zu formen.
- Durch die kontinuierliche und beschleunigte Abnahme von NADH und NADPH nimmt auch die NADPH-vermittelte ROS-Produktion an der NADPH Oxidase ab (Abb. 9C und 9D).

Diese Versuche geben eine erste Antwort auf die am Anfang dieses Unterpunktes gestellte Frage bezüglich des Ursprungs der durch NADPH verursachten Radikalproduktion an der Atmungskette. Wahrscheinlich reagiert hinzugegebenes NADPH über die Nnt mit Resten von endogenem  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Dies mediiert eine geringe Radikalproduktion an der Atmungskette, welche sich durch die Blocker Antimycin A und Rotenon demaskieren lässt (Abbildungen 9C und 9D).

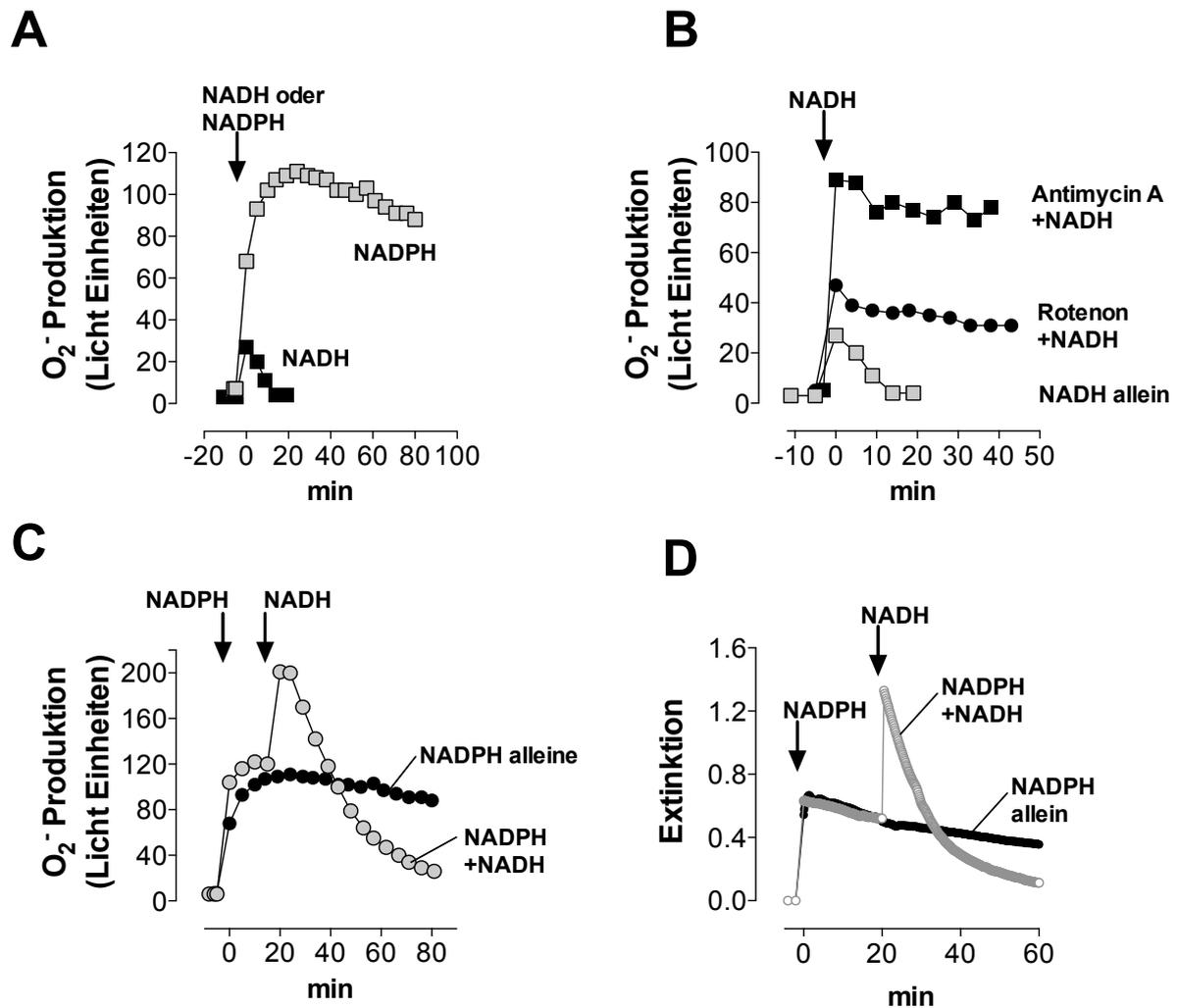


Abbildung 9 Bestimmung von ROS (Luminometer) und NAD(P)H Extinktion (Photometer)

**A:** NADH kurzer Radikal-Peak, NADPH anhaltende hohe Radikalproduktion **B:** NADH allein: kurz anhaltende Radikalproduktion. NADH und Rotenon: anhaltende Radikalformation mittleres Niveau. Antimycin A und NADH: anhaltende Radikalproduktion auf hohem Niveau. **C:** NADPH+NADH: Peak ROS und schneller Abfall **D:** Am Photometer NADPH+NADH: Korrelation Versuch C

### 6.1.3 Die reverse Reaktion der Nnt

Durch die in den vorangegangenen Versuchen beschriebene reverse Reaktion der Nnt gelangte das Enzym in den Fokus dieser Studie. Im Folgenden werden Versuche zur Charakterisierung der Nnt durchgeführt. Diese Versuche wurden an homogenisiertem Rattenmyokard vollzogen. Wie bereits zuvor wurden die Extinktion von NAD(P)H am Photometer und die Radikalformation am Luminometer gemessen.

In den Versuchen in Abbildungen 10A und 10B wird zunächst NADH über die ETC oxidiert, so dass oxidiertes  $\text{NAD}^+$  zurückbleibt. Gibt man dann NADPH hinzu, kommt es zu einer schnellen Oxidation von NADPH über die reverse Nnt Reaktion. Das hierdurch gebildete NADH wird rasch an der ETC oxidiert.

NBD-Chlorid ist bekannt als Derivatisierungsreagenz, welches relativ unspezifisch mit Cystein Gruppen reagiert. In der Literatur ist es allerdings auch als Inhibitor der Nnt beschrieben (Persson et al. 1988; Sheeran et al. 2010). In dem Versuch in Abb. 10B blockiert NBD-Chlorid ( $1\mu\text{M}$ ) den schnellen Abfall von NADPH, was durch die Inhibition der reversen Nnt Reaktion zu erklären ist. Wenn man die Geschwindigkeit, mit der NADPH über die reverse Nnt und die Atmungskette abgebaut wird, als maximale Geschwindigkeit der Nnt ansieht (was eine noch schnellere Oxidation von NADH an der ETC voraussetzt), so kann man die Zeitkonstante tau ( $\tau$ ) als inversen Wert der Rate der Nnt Reaktion ansehen (hohes  $\tau$  = langsame Geschwindigkeit). In Abbildung 10C sind die  $\tau$  Werte der verschiedenen Bedingungen aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die reverse Nnt Reaktion am schnellsten abläuft, wenn die Kombination aus NADH und NADPH zugegen ist. NADPH alleine kann ohne  $\text{NAD}^+$  keine schnelle reverse Nnt-Reaktion induzieren und die Gegenwart des Nnt-Inhibitors NBD-Chlorid hemmt die Nnt Reaktion in der Gegenwart von NADPH und NADH (und somit auch  $\text{NAD}^+$  nach Oxidation von NADH an der ETC).

Die Interpretation der Daten mit NBD-Chlorid ist allerdings durch die Beobachtung erschwert, dass NBD-Chlorid auch die gesamte durch Antimycin A gesteigerte Radikalproduktion von NADPH blockierte (Abb. 10D). Man würde erwarten, dass eine Radikalproduktion über die NOX oder andere Wege weiterhin bestehen bleibt. Möglicherweise ist der gesamte Abfall der Radikalproduktion auf eine geringe

Spezifität des NBD Chlorid zurückzuführen. So ist es möglich, dass NBD-Chlorid alle Enzyme blockiert, die für eine Radikalproduktion in Frage kommen, auch die NOX.

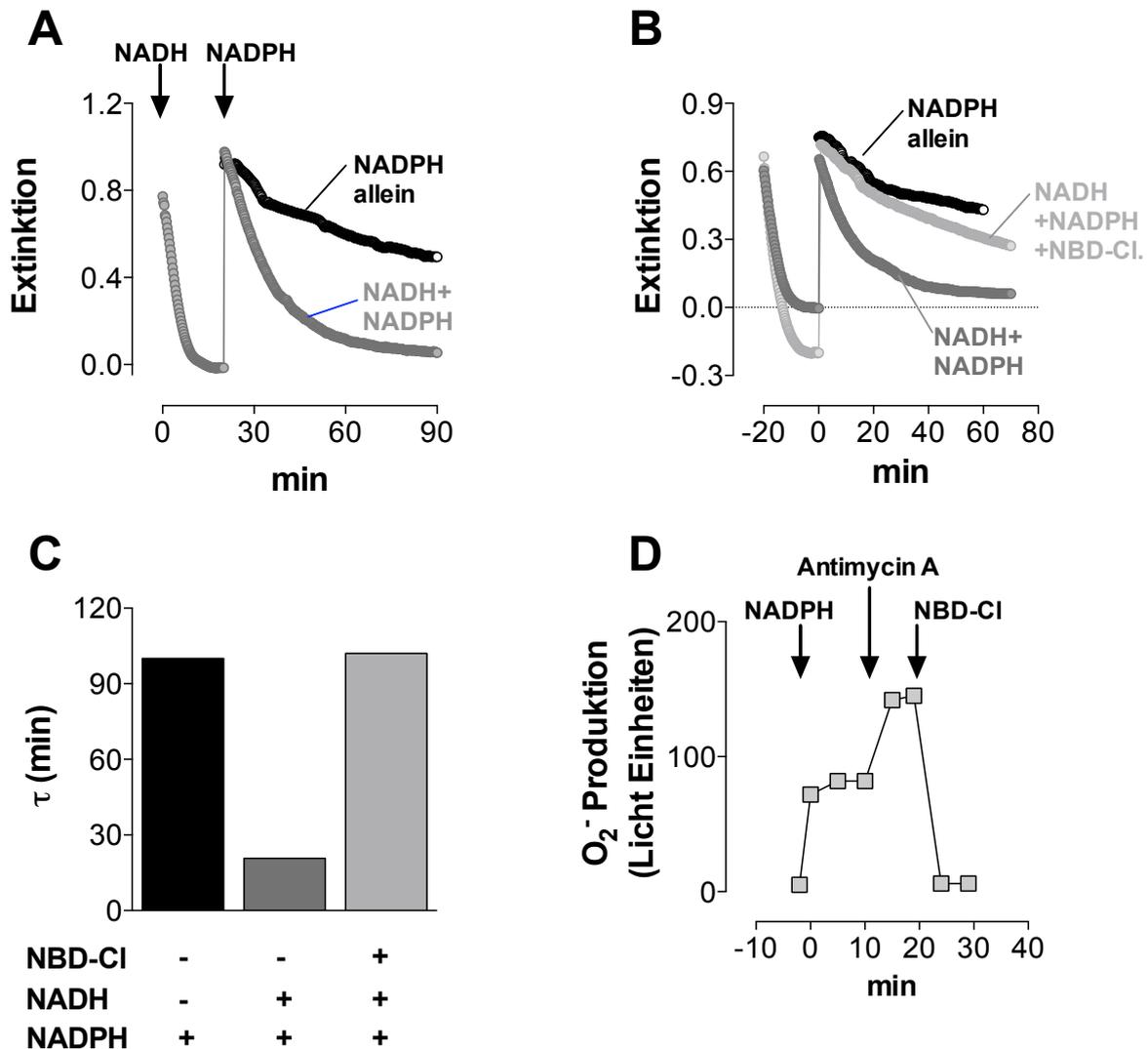


Abbildung 10 Messung der reversen Nnt Reaktion am Photometer

**A:** beschleunigte NADPH Oxidation in Anwesenheit von  $\text{NAD}^+$  **B:** Nnt Inhibition durch NBD-Chlorid ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) verhindert NADPH Oxidation **C:** Hemmung NADPH Oxidation durch NBD-Chlorid **D:** NADPH assoziierte Radikalproduktion gesteigert durch Antimycin A und vollständige Inhibition durch NBD-Chlorid.

#### 6.1.4 Kinetik der Nnt Reaktion

Die folgenden Versuche wurden an homogenisiertem Ventrikelmyokard von Ratten und drei unterschiedlichen Mausstämmen durchgeführt. Ziel dieser Versuche war die weitere Charakterisierung der Nnt Reaktion und die Einführung und Prüfung der Nnt defizienten BL/6J Maus.

Im Versuch in Abbildung 11A wird die Nnt-abhängige Oxidation von NADPH in der Gegenwart aufsteigender Konzentrationen von  $\text{NAD}^+$  determiniert. Aus Zusammenführung dieser Daten entstehen die Konzentrations-Wirkungs-Diagramme in den Abbildungen 11B-E. Auf der Abszisse wird die Konzentration von  $\text{NAD}^+$  in logarithmischer Form aufgetragen. Die Zeitkonstante Tau ( $\tau$ ) auf der Ordinate beschreibt die Geschwindigkeit der NADPH Oxidation bei steigender  $\text{NAD}^+$  Konzentration. Die angegebenen  $\text{EC}_{50}$  Werte beziffern die mittlere effektive Konzentration von  $\text{NAD}^+$  für die Induktion der reversen Nnt Reaktion. In der Abwesenheit von  $\text{NAD}^+$  zeigt die Zeitkonstante die Rate an, mit der NADPH an der NADPH Oxidase verbraucht wird, in Kombination mit der Rate, mit der endogene Reste von  $\text{NAD}^+$  über die reverse Nnt Reaktion NADPH oxidiert. Durch Zugabe hoher exogener  $\text{NAD}^+$  Konzentrationen lässt sich letztere Rate weiter steigern, was zu einer Konzentrations-abhängigen Verringerung der Zeitkonstante führt. Auffällig war hierbei, dass die basale Rate der NADPH Oxidation in der Abwesenheit von  $\text{NAD}^+$  durchaus variabel zwischen den unterschiedlichen Mausgenotypen war (Abb. 11B-D). Die Spezifität der Reaktion wird dadurch untermauert, dass es im Myokard von BL/6J Mäusen, die keine intakte Nnt mehr aufweisen, tatsächlich zu keiner  $\text{NAD}^+$ -induzierten Beschleunigung der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen NADPH Oxidation mehr kommt (Abb. 11D).

In Abbildung 11F zeigt sich nach Hinzugabe von NADPH ein Anstieg der Superoxidproduktion sowohl in der BL/6J als auch in der BL/6N Maus. Geachtet werden sollte hier nicht auf die absolute ROS Produktion (aufgrund unterschiedlicher Proteinkonzentrationen), sondern auf den Verlauf der Kurven. Nach Hinzugabe von NADH gibt es in beiden Mäusen einen zusätzlichen Anstieg, der auf eine erhöhte Radikalproduktion an der Atmungskette hinweist. Anschließend fällt die Radikalformation in der BL/6J Maus auf das vorherige Niveau zurück, während die Radikalformation in der BL/6N Maus steil abfällt.

Diese Beobachtung lässt sich durch die Anwesenheit der Nnt in der BL/6N und deren Abwesenheit in der BL/6J erklären. Entstandenes  $\text{NAD}^+$  führt in der BL/6N zur reversen Reaktion der Nnt und somit zur schnellen indirekten Oxidation des NADPH über die Atmungskette - wie bereits in den vorangegangenen Versuchen beschrieben (6.1.2-3).

Nun ließe sich zudem aufgrund vorangegangener Experimente spekulieren, dass die gesamte Radikalproduktion von NADPH über die reverse Reaktion der Nnt durch die Reduktion von endogenem  $\text{NAD}^+$  und anschließende Radikalformation an der Atmungskette unterhalten wird. Allerdings kann diese Spekulation durch den Versuch in Abbildung F widerlegt werden, denn dieser Versuch zeigt eine Superoxid Formation nach NADPH Zugabe in den Nnt defizienten BL/6J Mäusen. Dies weist darauf hin, dass in BL/6J Mausmyokard der überwiegende Teil der NADPH-abhängigen Superoxidproduktion mit hoher Wahrscheinlichkeit von der NADPH Oxidase herrührt. Ein alternatives Erklärungsmodell sind unspezifische Elektronenübertragungen auf Sauerstoff durch NADPH. Die Daten legen weiterhin nahe, dass unter diesen Bedingungen auch im Myokard der BL/6N Maus (oder auch Ratte; vergleiche Abbildungen 9 und 10) der überwiegende Teil der Superoxidproduktion durch die NADPH Oxidase bewerkstelligt wird, da das Plateau der Superoxidproduktion mit nur langsamer Abnahme der ROS-Produktionsrate (in der Abwesenheit von  $\text{NAD}^+$  oder NADH) höher liegt als das Maximum der NADH-induzierten Superoxidproduktion. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass es sich hier um Mitochondrienfragmente ohne erhaltenes Membranpotenzial handelt, was eine anhaltende Reduktion der ETC beungünstigt und daher die ETC-abhängige ROS Produktion eher unterschätzt wird. Unter in vivo Bedingungen besteht ein höheres mitochondriales Membranpotenzial, was eine ROS Produktion an der ETC eher begünstigt.

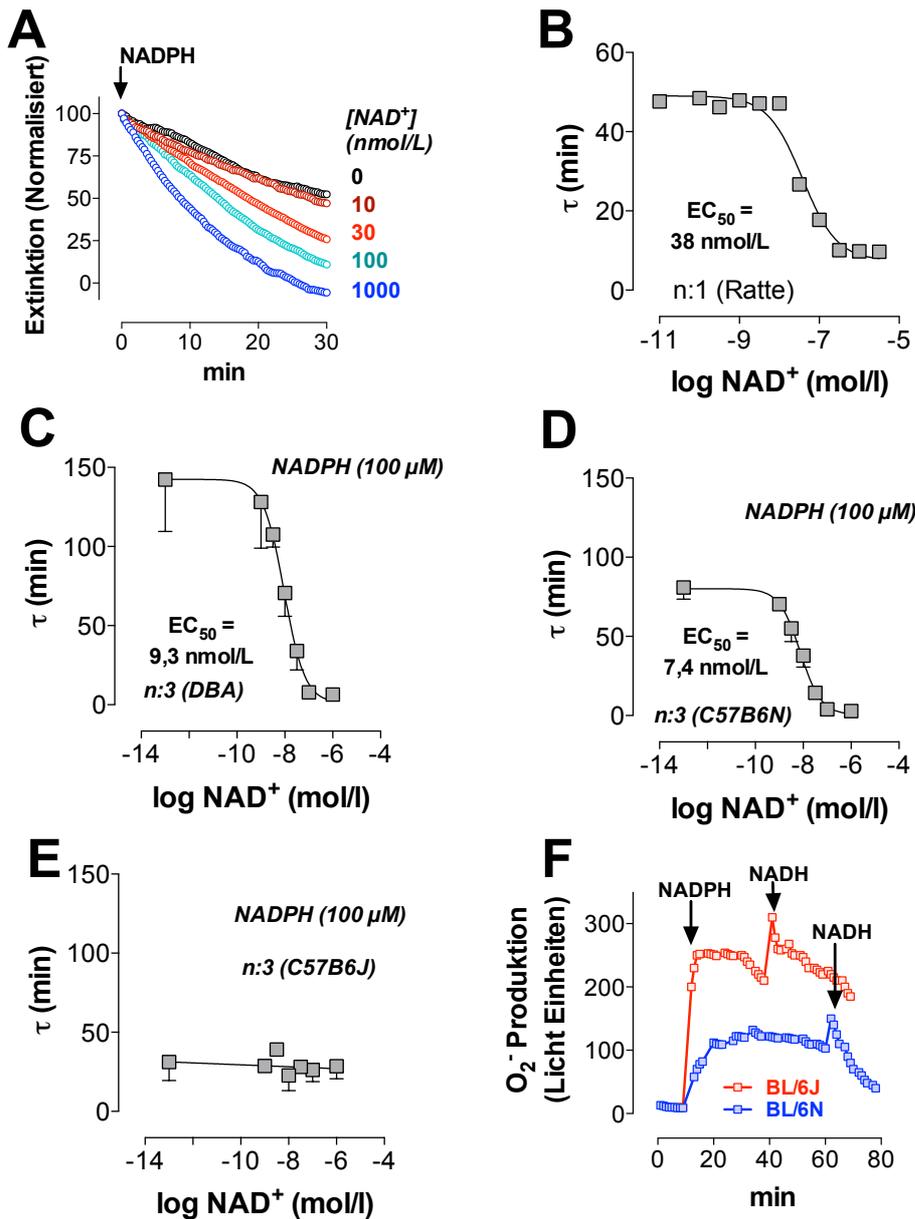


Abbildung 11 Kinetik der Nnt Reaktion

**A:** NADPH Oxidation bei verschiedenen  $NAD^+$  Konzentrationen **B:** Konzentrations Geschwindigkeits Diagramm der Nnt in Rattenmyokard. **C:** Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm der Nnt in Myokard von DBA Mäusen. **D:** Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm der Nnt Reaktion in Myokard von BL/6N Mäuse von Charles River. **E:** Keine  $NAD^+$  abhängige Veränderung der NADPH Oxidation in BL/6J Mäusen von Jackson Laboratories. **F:** Radikalproduktion BL/6J vs. N ( $n:1$ )

## 6.2 Untersuchung der Nnt in isolierten Kardiomyozyten

Aus den Vorversuchen ist die Frage nach der Bedeutung der Nnt für die antioxidative Kapazität in Herzmuskelzellen entstanden. Wir adressierten diese Frage durch den Vergleich von isolierten Kardiomyozyten aus BL/6N und BL/6J Mäusen, wobei erstere eine intakte Nnt und letztere eine defekte Nnt aufweisen. In den vorangegangenen Versuchen zur Kinetik der Nnt konnte diese fehlende Nnt-Aktivität in den BL/6J Mäusen bestätigt werden. Während es im homogenisierten Myokard der Ratte, der DBA- und der BL/6N Maus zu einer deutlichen Zunahme der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen reversen Nnt Aktivität kam, fehlte diese in Myokard von BL/6J Mäusen (Abb. 11A-E). Zusätzlich konnte per PCR das verkürzte Genprodukt des Nnt Gens, welches zu der „Loss of function“ Mutation führt, in den Jackson Mäusen nachgewiesen werden (nicht gezeigt; laborinterne Daten Dr. Hohl).

Um zu untersuchen, ob die Nnt eine Bedeutung für die antioxidative Kapazität in Kardiomyozyten hat, wurden die Kardiomyozyten von BL/6N und BL/6J Mäusen einem Stressprotokoll unterzogen, das eine physiologische Erhöhung der Arbeitslast simulieren soll. Hierfür wurden isolierte Kardiomyozyten zunächst bei 0.5 Hz stimuliert und anschließend mit dem  $\beta$ -Adrenozeptor Agonisten Isoprenalin stimuliert, der eine Erhöhung der Amplitude zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten herbeiführt, was gleichzeitig zu einer Zunahme der Zellverkürzung führt. Während dieser raschen Zunahme der Arbeitslast wurden die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), der Redoxstatus von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  bzw.  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  (jeweils Autofluoreszenz) sowie das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ; mit TMRM) und die mitochondriale Superoxidproduktion (MitoSOX) bestimmt. Hierbei wurden die Messungen von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  sowie von  $\Delta\Psi_m$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in jeweils denselben Zellen durchgeführt, da sich Wellenlängen für die Anregung der (Auto-) Fluoreszenzen und deren Emission durch spezifische Filterkombinationen voneinander trennen ließen. In allen Zellen wurde gleichzeitig durch die Registrierung eines Videobildes der Zelle die Sarkomerlänge und deren systolische Verkürzung detektiert.

### 6.2.1 Redoxstatus von NAD(P)H und FAD<sup>+</sup> und Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Während des oben beschriebenen Stressprotokolls wurde zunächst die Zellverkürzung zusammen mit dem Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>/FAD bestimmt. Der Redoxstatus wurde am Ende eines jeden Experimentes durch Einwaschen des mitochondrialen „Entkopplers“ FCCP sowie anschließend dem Komplex IV Inhibitor Cyanid kalibriert. Bei dieser Kalibration werden die Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>/FAD durch FCCP normalerweise komplett oxidiert und durch Cyanid komplett reduziert. Die Minima und Maxima der Fluoreszenz werden dann jeweils als 0% und 100% gesetzt, und die erhobenen Werte vor der Kalibration und während des Stressprotokolls in Prozent vom Maximum der Reduktion dargestellt.

Es fiel im Vergleich der BL/6N und BL/6J Daten sofort auf, dass obwohl der Redoxstatus von FADH<sub>2</sub>/FAD vor und während der physiologischen Arbeitslast sich nicht zwischen BL/6N und BL/6J Myozyten unterschied, der Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> in BL/6J Myozyten stärker oxidiert schien als in BL/6N Myozyten. Die Inkongruenz zum Redoxstatus von FADH<sub>2</sub>/FAD brachte die Frage auf, ob die Kalibration des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> korrekt interpretiert wurde. Wir führten hierzu ein Kontrollexperiment durch, bei dem wir in isolierten Kardiomyozyten den Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>/FAD zunächst in gewohnter Weise mit FCCP und Cyanid kalibrierten (Eng et al. 1989) (Kohlhaas & Maack 2010), dann aber als Positivkontrolle eine hohe Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applizierten, welches durch NADPH-abhängige Prozesse (Glutathion, Glutathionperoxidase, Peroxiredoxin/Thioredoxin System) entgiftet wird und hierüber NADPH und auch NADH komplett oxidieren sollte.

Bei diesem Experiment kam es in Myozyten von BL/6N Mäusen durch FCCP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur exakt gleichen Oxidation des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>/FAD. Im Gegensatz dazu war in BL/6J Myozyten nach Applikation von FCCP die Oxidation von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>, aber nicht FADH<sub>2</sub>/FAD geringer ausgeprägt als nach Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wir interpretierten dies so, dass es in BL/6N Myozyten nach FCCP-induzierter Beschleunigung der NADH-abhängigen Atmung an der ETC zu einer kompletten Oxidation von NADH kommt, was dann durch Erhöhung von NAD<sup>+</sup> und Dissipation des mitochondrialen Membranpotenzials die reverse Aktivität der Nnt

erhöht und somit zu einer kompletten Oxidation auch von NADPH führt. In der Abwesenheit der Nnt in BL/6J Myozyten bleibt die Nnt-medierte NADPH Oxidation aus, sodass nur NADH, aber nicht NADPH durch FCCP oxidiert wird. Im Gegensatz dazu wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch in der Abwesenheit der Nnt NADPH komplett oxidiert. Diese Interpretation wird auch dadurch gestützt, dass a) die gesamte, maximal Cyanid/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -modulierbare Fluoreszenz von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  in BL/6N und BL/6J Myozyten identisch war, und dass b) die Oxidation von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und FCCP in BL/6N Myozyten identisch war, während diese sich in BL/6J Myozyten nur im Redoxstatus von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$ , aber nicht  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  gegenüber BL/6N Myozyten unterschied (in oben genannter Weise) und dass c) es in Myozyten von BL/6N Myozyten keine Unterschiede in der rein ETC-abhängigen Oxidationsamplitude oder –kinetik nach FCCP- oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter Oxidation gab.

Durch diese neuen Einblicke musste nun das in Abb. 13 erhobene Ergebnis des Redoxstatus von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  in BL/6J Myozyten re-evaluiert werden. Die relativ konstante Zellgröße und Gesamtfluoreszenz von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  und  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  erlaubten es, die „fehlende“ Oxidation von NADPH in BL/6J Myozyten nach FCCP Gabe zu extrapolieren. Mit Hilfe dieses Korrekturfaktors konnte dann der Redoxstatus von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  neu kalibriert werden. Nach Adjustierung der Kalibration ergaben sich nun – in Übereinstimmung mit dem Ergebnis des  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  Redoxstatus – keine Unterschiede mehr zwischen BL/6J und BL/6N Myozyten. Auch das mitochondriale Membranpotenzial und dessen Verlauf während der physiologischen Arbeitslast unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der Erhebung der Autofluoreszenz von  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  nicht zwischen dem Redoxstatus von  $\text{NADPH/NADP}^+$  und  $\text{NADH/NAD}^+$  unterschieden werden kann. Somit kann auch nicht beurteilt werden, ob es während des physiologischen Arbeitslastanstiegs zu einer differenziellen Regulation dieser beiden Redoxstatus kommt. Um dies besser zu beurteilen, detektierten wir die Emission von Superoxid (MitoSOX) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DCF) aus kardialen Mitochondrien während dieses Arbeitslastwechsels.

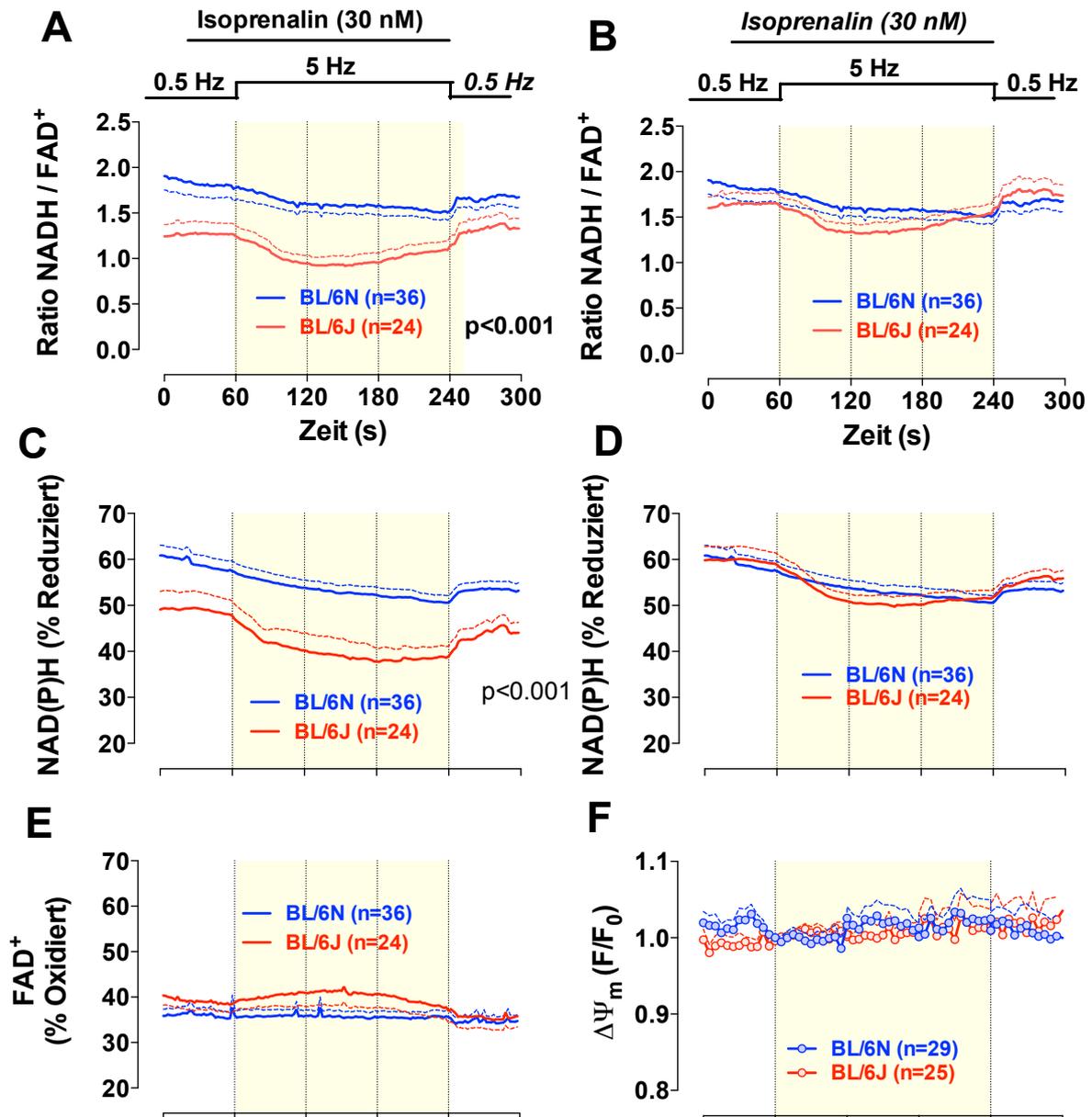


Abbildung 12 Redoxstatus (NAD(P)H/FAD<sup>+</sup>) und mitochondriales Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ )

**A** Ratio NAD(P)H/ FAD<sup>+</sup> BL/6J vs. BL/6N ohne Korrektur signifikant **B** korrigierte Ratio **C** Redoxstatus NAD(P)H unkorrigiert und **D** korrigiert. **E** FAD<sup>+</sup> Redoxstatus **F** Keine Unterschiede im mitochondrialen Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ), bestimmt mit TMRM (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht) .

### 6.2.2 Kalibrierung des Redoxstatus

Aufgrund der im vorangegangenen Versuch gezeigten Unterschiede im Redoxstatus wurde ein erweitertes Kalibrierungsexperiment zusätzlich mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die übliche Kalibrierung (Eng et al. 1989) des Redoxstatus mit CN und FCCP kann in den BL/6J Mäusen aufgrund der fehlenden Nnt nicht funktionieren.

Die Nnt koppelt den NADPH Pool an den NADH Pool. Bei der Kalibrierung mit FCCP gibt NADH sehr schnell seine Elektronen an die Atmungskette ab, um den durch FCCP entkoppelten Protonengradienten aufrecht zu halten. Dabei wird NADH zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Unter diesen Umständen - eines entkoppelten mitochondrialen Membranpotenzials und eines oxidierten NADH Pools- reduziert die Nnt  $\text{NAD}^+$  zu NADH und oxidiert dabei NADPH zu  $\text{NADP}^+$ . Dabei pumpt die Nnt zusätzlich Protonen aus der mitochondrialen Matrix. Beim Fehlen der Nnt kann folglich der NADPH-Pool nicht oxidiert werden. Der Redoxstatus der BL/6J Maus erscheint oxidierter als er in Wirklichkeit ist.

Dies ist die Beschreibung der reversen Reaktion der Nnt, wie sie bereits in dieser Studie an Zellhomogent in den Vorversuchen durchgeführt wurde (Rydström & J B Hoek 1988; Mitchell 2011). Hier kann diese Reaktion allerdings an intakten Mitochondrien bzw. intakten Zellen indirekt gezeigt werden.

Der Kalibrierungsverlauf von NAD(P)H der BL/6J Maus ist in Graph B zu erkennen. Nach Zugabe von FCCP lässt sich der Redoxstatus von NAD(P)H nicht maximal oxidieren, durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist der Redoxstatus der BL/6J allerdings maximal oxidierbar. Zum Vergleich ist in Graph A die Kalibrierung des NAD(P)H Signals in der BL/6N hier ist eine maximale Oxidation sowohl durch FCCP als auch durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  möglich. Eine maximale Reduktion kann in beiden Mauslinien durch Cyanid erreicht werden. Ob tatsächlich eine maximale Reduktion des NADPH Pools in der BL/6J erreicht wird, ist nicht genau prüfbar.

Die Kalibrierung des  $\text{FAD}^+$ -Signals ist unabhängig von der Nnt und ist in der BL/6J und BL/6N vergleichbar (Graph C und D).

Die maximale Oxidation des NAD(P)H Pools in der BL/6J Maus kann also nur mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreicht werden. Allerdings ist die Kalibrierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  kritisch zu beurteilen, da die Zellen sterben und ihre Form am Ende verändern. Die Formveränderung führt zu falschen Werten, da der Messpunkt dabei verschoben wird. Um dieser kritischen Limitierung der Methode aus dem Weg zu gehen, dient als zeitlicher

Orientierungspunkt für die maximale Oxidation des Redoxstatus der Jackson Maus das  $FAD^+$  Signal. Die maximal erreichbare Oxidation des  $FAD^+$  Signals wird auch in der Jackson Maus durch FCCP erreicht, da hier die maximale Oxidation nicht Nnt abhängig ist. Wird dieser Wert mit  $H_2O_2$  ein zweites Mal erreicht, ist dies der Zeitpunkt der maximalen Oxidation auch des  $NAD(P)H$  Pools in den BL/6J Mäusen. Als Kontrolle dieser Methode dienten die Zeitpunkte der maximalen Oxidation des  $NADPH$  Pools in den BL/6N Mäusen unter FCCP und  $H_2O_2$ , welche mit den  $FAD^+$  Zeitpunkten der maximalen Oxidation übereinstimmten. Aus den gewonnenen Daten, konnte ein Korrekturfaktor gewonnen werden um den Redoxstatus der BL/6J Maus zu extrapolieren.

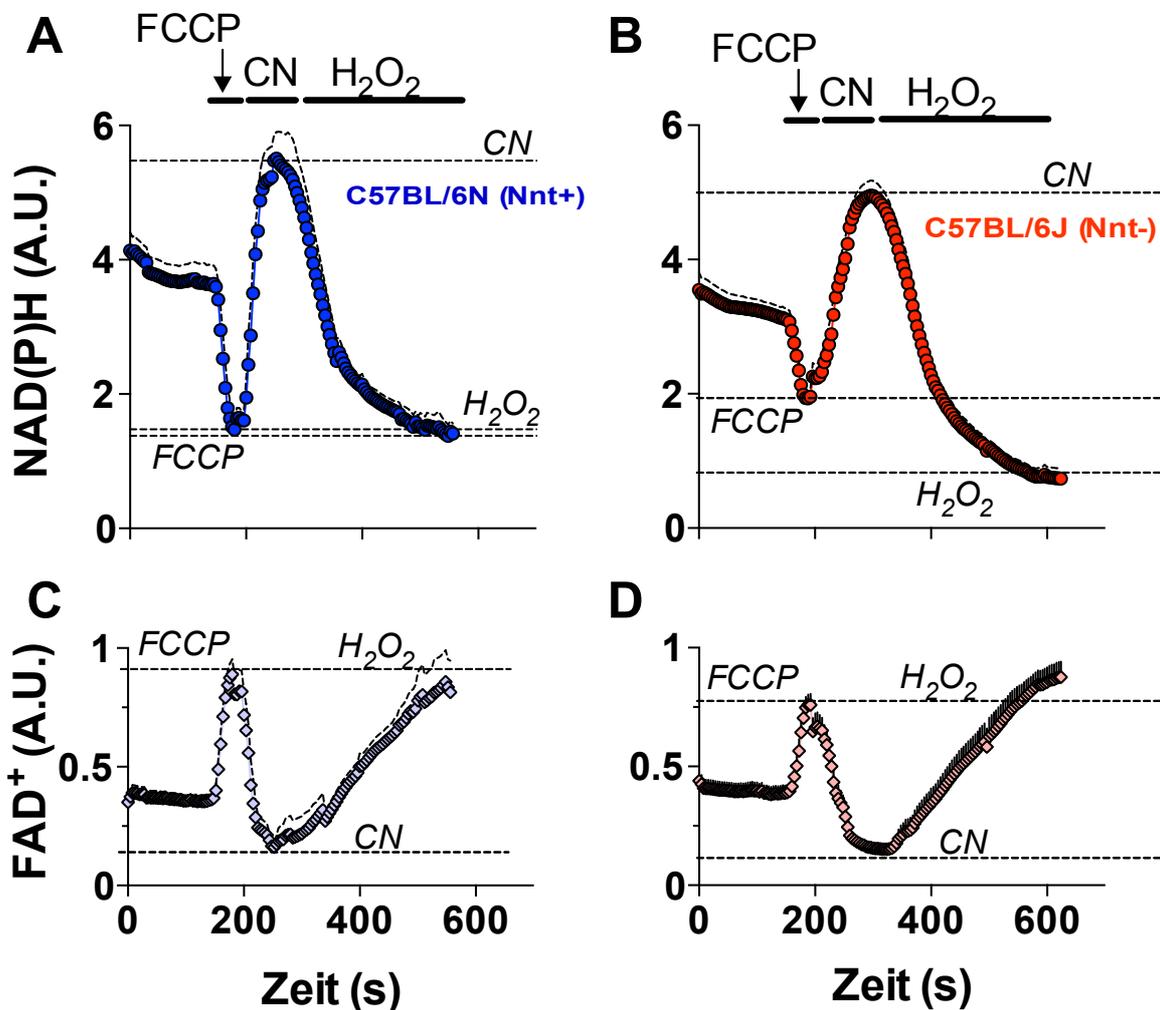


Abbildung 13 Unterschiede in der Kalibrierung von  $NAD(P)H$  (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht)

**A** und **C** Kalibration  $NAD(P)H$  und  $FAD^+$  in BL/6N Maus durch FCCP, Cyanid und  $H_2O_2$ . **B** und **D** Kalibration  $NAD(P)H$  und  $FAD^+$  in BL/6J Maus.

### 6.2.3 Maximal oxidierbarer Pool von FADH und NAD(P)H

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kalibrierungsexperiment. Es wird der maximal oxidierbare Redox Pool von FADH und NAD(P)H in der BL/6J und BL/6N Maus dargestellt. Der NAD(P)H Redoxstatus lässt sich in BL/6J und BL/6N mit  $H_2O_2$  maximal oxidieren, mit FCCP gelingt keine maximale Oxidation des Redoxstatus in der BL/6J Maus. Bei diesem Teil handelt es sich um den NADPH Pool. Der Unterschied bezieht sich auf 23%. Dies ist also der angewendete Korrekturfaktor zur Erweiterung der Kalibrierungsbreite in der BL/6J. In den Versuchen zum Redoxstatus (6.2.1) bestehen nach Korrektur zwischen BL/6J und BL/6N Maus keine signifikanten Unterschiede.

Bei dem Kalibrierungsversuch handelt es sich um einen Schlüsselversuch dieser Studie. Er zeigt, dass bei Entkopplung oder Oxidation des NADH Pools der NADPH Pool in der BL/6J „geschützt“ ist. Da NADPH und die antioxidative Kapazität des Mitochondriums eng mit einander korrelieren, bedeutet dies, dass auch die antioxidative Kapazität in der BL/6J bei Oxidation des NADH Pool erhalten bleibt.

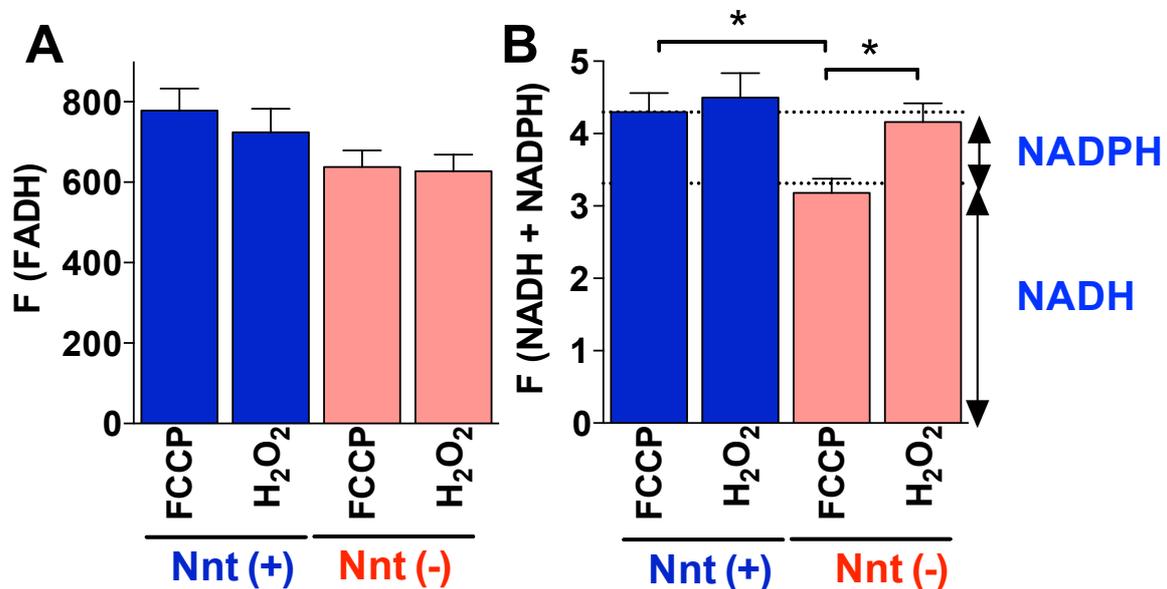


Abbildung 14 Maximal oxidierbarer Pool von NAD(P)H und FADH (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht)

**A** Keine signifikanten Unterschiede von F (FADH) **B** Keine maximale Oxidation des Redoxstatus in der BL/6J Maus durch FCCP möglich, Oxidation um 23% geringer als unter  $H_2O_2$ .

#### 6.2.4 Superoxid und Wasserstoffperoxid Messung mittels MitoSox und DCF

Bei der Messung der Radikalproduktion während des Stressprotokolls wurden Superoxidradikale mit dem Farbstoff MitoSox und  $H_2O_2$  mit dem Farbstoff DCF bestimmt. Während es keine Unterschiede bei der Superoxidproduktion gab, war die kumulative  $H_2O_2$  Formation in den BL/6J Mäusen am Ende des Stressprotokolls signifikant erhöht (Abb. 15B). Dies scheint auf den ersten Blick ein Widerspruch zu der vorangegangenen Beobachtung der „geschützten“ antioxidativen Kapazität in der BL/6J zu sein.

Grund für den scheinbaren Widerspruch sind unterschiedliche Redoxstatus. Im Kalibrierungsexperiment zeigt sich ein Schutz der antioxidativen Kapazität in der BL/6J Maus bei einem oxidierten Redoxstatus, während es sich bei den Bedingungen im intakten Zellexperiment um einen reduzierten Redoxstatus unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation handelt. So zeigt die Abbildungen 12B etwa keinen Abfall des Redoxstatus während des Stressprotokolls, eher kommt es gegen Ende nach Reduktion der Stimulationsfrequenz von 5 Hertz auf 0.5 Hertz zu einer Erhöhung des Redoxstatus.

Das Fehlen der Nnt führt also unter reduzierten Bedingungen zu einem vermehrten Auftreten von  $H_2O_2$ . Laut Rydström ist die Nnt der effektivste Lieferant von reduziertem NADPH, also ein wichtiger Bestandteil der antioxidativen Kapazität (Rydström 2006). Durch Nickel et al. wurde zudem gezeigt, dass keine kompensatorische Heraufregulation der anderen  $NADP^+$  reduzierenden Enzyme (Malat Enzym und Isocitratdehydrogenase) in der BL/6J Maus stattgefunden hat (Nickel et al. 2015). Damit fehlt die Nnt ersatzlos für die enzymatische Regenerationskapazität von oxidiertem  $NADP^+$ . Dieser Aspekt und die Abbildung 15B sind ein Hinweis auf eine mögliche gestörte Anpassung der antioxidativen Kapazität bei vermehrter Radikalformation in einem reduzierten Redoxstatus. Dass es keine Unterschiede in der Superoxidmessung mittels MitoSox gab, legt nahe, dass sich die Superoxidformation an der ETC und die Superoxidentgiftung über die mitochondriale Superoxiddismutase in ihrer Summe in beiden Mauslinien nicht unterscheidet (Abb. 15A).

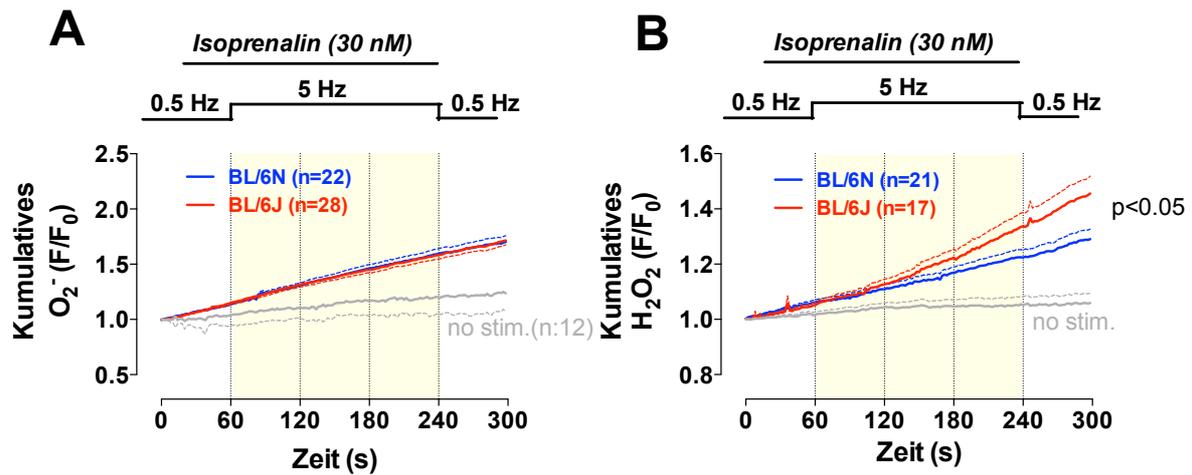


Abbildung 15 Superoxid und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Messung mittels Mitosox und DCF (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht)

An intakten Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation werden die Superoxidproduktion mit Mitosox und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion mit DCF im zeitlichen Verlauf bestimmt. **A** keine Unterschiede in der Superoxidproduktion in BL/6J und BL/6N Mäusen. **B** erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion in den Nnt-defizienten BL/6J Mausmyozyten.

### 6.2.5 Zellverkürzung während des Stressprotokolls

Die Bestimmung der Kontraktionsdaten erfolgt zu vier verschiedenen Zeitpunkten des Stressprotokolls. Zunächst während der 0.5 Hz Stimulation vor der Zugabe des  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin (0.5 Hz), bei beginnender Wirkung von Isoprenalin auch noch mit 0.5 Hz Stimulation (0.5 Hz/Iso), während  $\beta$ -adrenerger Stimulation unter 5 Hz Stimulation (5 Iso) und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Erholungsphase (0.5 w/o).

In Abb. 16A zeigt sich eine deutlich stärkere Sarkomerverkürzung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation und 5Hz Stimulation. Während die Basis (Baseline) nur ein wenig kürzer wird, nimmt der Peak der Verkürzung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation deutlich zu. Der Begriff Verkürzung ist dem der Kontraktion zu präferieren, da die Kardiomyozyten unter dem gegebenen Versuchsaufbau keine (oder nur geringe) mechanische Arbeit leisten müssen, wie es bei einer Kontraktion passiert. In Abb. 16B ist die Sarkomerverkürzung in Prozent der Baseline angegeben. In Graph C und D werden Werte für die zeitliche Dimension der Verkürzung dargestellt. Graph C bildet die Relaxationszeiten (RT) 50 und 90 ab, diese nehmen unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation deutlich ab. Graph D stellt die Zeit bis zum Höchstwert (Verkürzungszeit) dar, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation nimmt die Verkürzungszeit deutlich ab, die Verkürzung ist schneller. In der Erholungsphase nimmt die Verkürzungszeit wieder zu. In der Zellverkürzung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen BL/6J und BL/6N Kardiomyozyten.

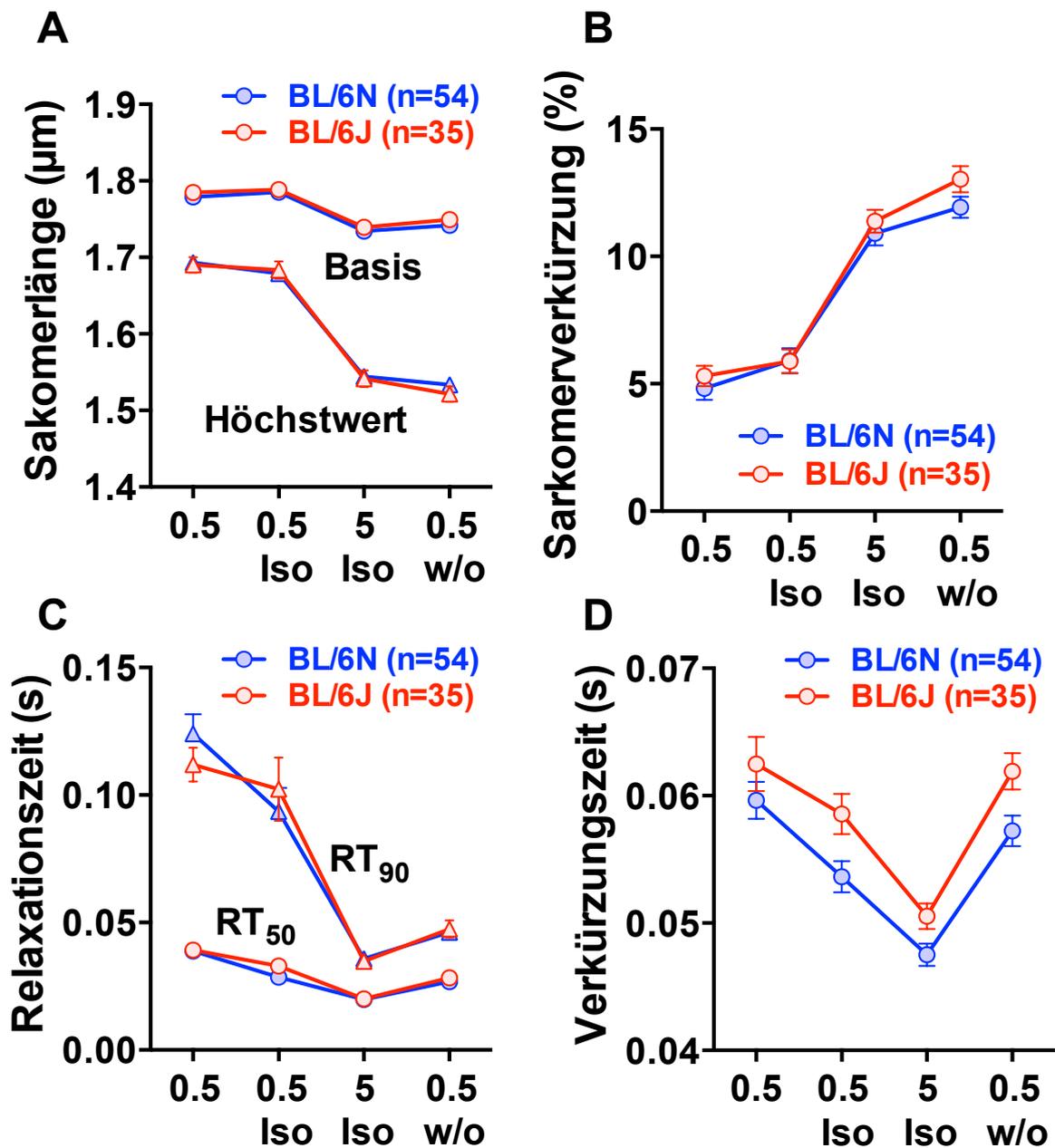


Abbildung 16 Zellverkürzungsmessung

**A:** Diastolische Sarkomerlänge als Basis, systolische Sarkomerlänge als Höchstwert dargestellt **B:** Sarkomerverkürzung in Prozent von der Basis (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht) **C:** Relaxationszeiten nach 50ms und 90ms; Relaxation time (RT) 90/50 **D:** Zeit bis zur maximalen Kontraktion, Verkürzungszeit in Sekunden

### 6.2.6 Messung des zytosolischen Calcium mittels Indo

Die Bestimmung der Calciumdaten erfolgt wie bei den Kontraktionsdaten zu vier verschiedenen Zeitpunkten während des durchgeführten Stressprotokolls. Vor  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei 0.5 Hz (0.5), bei beginnender Wirkung von Isoprenalin auch noch mit 0.5 Hz Stimulation (0.5 Iso), während  $\beta$ -adrenerger Stimulation unter 5 Hz Stimulation (5 Iso) und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation in der Erholungsphase (0.5 w/o).

In Abbildung 17A zeigt die Basis das diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  an, während der Höchstwert für die maximale systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steht, welche in beiden Mäusen unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zunimmt. In den BL/6N Mäusen steigt die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation an, während sie in den BL/6J Myozyten weitgehend konstant bleibt. Graph B bildet die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  Amplitude ab, welche folglich auch unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ansteigt und in beiden Mäusen vergleichbar ist. Graph C und D zeigen kinetische Parameter der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Graph C zeigt anfängliche Unterschiede in der RT 80, die unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation nicht mehr nachweisbar sind. Graph D zeigt keine Unterschiede in der Zeit zum Maximum zwischen BL/6J und BL/6N. Die Daten zeigen insbesondere vor  $\beta$ -adrenerger Stimulation und unter Isoprenalin Gabe eine breitere Streuung. In der Summe wiesen alle Analysen der Zellverkürzung und des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf.

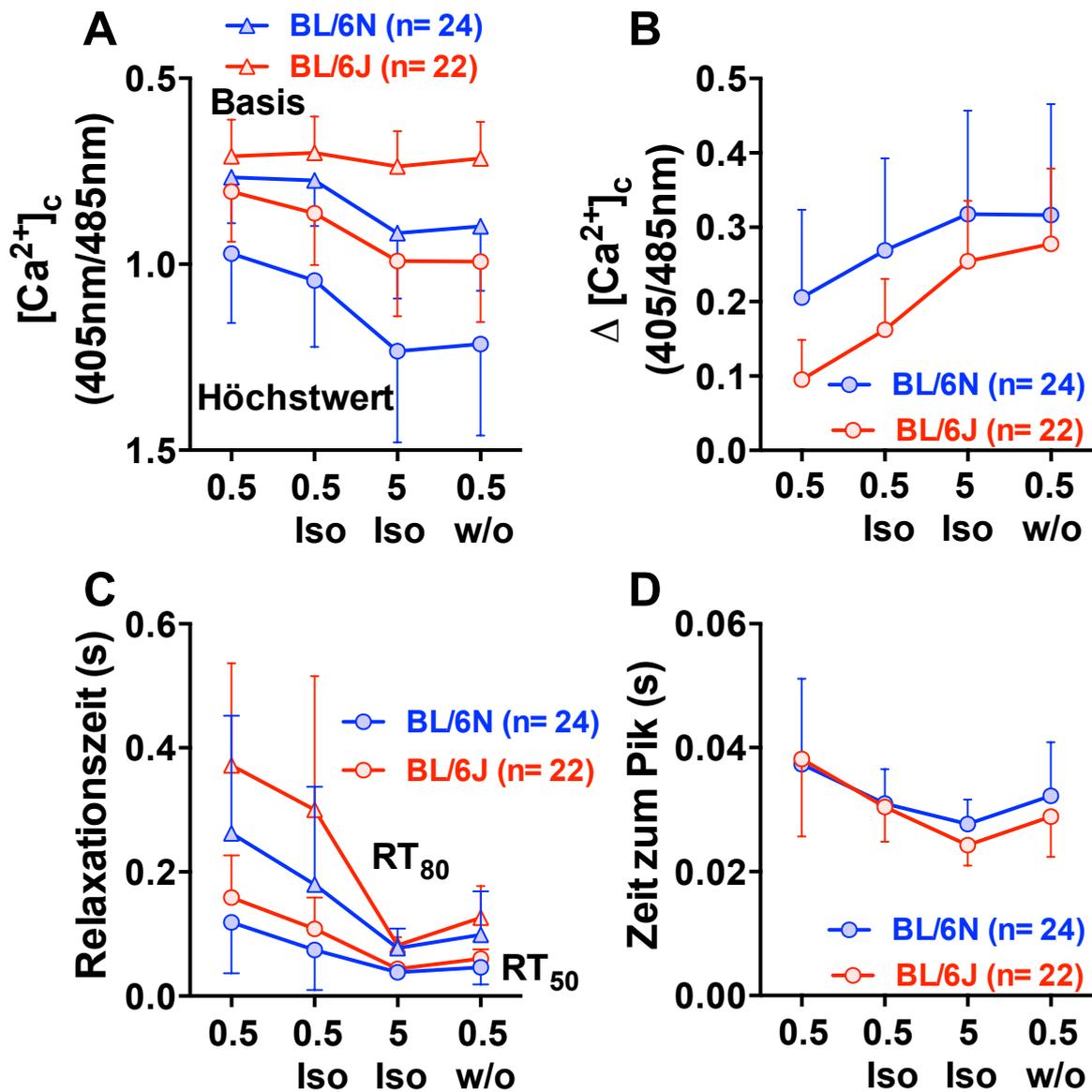


Abbildung 17 Messung des zytosolischen  $Ca^{2+}$  mittels Indo 1AM

**A:** Diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) ist Basis; Systolische  $Ca^{2+}$ -Konz. ( $[Ca^{2+}]_c$ ) ist Höchstwert (in Nickel et al. 2015 veröffentlicht) **B:** Abstand zw. Basis und Höchstwert ist die  $Ca^{2+}$ -Amplitude ( $\Delta [Ca^{2+}]_c$ ) **C:** Relaxationszeiten nach 50ms und 80ms; Relaxationszeit (RT) 80 und 50 **D:** Zeit bis zur maximalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ), Zeit bis zum Pik in Sekunden

## **7 DISKUSSION**

### **7.1 Diskussion der Ergebnisse**

#### **7.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In den Vorversuchen wurden mitochondriale enzymatische Vorgänge in einem myokardialen Zellhomogenat mit weitestgehend aufgelösten Zellstrukturen charakterisiert. Hierzu wurden Experimente mit den klassischen Blockern der Atmungskettenenzyme, Blockern der Nnt, der NOX und den Substraten NADH/NAD<sup>+</sup> und NADPH/NADP<sup>+</sup> durchgeführt. Detektiert wurden der Redoxstatus von NAD(P)H am Photometer und die Chemolumineszenz von Lucigenin mittels Luminometer. Die initiale Zielsetzung, Charakterisierung der ROS Formation durch die NOX, wurde zu Gunsten der Nnt und der Frage nach ihrer Bedeutung verlassen. In Abhängigkeit der NAD<sup>+</sup>-Konzentration wurde NADPH über die reverse Nnt Reaktion via NADH an der ETC oxidiert. Zur weiteren systematischen Untersuchung der Nnt wurde die häufig verwendete Mauslinie BL/6 von Jackson Laboratories verwendet. Diese weist eine Mutation auf, die zu einem Funktionsverlust der Nnt führt, während die BL/6N Mauslinie über eine intakte Nnt verfügt.

Isolierte Kardiomyozyten von BL/6J und BL/6N wurden in der Zellkontraktionsanlage einem Stressprotokoll unterzogen, um die Parameter Redoxstatus (NAD(P)H/FAD), zytosolisches Ca<sup>2+</sup>, die Zellkontraktion, das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) und ROS zu untersuchen.

Es konnten Unterschiede bei der Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD festgestellt werden und es zeigte sich eine signifikant erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion mittels DCF in den BL/6J Mäusen (6.2.4), welche in der Erholungsphase nach hochfrequenter (5 Hz) Stimulation unter Isoprenalin auftrat. Alle anderen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die Unterschiede bei der Autofluoreszenz bestanden, weil das Kalibrieren des Redoxstatus der BL/6J mit der üblichen Methode nicht korrekt durchgeführt werden konnte. Ursächlich war die fehlende reverse Nnt Reaktion, die die Oxidation des NADPH Pools durch FCCP verhinderte. Alternativ gelang die Kalibrierung mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches Nnt-unabhängig den NADPH Pool oxidiert.

---

Die fehlende Oxidation von NADPH in der BL/6J ist prinzipiell als protektiv zu werten, da NADPH die mitochondriale antioxidative Kapazität regeneriert. Dies widerspricht jedoch der ersten Beobachtung einer erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion in der BL/6J. Dieser scheinbare Widerspruch kann durch den unterschiedlichen mitochondrialen Redoxstatus erklärt werden.

### **7.1.2 Vermehrte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion in BL/6J während reduzierter mitochondrialer Bedingungen**

In der Erholungsphase des Stressprotokolls (5.3.2.) fiel ein betont reduzierter FADH und NAD(P)H Pool auf (Abbildung 13B). Dafür ursächlich ist am ehesten eine gesteigerte Aktivität des Citratzyklus durch eine erhöhte mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach hohen Stimulationsfrequenzen und  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei gleichzeitig verminderter Arbeitslast durch Reduktion der Stimulationsfrequenz.

Wie in der Einleitung (3.3.10) beschrieben, führen reduzierte mitochondriale Zustände zu einer vermehrten Formation von Superoxidradikalen. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Anpassung der antioxidativen Kapazität via Vorwärts-Modus der Nnt (reduzierter NADH Pool = reduzierter NADPH Pool = reduzierte antioxidative Kapazität) (Rydström 1977). Da die Superoxidproduktion (MitoSox) in beiden Mäusen gleich war und wider Erwarten kein Anstieg in der Erholungsphase zu verzeichnen war, ist die Beobachtung einer erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion in BL/6J unter reduzierten Bedingungen am ehesten durch eine unzureichende Anpassung der antioxidativen Kapazität zu erklären.

Dass die BL/6J Mäuse trotz dieser fehlenden protektiven Nnt Vorwärts-Reaktion einen herzgesunden Phänotyp ausbilden, lässt sich durch die experimentellen Bedingungen erklären. In Vitro entstand ein stark reduzierter Redoxstatus, der in Vivo so niemals auftritt, da durch kontinuierliche kardiale Arbeit entstehendes ADP den mitochondrialen Redoxstatus oxidiert. In Vitro ist die Arbeitslast der Kardiomyozyten ein bloßes „Switchen“.



### 7.1.3 Fehlende Oxidation von NADPH in BL/6J unter oxidierten mitochondrialen Bedingungen

Unter Punkt 6.2.3. der Ergebnisse zeigt den Erhalt des NADPH Pools in der BL/6J nach mitochondrialer Entkopplung mittels FCCP (= Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus). Anders als beispielweise in der R-ORB (3.3.10) von Aon et al postuliert (Aon et al. 2010), geht die mitochondriale Oxidation in der BL/6J nicht gleich mit einer Oxidation von NADPH, respektive der antioxidativen Kapazität, einher. Diese besondere Ausnahme ist durch die „Loss of function“ Mutation der Nnt erklärbar, die eine schnelle Oxidation von NADPH über die reverse Nnt-Reaktion verhindert.

In der BL/6N verhält sich der mitochondriale Redoxstatus physiologisch und die Entkopplung führt zum Verlust des NAD(P)H Pools. Die Nnt oxidiert den NADPH Pool über die reverse Nnt Reaktion, wodurch  $\text{NAD}^+$  reduziert und Protonen aus der Matrix gepumpt werden (siehe Abbildung 19). Statt FCCP ist in der Abbildung der physiologische „Entkoppler“ der Atmungskette ADP zu sehen.

Als Folgeversuch wurden in unserem Labor Messungen an isolierten Mitochondrien durchgeführt. Unter anderem wurden die „state 4 respiration“, eine definierte reduzierte mitochondriale Versuchsbedingung, die durch einen Substratüberschuss und fehlendes ADP induziert wird, und die „state 3 respiration“, eine oxidierte Versuchsbedingung, die durch Hinzugabe von ADP zu „State 4“ entsteht, untersucht. Beim Switch von „state 4“ zu „state 3“ zeigte sich ein signifikanter Anstieg von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (AmplexRed) in BL/6N versus einem Abfall in den BL/6J. Gleichzeitig bestanden keine Unterschiede bei der Superoxid Formation in beiden Mäusen (Daten von Janne Becker) (Nickel et al. 2015). Zusammen mit den Beobachtungen dieser Arbeit suggerieren die Daten, dass

- A) die antioxidative Kapazität in den BL/6J vor Oxidation bei Entkopplung durch das Fehlen der Nnt „geschützt“ ist.
- B) der physiologische Entkoppler ADP in isolierten Mitochondrien der BL/6N über die reverse Nnt Reaktion die antioxidative Kapazität empfindlich reduziert.
- C) Oxidativer Stress immer als Summe von Entgiftung und Formation von ROS angesehen werden muss.

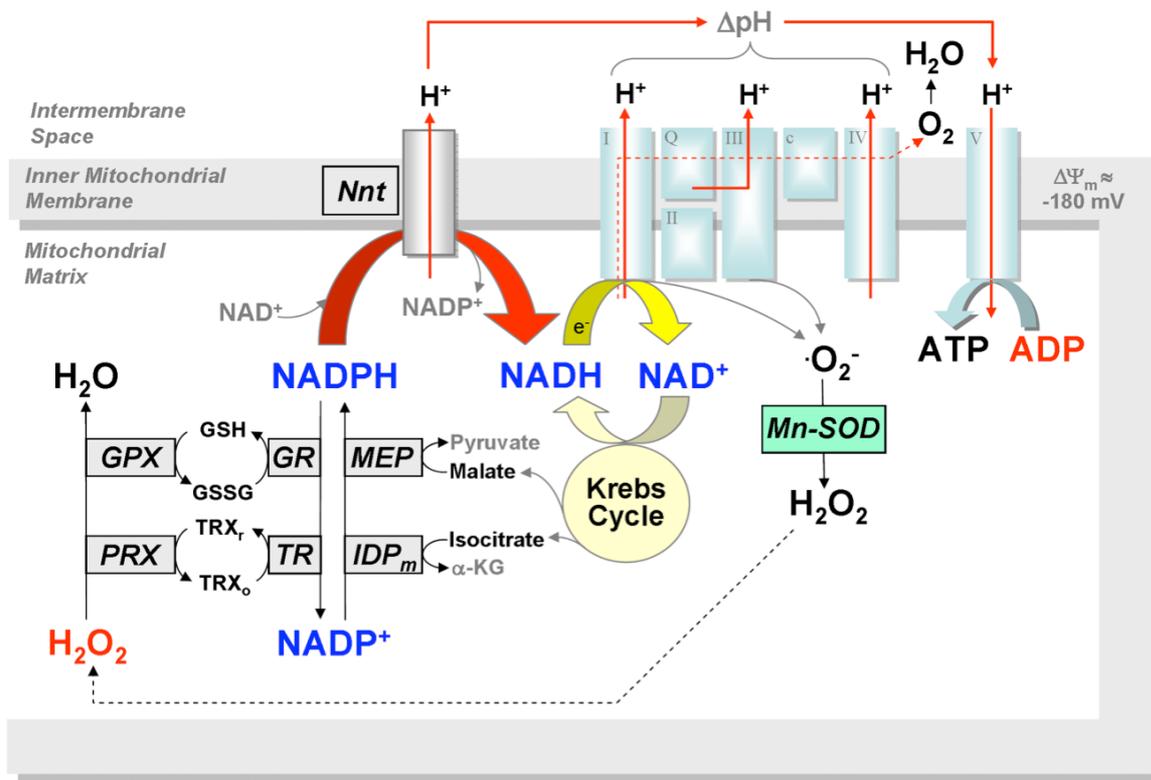


Abbildung 20 ADP induzierte die reverse Nnt Reaktion durch Oxidation von NADH

Die Abbildung fasst den zuvor beschriebenen oxidierten mitochondrialen Redoxstatus unter erhöhter Arbeitslast zusammen. Beginnend rechts oben, unter erhöhter Arbeitslast fällt vermehrt ADP an. Dieses stimuliert die F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> ATPase und dissipiert das Membranpotential. Zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials gibt NADH seine Elektronen an die Atmungskette ab. Diese werden in mehreren Redox-Schritten auf Sauerstoff übertragen. Die dabei freiwerdende Energie wird zur Dislokation von Protonen über die innere mitochondriale Membran verwendet um das Membranpotential zu erhalten. Aufgrund der fehlenden Ca<sup>2+</sup>-Stimulation des Citratzyklus in isolierten Mitochondrien fehlt es an reduziertem NADH. Zur Regeneration wird über die Nnt reduziert NADPH hinzugezogen um NADH zu re-reduzieren und das Membranpotential aufrecht zu halten. Die antioxidative Kapazität geht verloren.

#### 7.1.4 Pathophysiologische Relevanz der reversen Nnt Reaktion bei der Herzinsuffizienz

In vivo geht ein ADP-Anstieg bei erhöhter Arbeitslast unter physiologischen Bedingungen mit einem synergistischen Anstieg des mitochondrialen Calciums und somit mit einer schnellen Regeneration von NADH über den Citratzyklus einher. Man spricht auch von ADP als Pull Faktor und Ca<sup>2+</sup> als Push Faktor (siehe Einleitung 3.3.4.) (Balaban 2002).

---

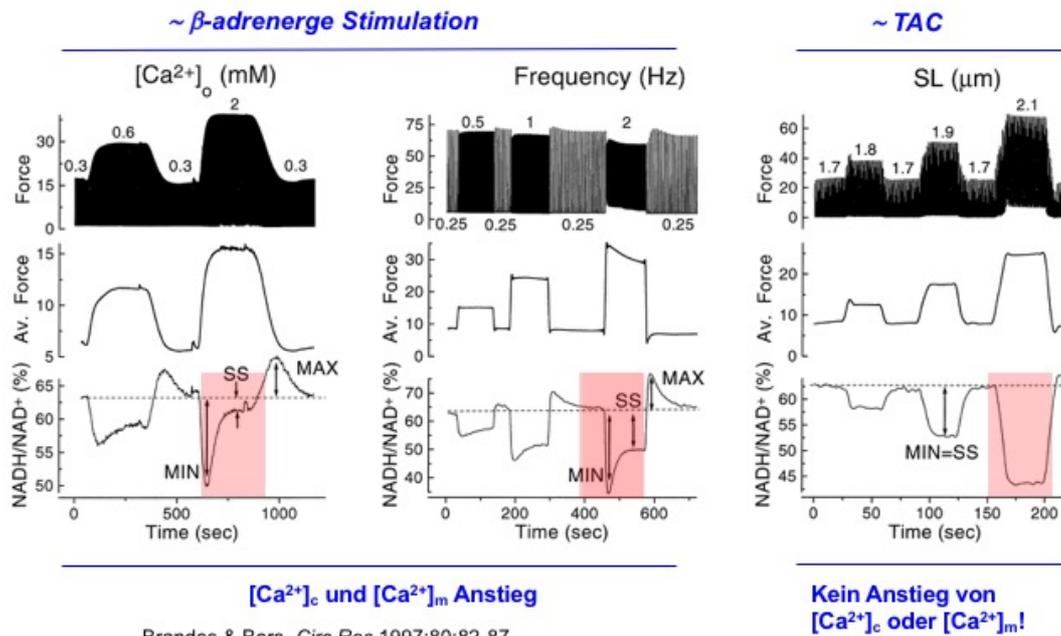
Bei der Herzinsuffizienz gerät diese feine Abstimmung zwischen Energienachfrage (ADP) und Angebot ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem Gleichgewicht. Zum einen scheint der ATP-Bedarf bei erhöhten zytosolischen ADP-Konzentrationen (Neubauer 2007) nicht ausreichend gedeckt zu sein. Zum anderen bestehen die folgenden Indizien für eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte Aktivität des Citratzyklus:

- A) Eine chronische Sympathikus-Aktivierung mit Herabregulation von  $\beta$ -Rezeptoren (Brodde et al. 1989)
- B) Eine verminderte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung (Lindner et al. 1998)
- C) ein erhöhter mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Export (Maack et al. 2006)

Theoretisch begünstigen diese Beobachtungen bei der Herzinsuffizienz eine reverse Reaktion der Nnt mit Verlust der antioxidativen Kapazität und konsekutiver Entstehung von oxidativem Stress, der ursächlich zur Progression und Entstehung beiträgt.

Um der Bedeutung der reversen NNT Reaktion in vivo nachzugehen, wurde in unserem Labor durch eine pathologische Arbeitslasterrhöhung und fehlende ausgleichende  $\beta$ -adrenerge Stimulation charakterisierte HF-Modell der chronischen Nachlasterrhöhung durch Aortenligatur (TAC) an den BL/6J und BL/6N verwendet.

Durch Brandes et al. konnte gezeigt werden, dass es durch Vorspannung in Myokardtrabekeln (Sarkomerlänge, SL) zu einer verstärkten und anhaltenden Oxidation des NAD(P)H Pools kommt (Brandes & Bers 1997), wohingegen es in Trabekeln, welche durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder eine Frequenzerhöhung stimuliert werden, zu keiner anhaltenden Oxidation des Redoxstatus kommt. Diese letzteren Bedingungen lassen sich mit einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation vergleichen, die zu einer Erhöhung des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  führt (Kohlhaas & Maack 2011), während die bloße Vorspannung des Trabekels das TAC Modell simuliert (Abbildung 21).



Brandes & Bers, *Circ Res* 1997;80:82-87

Abbildung 181 Arbeitslasterhöhung in Herztrabekeln auf drei unterschiedliche Weisen

In einer früheren Studie von Brandes et Bers (Brandes & Bers 1997) wurden Herztrabekel auf drei unterschiedliche Arten einer erhöhten Arbeitslast ausgesetzt und der Redoxstatus von NAD(P)H bestimmt.

Im ersten Versuch wurde die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erhöht, im zweiten Versuch die Stimulationsfrequenz und im dritten Versuch die Sarkomerlänge der Trabekel. In den ersten beiden Versuchen findet nach einer initialen Oxidation des Redoxstatus (durch ADP induzierte Beschleunigung der Atmung) eine Erholung des Redoxstatus statt. Diese kann durch mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme mit folgender Beschleunigung des Citratzyklus erklärt werden. Im dritten Versuch kommt es zu keinem Anstieg des Ca<sup>2+</sup> (keine Reduktion des mitochondrialen Redoxstatus). Die ersten beiden Versuche sind vergleichbar mit einer β-adrenergen Stimulation, der dritte Versuch zeigt, was möglicherweise im TAC Modell passiert: ein alleiniger Anstieg der Arbeitslast ohne Anstieg des mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>.

Nach 6 Wochen TAC erfolgte die Charakterisierung des Phänotyps der BL/6N und BL/6J durch die Bestimmung des Verhältnisses des Herzgewichtes zur Tibiallänge, des Lungenwassers, durch die Bestimmung von oxidativem Stress in den Kernen mit 8-Hydroxy-Diguanosin-Färbung und durch eine echokardiographische Bestimmung der linksventrikulären Funktion. Das Verhältnis von Herzgewicht zur Tibiallänge nahm in beiden Mäusen nach 6 Wochen TAC vergleichbar zu. Allerdings wiesen die BL/6N Mäuse eine verringerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und vermehrt Lungenwasser auf. Hierzu passend zeigte sich in der 8-Hydroxy Diguanosin Färbung ein vermehrtes Auftreten von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und eine verminderte linksventrikuläre Funktion in

den BL/6N TAC Mäusen. Weiterhin konnte ein oxidiertes Glutathion- und Thioredoxin-Pool in den BL/6N nachgewiesen werden (Nickel et al. 2015).

In den BL/6J führte das Fehlen der Nnt zu einer Entkopplung der antioxidativen Kapazität von der Nachfrage nach ATP. Somit blieb die antioxidative Kapazität im TAC Modell erhalten und konnte das Herz effektiv gegen ROS schützen. Gleiches galt für die Versuche an isolierten Mitochondrien, in denen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion von State 4 nach State 3 durch Erhalt der antioxidativen Kapazität abfällt, während sie in den BL/6N zunahm.

Das TAC Modell war somit gut geeignet, um die pathophysiologische Relevanz der reversen Nnt Reaktion mit Verlust der antioxidativen Kapazität zu untersuchen.

## 7.2 Aussichten und Aspekte

### 7.2.1 Die klinische Bedeutung der reversen Nnt Reaktion

Die Abbildung 22 fasst die pathophysiologischen Erkenntnisse der letzten Abschnitte zusammen und überführt sie in einen klinischen Kontext.

Ein messbarer Marker des kardialen Energiezustandes ist die Phosphokreatin zu ATP Ratio, welche mittels P<sup>31</sup>-MRS gemessen werden kann und als Index für den Energiezustand des Herzens dient (Hudsmith & Neubauer 2008). Die Ratio ist bei Herzinsuffizienz deutlich erniedrigt und korreliert invers mit der Sterblichkeit (Neubauer et al. 1997), wodurch der Energiemangel zu einem wesentlichen Merkmal der Herzinsuffizienz wurde (Neubauer 2007; Ingwall 2006).

Kennzeichnend hierfür ist eine erhöhte ADP-Konzentration, die allein oder zusammen mit einer reduzierten mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu einer Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus führt. Eine konsekutive reverse Reaktion der Nnt würde aufgrund einer Reduktion der antioxidativen Kapazität zu oxidativem Stress führen. Oxidativer Stress führt über eine Öffnung des „Mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) zu Apoptose und Nekrose (Kowaltowski et al. 2001; Halestrap 2004; Halestrap 2005) und begünstigt durch Aufrechterhaltung des oxidierten Redoxstatus die Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz.

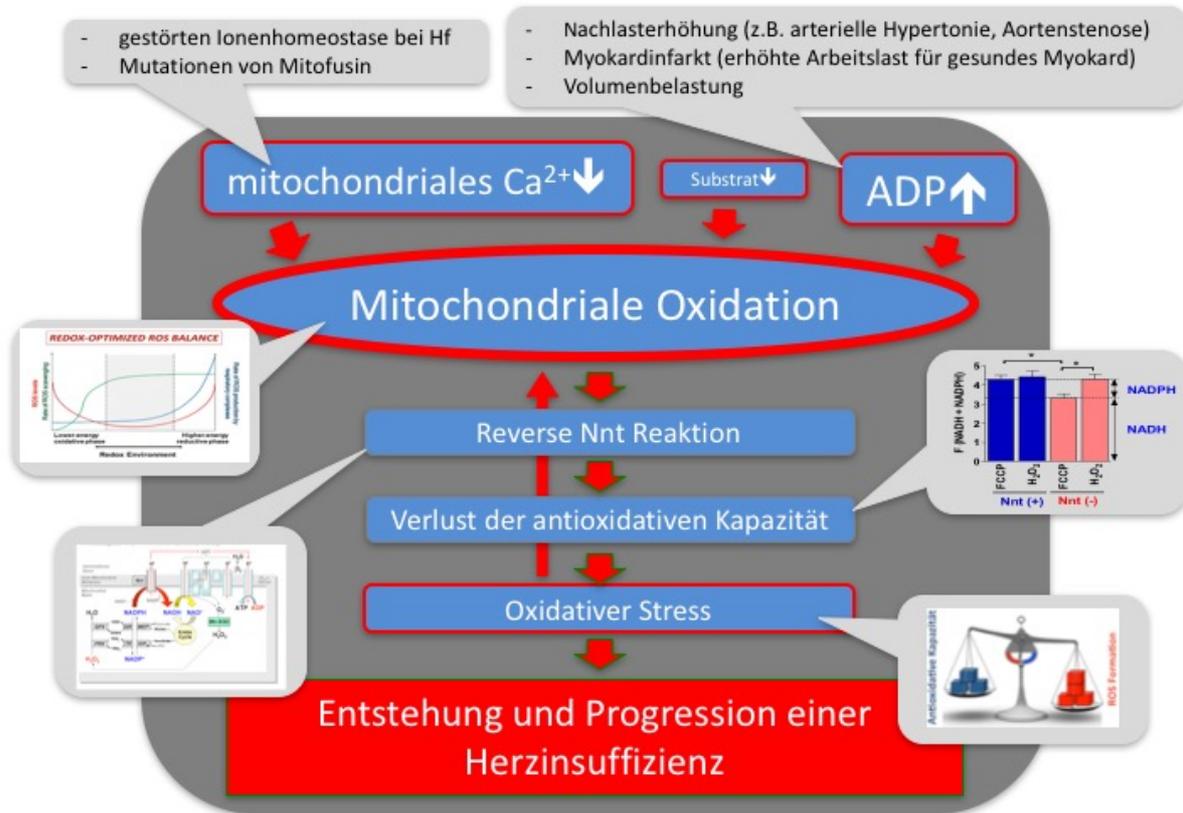


Abbildung 22 Mitochondriale Oxidation und Herzinsuffizienz

Die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz ist die arterielle Hypertonie. Hierbei ist eine erhöhte Nachlast mit folglich erhöhten ADP-Konzentrationen denkbar. Im Hypertonie-Modell am Schwein zeigte sich ein mitochondrialer Schaden und eine Dysfunktion (Eirin et al. 2014). Ide et al. konnten in einem Infarktmodell an Mäusen oxidativen Stress in nicht infarzierten Myokardbereichen nachweisen (Ide et al. 2001). Eine Erklärung ist eine erhöhte kompensatorische Arbeitslast der nicht infarzierten Myokardbereiche bei gleichzeitig fehlender Adaptation.

Als weiteres Tiermodell der Herzinsuffizienz wird das Tachykardie-induzierte Herzinsuffizienz Modell (Moe 1999) verwendet; klinisches Pendant ist die Tachykardiomyopathie (z.B. durch Vorhofflimmern). Hierbei wird als Mechanismus eine Energiedepletion diskutiert (Umana et al. 2003).

Bei Gao et. al wird eine Kardiomyopathie bei Hämochromatose beschrieben (Gao et al. 2010), die wie eine Doxorubicin Behandlung (Ichikawa et al. 2014), zu einer Eisenüberladung und Dysfunktion des Mitochondriums führt. Mechanistisch müsste auch eine vermehrte ROS Produktion mittels MPTP und direkter Oxidation von

Glutathion und Thioredoxin zur Oxidation des gesamten mitochondrialen Redoxstatus über die Vorwärts Reaktion der Nnt führen (siehe Abbildung 22).

Ein Verlust von Mitofusin 2 (Mfn2), welches zu einer festen Bindung von SR und Mitochondrien beiträgt, führt zu einer Störung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und hierdurch zu einer Herzinsuffizienz (Chen et al. 2012).

Bei der Herzinsuffizienz kommt es trotz erhöhter Fettsäurespiegel im Plasma aufgrund einer Herabregulation des Fettsäuretransporters CPT1 zu einer verminderten Aufnahme von Fettsäuren ins Mitochondrium. Gestört ist auch die Glukose Utilisation: obwohl es zu einem relativen Anstieg kommt, ist der absolute Betrag vermindert (Abel et al. 2011; Nickel et al. 2013; Kolwicz et al. 2011). Ein Substratmangel ist eine weitere denkbare Ursache mitochondrialer Oxidation.

Die moderne Herzinsuffizienztherapie „entlastet“ das Herz; Diuretika verringern die Vorlast, die Hemmung des RAA Systems verringert Nachlast und Vorlast und Betablocker verringern über Senkung der Herzfrequenz und ausbleibende Phosphorylierung von Enzymen den myokardialen Energieverbrauch. Indirekt führt die moderne Herzinsuffizienzmedikation somit sehr wahrscheinlich zu einem Abfall des ADP/ATP Verhältnis mit möglichem konsekutivem Erhalt der antioxidativen Kapazität. Bei Sheeran et al. konnte gezeigt werden, dass die Nnt-Aktivität bei Herzinsuffizienz in humanem Myokard um 18% reduziert ist (Sheeran et al. 2010), gleiches konnte an BL/6N TAC Mäusen gezeigt werden, während es zu keiner Herabregulation von IDP, Malatenzym oder Aconitase kam (Nickel et al. 2015). Dies ist möglicherweise ein protektiver Mechanismus, um den Verlust der antioxidativen Kapazität über die reverse Nnt Reaktion zu vermindern.

### **7.2.2 Oxidativer Stress als pharmakologisches Target der HF Therapie**

Bendavia oder auch SS-31 ist ein Peptid, welches in die mitochondrialen Prozesse eingreift, indem es sich in der inneren mitochondrialen Membran anreichert (Zhao et al. 2004). In Tiermodellen wurde der Reperfusionsschaden vermindert, indem Bendavia die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Formation reduzierte und das Membranpotenzial stabilisierte (Kloner et al. 2012). Zurzeit wird Bendavia an Patienten mit ST-Hebungsinfarkt in einer klinischen Studie Phase II getestet (clinical trials no. NCT01572909).

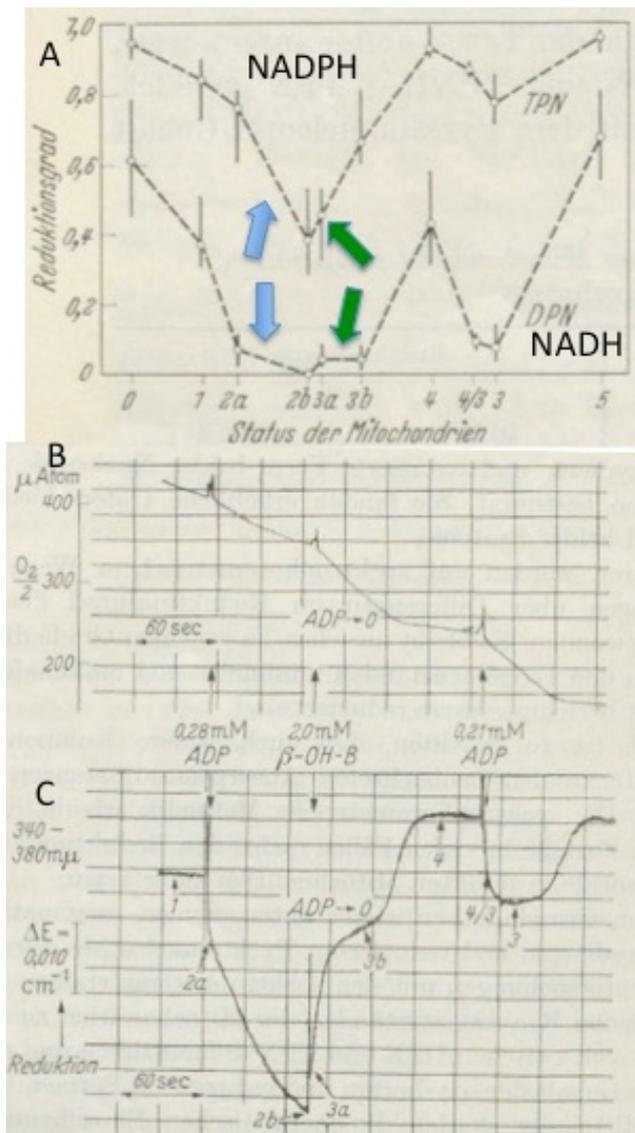
Zur Therapie der Herzinsuffizienz läuft derzeit eine Phase I Studie (Sabbah et al. 2013). Als Wirkmechanismus wird eine Interaktion mit Cardiolipin beschrieben, welche die mitochondrialen Cristae stabilisiert (Birk et al. 2013). Die direkte Behandlung mitochondrialer Pathologien bei Herzerkrankungen erscheint als vielversprechender neuer Therapieansatz.

### 7.2.3 Methodische Grenzen der Differenzierung von NADPH und NADH

Die Differenzierung von NADPH und NADH ist aufgrund der beinahe deckungsgleichen UV-Absorptionsspektren photometrisch nicht möglich und erschwert die Untersuchung der Nnt. Wünschenswert wäre ein direkter Nachweis der dynamischen Veränderungen von NADH und NADPH.

Eine Möglichkeit ist die HPLC (High performance liquid chromatography), diese stößt aufgrund der geringen atomaren Unterschiede (ein Phosphat Atom) jedoch an ihre Grenzen. Eine neuere Methode nutzt unterschiedliche Fluoreszenz-Lebenszeiten (FLIM) von gebundenem NADH und NADPH aus, um diese zu differenzieren (Nickel et al. 2015; Blacker et al. 2014).

Enzyme können allerdings sehr genau zwischen NADH und NADPH unterscheiden. 1959 entschlüsselten Klingenberg und Slenczka die dynamischen Redox-Verhältnisse von reduzierten zu oxidierten NAD(H) und NADP(H) durch Enzymassays in Lebermitochondrien, in denen ein 50:50 Verhältnis zwischen NAD(H) und NADP(H) im Gegensatz zu einem 80:20 Verhältnis in kardialen Mitochondrien besteht. So konnte der NAD(P)H Redoxstatus (mittels UV Spektrum bestimmt) parallel zum Sauerstoffverbrauch (Clark-Elektrode) in NADPH und NADH differenziert werden. Dabei zeigten sich unterschiedliche Oxidations- bzw. Reduktionsgeschwindigkeiten von NADPH und NADH. Bei der Erschöpfung des NADH Pools nach ADP-Zugabe kam es zu einer weiteren Oxidation des NADPH Pools (blaue Pfeile in Abbildung 23). Bei erneuter Substratzugabe wurde zunächst der NADPH Pool reduziert, dann der NADH Pool (grüne Pfeile). Klingenberg und Slenczka bewiesen damit erstmals eine Transhydrogenase Aktivität in intakten Lebermitochondrien nach deren Erstbeschreibung durch Kaplan et al. 1953 (Klingenberg & Slenczka 1959).



A Bestimmung des Reduktionsgrades von NADH und NADPH durch enzymatische Analyse an Lebermitochondrien (jeder Punkt aus 5-12 Analysen an insgesamt 40 verschiedenen Mitochondrien Präparationen gewonnen); B und C parallele Bestimmung von Atmung und NAD(P)H Absorption unter folgenden Bedingungen: Status 1: endogenes Substrat + Mitochondrien; Status 2a: +ADP; Status 2b: +  $\beta$ -Hydroxybutyrat; Status 3a-3b: Erschöpfung ADP; Status 4: Substrat+Mitochondrien Status 3: Substrat+Mitochondrien+ADP

Abbildung 23 Nnt Aktivität in intakten Mitochondrien modifiziert nach (Klingenberg et al.)

#### 7.2.4 Maximale ROS Detektion durch reverse Nnt Reaktion

1973 zeigten Boveris und Chance an isolierten kardialen Mitochondrien von Tauben eine extrem hohe  $H_2O_2$ -Detektion, indem sie unbewusst mittels reverser Nnt Reaktion die antioxidative Kapazität depletierten.

Als Substrat dienten entweder Succinat/Glutamat oder Malat/Glutamat, sie entkoppelten zunächst die innere mitochondriale Membran mit Carbonylcyanid p-Trifluoromethoxy-Phenylhydrazon (0.2mM) und blockierten dann die ETC mit Antimycin A (Boveris & Chance 1973). Ähnliche Bedingungen wählten bereits Loschen et al., um überhaupt erstmalig  $H_2O_2$  in einem biologischen System nachzuweisen (Loschen et al. 1971).

Unter diesen Bedingungen erreichten sie eine 15- bis 20fache Steigerung der  $H_2O_2$ -Detektion verglichen mit der State 4-Bedingung. Während es bei der Wiederholung des Versuches an Leber-Mitochondrien von Ratten nur zu einer Steigerung um den Faktor 1.5 kam. Boveris und Chance folgerten als Ursache "the involvement of a component with variable potential, probably changing its potential to more negative values after de-energization of the membrane" (Boveris & Chance 1973). Die involvierte Komponente, die Boveris und Chance zur Erklärung der Ergebnisse fehlte, war die Nnt. Die Unterschiede zwischen Herz und Leber lassen sich durch die geringere Expression der Nnt in der Leber erklären (Nickel et al. 2015). Durch die Kopplung der Nnt an das mitochondriale Membranpotenzial kommt es bei Entkopplung zu einer Verschiebung der NADH/NADPH-Balance zu Ungunsten des NADPH und damit der antioxidativen Kapazität.

Wird die Atmungskette durch Antimycin A blockiert, ist die Superoxidformation bekanntermaßen sehr hoch. Superoxid wird dann über die Superoxiddismutase zu  $H_2O_2$  dismutiert. Das vermehrte Anfallen von  $H_2O_2$ , bei gleichzeitig durch Entkopplung entstehendem Verlust der antioxidativen Kapazität, führt zu der extremen Detektion von oxidativem Stress. In den Lebermitochondrien ist die antioxidative Kapazität durch eine geringe Expression der Nnt weniger stark an das Membranpotenzial gekoppelt und die antioxidative Kapazität bleibt trotz Entkopplung eher bestehen.

Zudem konnten Boveris und Chance unter hyperbaren Bedingungen in den Lebermitochondrien von Ratten die  $H_2O_2$ -Rate um den Faktor 15 bis 20 steigern, während sie sich in den Herzmitochondrien nur um den Faktor 4 steigern ließ. Diese

Experimente unter hyperbaren Bedingungen sind ebenfalls für die Funktion der Nnt interessant. Obwohl unter hyperbaren Bedingungen vermehrt Superoxidradikale an der Atmungskette entstehen (Turrens 2003), steigt in den Herzmitochondrien das messbare  $H_2O_2$  im Vergleich zu den State 4-Bedingungen kaum an. Dies spricht für eine stabile antioxidative Kapazität in den energetisierten Herzmitochondrien, die der Vorwärts Reaktion der Nnt zu "verdanken" ist. Da die Nnt in den Lebermitochondrien nur gering exprimiert wird, kann NADPH vermutlich nicht so effektiv regeneriert werden. Dies kann der Grund sein, warum sich in den Lebermitochondrien im Vergleich zu den Herzmitochondrien eine vermehrte  $H_2O_2$ - Produktion messen lässt. Aus diesen Versuchen kann somit viel über die Funktion der Nnt abgeleitet und die Bedingungen, unter denen maximaler oxidativer Stress entsteht, verstanden werden.

### 7.2.5 Die physiologische Funktion der Nnt

Die gewonnenen Ergebnisse zusammenfassend, kann der Schluss gezogen werden, dass die Nnt in deutlich oxidierten mitochondrialen Zuständen ungünstig, in deutlich reduzierten Zuständen günstig ist.

Beides sind unphysiologische Zustände, was zu der Frage nach der physiologischen Funktion der ubiquitären Nnt führt. Eine Vermutung ist, dass die Nnt die Energieeffizienz verbessert. Diese ist gerade für das kontinuierlich arbeitende Herz wichtig und erklärt die hohe Expression, denn als "metabolische Vorfahrtsstraße" wird das Herz selbst in Mangelsituationen und Stresssituationen bestmöglich versorgt. Vergeudet nun eine ineffektive oxidative Phosphorylierung unnötig Substrate, wird dies in freier Wildbahn zum entscheidenden evolutionären Nachteil. Wie die Nnt nun das Herz effizienter macht, soll durch eine Metapher aus der Automobiltechnik verdeutlicht werden. Als die ersten Autos Kurven fuhren, drehte das innenliegende Rad aufgrund einer starren Achse durch, was zu einem Energieverlust und Abrieb der Reifen führte. Als Lösung dieses Problems wurde zur Feinabstimmung das Differential erfunden, das die Energie nach dem Prinzip des geringsten Widerstandes auf die Reifen verteilt. Die Nnt lässt sich als molekulares Differential beschreiben, welches die Energie aus dem Membranpotenzial und der NADH/NAD-Ratio zwischen Entgiftung von Sauerstoffradikalen als dem einen und der ATP-Produktion als dem anderen Rad optimal verteilt, um Energieverluste zu minimieren (siehe Abbildung 24).

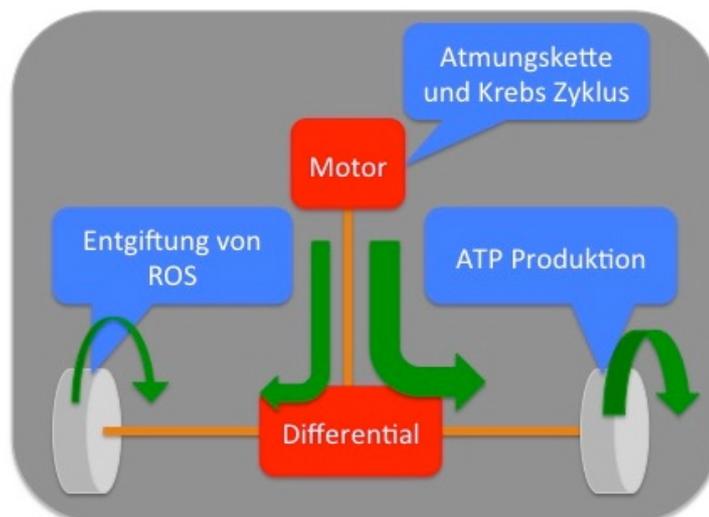


Abbildung 194 Nnt als Differential mitochondrialer Vorgänge

Dies bedeutet, dass unter Bedingungen vermehrten Energieangebotes und somit vermehrter ROS Produktion die Nnt Energie in den NADPH Pool umleiten kann und dieser Pool gleichzeitig die überschüssigen ROS entgiften kann. Die Nnt bietet so auch eine alternative Lösung zu den UCPs hinsichtlich des Schutzes vor reduzierten Zuständen. In der BL/6J Maus werden die UCPs wie bereits beschrieben in den  $\beta$ -Zellen aktiviert, entkoppeln das mitochondriale Membranpotenzial und erniedrigen damit die ROS-Produktion an der Atmungskette; hierbei wird die überschüssige Energie nicht gespeichert, sondern geht in Form von Wärme verloren.

### 7.2.6 The Black Six Strain

Die BL/6J ist die am meisten genutzte Mauslinie in der biomedizinischen Forschung. Diese Arbeit zeigt essenzielle Unterschiede in ihrer mitochondrialen Energieproduktion. Bei Nickel et al. wird auf die vielen Studien mit Nachlasterhöhung und wahrscheinlich unterschätztem oxidativem Stress verwiesen (Nickel et al. 2015). Gerade vor dem Hintergrund von Störungen in der Insulin- und Glukokortikoidsynthese wird zur kritischen Auseinandersetzung mit der genutzten Mauslinie gemahnt um die Verschwendung von Ressourcen durch "strain-unawareness" insbesondere in der translationalen Forschung zu verhindern (Kraev 2014; Fontaine & Davis 2016).

### **7.3 Schlusswort**

Diese Arbeit gab den Anstoß für eine Erklärung, warum pathologische kardiale Arbeitslast mitochondrialen oxidativen Stress erhöht (Nickel et al. 2015) und erinnert daran, dass nicht Textbücher die Richtung von biochemischen Reaktionen festlegen, sondern die lokale Thermodynamik in vivo (Murphy 2015).

Mitochondrialer oxidativer Stress wäre somit auch ein wichtiges Ziel von Therapien, die das maladaptive Remodeling bei Herzinsuffizienz abmildern könnten.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel, E.D., Doenst, T. & Doenst, T., 2011. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*, 90(2), pp.234–242.
- Ago, T. et al., 2008. A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell*, 133(6), pp.978–993.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E. & Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. 70(2), pp.200–214.
- Aon, M.A., Cortassa, S. & O'Rourke, B., 2010. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp.865–877.
- Armoundas, A.A. et al., 2003. Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circulation research*, 93(1), pp.46–53.
- Ashcroft, F. & Rorsman, P., 2004. Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? *Human molecular genetics*, 13 suppl\_1, pp.R21–R31.
- Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Belterman, C.N.W., et al., 2003.  $[Na^+]_i$  and the driving force of the  $Na^+/Ca^{2+}$ -exchanger in heart failure. *Cardiovascular research*, 57(4), pp.986–995.
- Baartscheer, A., Schumacher, C.A., van Borren, M.M.G.J., et al., 2003. Increased  $Na^+/H^+$ -exchange activity is the cause of increased  $[Na^+]_i$  and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovascular research*, 57(4), pp.1015–1024.
- Baines, C.P., Goto, M. & Downey, J.M., 1997. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 29(1), pp.207–216.
- Balaban, R., 2002. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(10), pp.1259–1271.
- Balaban, R.S. et al., 1986. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science*, 232(4754), pp.1121–1123.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), pp.483–495.
- Barja, G., 2004. Free radicals and aging. *Trends in neurosciences*, 27(10), pp.595–600.

- Baughman, J.M. et al., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.341–345.
- Beer, M., Seyfarth, T. & Sandstede, J., 2002. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with **<sup>31</sup>P-SLOOP Magnetic Resonance Spectroscopy**. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(7), pp.1267–1274.
- Bers, D.M., 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21(6), pp.380–387.
- Bers, D.M., 2008. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology*, 70(1), pp.23–49.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(6868), pp.198–205.
- Birk, A.V. et al., 2013. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(8), pp.1250–1261.
- Bizouarn, T., Althage, M. & Pedersen, A., 2002. The organization of the membrane domain and its interaction with the NADP (H)-binding site in proton-translocating transhydrogenase from *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BAA) - Bioenergetics*, 1555(1-3), pp.122–127.
- Blacker, T.S. et al., 2014. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nature communications*, 5, p.3936.
- Boveris, A. & Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal*, 134(3), pp.707–716.
- Böhm, M. et al., 2014. Renal Denervation: A Novel Non-pharmacological Approach in Heart Failure. *Journal of cardiovascular translational research*, 7(3), pp.330–337.
- Brand, M.D. et al., 2004. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free radical biology & medicine*, 37(6), pp.755–767.
- Brandes, R. & Bers, D.M., 1996. Increased work in cardiac trabeculae causes decreased mitochondrial NADH fluorescence followed by slow recovery. *Biophysical journal*, 71(2), pp.1024–1035.
- Brandes, R. & Bers, D.M., 1997. Intracellular Ca<sup>2+</sup> increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circulation research*, 80(1), pp.82–87.
- Brandes, R. & Bers, D.M., 2002. Simultaneous measurements of mitochondrial

- NADH and Ca(2+) during increased work in intact rat heart trabeculae. *Biophysical journal*, 83(2), pp.587–604.
- Brandes, R. et al., 1999. Analysis of the mechanisms of mitochondrial NADH regulation in cardiac trabeculae. *Biophysical journal*, 77(3), pp.1666–1682.
- Brandes, R.P., Weissmann, N. & Schröder, K., 2010. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*, 49(5), pp.687–706.
- Brodde, O.-E., 1993. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 60(3), pp.405–430.
- Brodde, O.-E. et al., 1989. Myocardial beta-adrenoceptor changes in heart failure: concomitant reduction in beta,- and beta2-adrenoceptor function related to the degree of heart failure in patients with mitral valve disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 14(2), pp.323–331.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Chen, Y. et al., 2012. Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses Via Interorganelle Ca<sup>2+</sup> Crosstalk. *circres.ahajournals.org*, 111(7), pp.863–875.
- Corral-Debrinski, M. et al., 1992. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nature genetics*, 2(4), pp.324–329.
- Cortassa, S. et al., 2006. A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophysical journal*, 91(4), pp.1564–1589.
- Cortassa, S. et al., 2003. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophysical journal*, 84(4), pp.2734–2755.
- Cortassa, S. et al., 2009. Control and regulation of mitochondrial energetics in an integrated model of cardiomyocyte function. *Biophysical journal*, 96(6), pp.2466–2478.
- Cortassa, S., O'Rourke, B. & Aon, M.A., 2014. Redox-Optimized ROS Balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(2), pp.287–295.
- de Souza-Pinto, N.C. et al., 2001. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer research*, 61(14), pp.5378–5381.
- De Stefani, D. et al., 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.336–340.

- Denton, R.M. et al., 1975. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 9(1), pp.27–53.
- Despa, S. et al., 2002. Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation*, 105(21), pp.2543–2548.
- Dipla, K. et al., 1999. The sarcoplasmic reticulum and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger both contribute to the Ca<sup>2+</sup> transient of failing human ventricular myocytes. *Circulation research*, 84(4), pp.435–444.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), pp.47–95.
- Earle, S.R., Anderson, W.M. & Fisher, R.R., 1978. Evidence that reconstituted bovine heart mitochondrial transhydrogenase functions as a proton pump. *FEBS letters*, 91(1), pp.21–24.
- Eirin, A., Lerman, A. & Lerman, L.O., 2014. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. *European heart journal*, 35(46), pp.3258–3266.
- Eng, J., Lynch, R.M. & Balaban, R.S., 1989. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophysical journal*, 55(4), pp.621–630.
- Erickson, J.R. et al., 2008. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 133(3), pp.462–474.
- Fergusson, G. et al., 2014. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular metabolism*, 3(9), pp.848–854.
- Fontaine, D.A. & Davis, D.B., 2016. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, 65(1), pp.25–33.
- Freeman, H., Shimomura, K., et al., 2006. RETRACTED: Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell metabolism*, 3(1), pp.35–45.
- Freeman, H.C., Freeman, H.C., et al., 2006. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 55(7), pp.2153–2156.
- Gao, X. et al., 2009. Mitochondrial DNA damage in iron overload. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), pp.4767–4775.
- Gao, X. et al., 2010. Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload. *Free radical biology & medicine*, 49(3), pp.401–407.
- Gerschman, R. et al., 1954. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in

- Common. *Science of Aging Knowledge Environment*, 1954(17), pp.cp1–291.
- Giordano, F.J., 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), pp.500–508.
- Giorgio, M. et al., 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122(2), pp.221–233.
- Glancy, B. & Balaban, R.S., 2012. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), pp.2959–2973.
- Grimm, M. & Brown, J.H., 2010. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(2), pp.322–330.
- Grishko, V.I. et al., 1999. Nitric oxide-induced damage to mtDNA and its subsequent repair. *Nucleic acids research*, 27(22), pp.4510–4516.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260(6), pp.3440–3450.
- Halestrap, A., 2005. Biochemistry: a pore way to die. *Nature*, 434(7033), pp.578–579.
- Halestrap, A., 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular research*, 61(3), pp.372–385.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 141(2), pp.312–322.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, OUP Oxford.
- Halliwell, B. & Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), pp.231–255.
- Hempel, S.L. et al., 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydorhodamine 123. *Free radical biology & medicine*, 27(1), pp.146–159.
- Hohl, M. et al., 2013. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), pp.1359–1370.
- Houser, S.R., Houser, S.R. & Margulies, K.B., 2003. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circulation research*, 92(4), pp.350–358.

- Huang, T.T. et al., 2006. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Human molecular genetics*, 15(7), pp.1187–1194.
- Hudsmith, L.E. & Neubauer, S., 2008. Detection of myocardial disorders by magnetic resonance spectroscopy. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5, pp.S49–S56.
- Ichikawa, Y. et al., 2014. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2), pp.617–630.
- Ide, T. et al., 2001. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5), pp.529–535.
- Indo, H.P. et al., 2007. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 7(1), pp.106–118.
- Ingwall, J.S., 2002. *ATP and the Heart*, Boston, MA: Springer US.
- Ingwall, J.S., 2006. On the hypothesis that the failing heart is energy starved: lessons learned from the metabolism of ATP and creatine. *Current hypertension reports*, 8(6), pp.457–464.
- Ingwall, J.S. & Weiss, R.G., 2004. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circulation research*, 95(2), pp.135–145.
- Jafri, M.S. et al., 2001. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annual review of biomedical engineering*, 3(1), pp.57–81.
- Jakubowski, W., 2000. 2,7- dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? *Cell Biology International*, 24(10), pp.757–760.
- Jezek, P. & Hlavatá, L., 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(12), pp.2478–2503.
- Joiner, M.-L.A. et al., 2012. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*, 491(7423), pp.269–273.
- Kaplan, N.O. et al., 1953. Pyridine nucleotide transhydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 2, pp.681–687.
- Katz, L.A. et al., 1989. Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *The American journal of physiology*, 256(1 Pt 2), pp.H265–74.
- Katz, L.A. et al., 1987. Respiratory control in the glucose perfused heart. A <sup>31</sup>P NMR

- and NADH fluorescence study. *FEBS letters*, 221(2), pp.270–276.
- Kehrer, J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), pp.21–48.
- Kirkman, H.N. & Gaetani, G.F., 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(14), pp.4343–4347.
- Klingenberg, M. & Slenczka, W., 1959. Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships. *Biochemische Zeitschrift*, 331, pp.486–517.
- Kloner, R.A. et al., 2012. Reduction of ischemia/reperfusion injury with bendavia, a mitochondria-targeting cytoprotective Peptide. *Journal of the American Heart Association*, 1(3), pp.e001644–e001644.
- Kohlhaas, M., 2007. Die Bedeutung der subzellulären CaMKII $\delta$ -Überexpression auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel in Herzmuskelzellen. *ediss.uni-goettingen.de*. Available at: <http://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0006-AC4F-6> [Accessed February 13, 2014].
- Kohlhaas, M. & Maack, C., 2010. Adverse bioenergetic consequences of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in cardiac myocytes. *Circulation*, 122(22), pp.2273–2280.
- Kohlhaas, M. & Maack, C., 2013. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular research*, 98(2), pp.259–268.
- Kohlhaas, M. & Maack, C., 2011. Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 21(3), pp.69–73.
- Kohlhaas, M. et al., 2010. Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation*, 121(14), pp.1606–1613.
- Kolwicz, S.C. et al., 2011. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*, 90(2), pp.194–201.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. & Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters*, 416(1), pp.15–18.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. & Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters*, 495(1-2), pp.12–15.
- Kraev, A., 2014. Parallel universes of Black Six biology. *Biology direct*, 9(1), p.18.
- Krebs, H.A. & Johnson, W.A., 1980. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 117, pp.K2–K10.

- Kuroda, J. et al., 2010. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp.15565–15570.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. & Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *The Biochemical journal*, 368(Pt 2), pp.545–553.
- Lambert, A.J. & Brand, M.D., 2009. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 554(Chapter 11), pp.165–181.
- Lane, N., 2002. *Oxygen*, Oxford University Press, USA.
- Lane, N., 2006. *Power, Sex, Suicide*, OUP Oxford.
- Lane, N., 2012. The problem with mixing mitochondria. *Cell*, 151(2), pp.246–248.
- Lane, N. & Lane, N., 2011. Evolution. The costs of breathing. *Science*, 334(6053), pp.184–185.
- Lane, N. & Martin, W., 2010. The energetics of genome complexity. *Nature*, 467(7318), pp.929–934.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. & Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), pp.227–231.
- Lee, C.P. & Ernster, L., 1989. Equilibrium studies of the energy-dependent and non-energy-dependent pyridine nucleotide transhydrogenase reactions. 1964. *Biochimica et biophysica acta*, 1000, pp.377–380.
- Lenaz, G., 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BAA) - Bioenergetics*.
- Li, N, 2002. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp.8516–8525.
- Li, Y et al., 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *The Journal of biological chemistry*, 273(4), pp.2015–2023.
- Li, Yibing et al., 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics*, 11(4), pp.376–381.
- Li, Yunbo & Trush, M.A., 1998. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), pp.295–299.

- Lindahl, P.E. & Öberg, K.E., 1961. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Experimental Cell Research*, 23(2), pp.228–237.
- Lindner, M., Erdmann, E. & Beuckelmann, D.J., 1998. Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(4), pp.743–749.
- Liochev, S. & Fridovich, I., 1999. Superoxide and Iron: Partners in Crime. *IUBMB Life*, 48(2), pp.157–161.
- Liochev, S.I. et al., 1997. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Archives of biochemistry and biophysics*, 337(1), pp.115–120.
- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D., 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), pp.780–787.
- Loschen, G., Flohé, L. & Chance, B., 1971. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS letters*, 18(2), pp.261–264.
- Lowry, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–275.
- Maack, C. & O'Rourke, B., 2007. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology*, 102(5), pp.369–392.
- Maack, C. et al., 2006. Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> decreases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research*, 99(2), pp.172–182.
- Maack, C. et al., 2003. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*.
- Maechler, P. et al., 2001. Mitochondrial function in normal and diabetic-cells. *Nature*, 414(6865), pp.807–812.
- Maier, L. et al., 2007. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular research*, 73(4), pp.631–640.
- Marín-García, J., 2005. *Mitochondria and the Heart*, Springer Science & Business Media.
- McMurray, J.J.V. et al., 2012. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European journal of heart failure*, 14(8), pp.803–869.

- McNutt, N.S. & Fawcett, D.W., 1969. The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle. *The Journal of Cell Biology*, 42(1), pp.46–67.
- Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC), 2012. The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *European heart journal*, 33(14), pp.1750–1757.
- Mitchell, P., 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BAA) - Bioenergetics*, 1807(12), pp.1507–1538.
- Mitchell, P. & Moyle, J., 1965. Evidence discriminating between the Chemical and the Chemiosmotic Mechanisms of Electron Transport Phosphorylation. *Current Problems in Cardiology*, 208(5016), pp.1205–1206.
- Moe, G., 1999. Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure. *Cardiovascular research*, 42(3), pp.591–599.
- Molyneux, S.L. et al., 2008. Coenzyme Q10. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(18), pp.1435–1441.
- Mootha, V.K., Arai, A.E. & Balaban, R.S., 1997. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *The American journal of physiology*, 272(2 Pt 2), pp.H769–75.
- Murphy, M.P., 2015. Redox Modulation by Reversal of the Mitochondrial Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase. *Cell metabolism*, 22(3), pp.363–365.
- Münzel, T. et al., 2002. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(11), pp.1761–1768.
- Nascimben, L. et al., 1996. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*, 94(8), pp.1894–1901.
- Navarro, A., Navarro, A. & Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(2), pp.C670–86.
- Neubauer, S., 2007. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *The New England journal of medicine (NEJM)*, 356(11), pp.1140–1151.
- Neubauer, S. et al., 1997. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 96(7), pp.2190–2196.
- Nickel, A., Löffler, J. & Maack, C., 2013. Myocardial energetics in heart failure. *Basic research in cardiology*, 108(4), p.358.
- Nickel, A.G. et al., 2015. Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes

- Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell metabolism*, 22(3), pp.472–484.
- O-Uchi, J. et al., 2012. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-linked health and disease. *The Journal of general physiology*, 139(6), pp.435–443.
- Orr, A.L. et al., 2012. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), pp.42921–42935.
- O'Rourke, B. & Maack, C., 2007. The role of Na dysregulation in cardiac disease and how it impacts electrophysiology. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 4(4), pp.207–217.
- Packer, M., 1992. Pathophysiology of chronic heart failure. *The Lancet*, 340(8811), pp.88–92.
- Patel, M.S. et al., 2001. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Experimental & molecular medicine*, 33(4), pp.191–197.
- Patterson, G.H. et al., 2000. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5203–5207.
- Paulsen, G. et al., 2014. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind randomized controlled trial. *The Journal of physiology*, 592(8), pp.1887–1901.
- Pedersen, A., Karlsson, G.B. & Rydström, J., 2008. Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. *Free radical biology & medicine*, 40(5), pp.463–473.
- Persson, B. et al., 1988. NBD-Cl modification of essential residues in mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase from bovine heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 953, pp.241–248.
- Piacentino, V. et al., 2003. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circulation research*, 92(6), pp.651–658.
- Pieske, B., Pieske, B. & Houser, S.R., 2003. [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> handling in the failing human heart. *Cardiovascular research*, 57(4), pp.874–886.
- Pohjoismäki, J.L.O. et al., 2013. Overexpression of Twinkle-helicase protects cardiomyocytes from genotoxic stress caused by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), pp.19408–19413.

- Potter, V.R. & Reif, A.E., 1952. Inhibition of an electron transport component by antimycin A. *The Journal of biological chemistry*, 194(1), pp.287–297.
- Quinlan, C.L. et al., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), pp.27255–27264.
- Quinzii, C.M. et al., 2010. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB Journal*, 24(10), pp.3733–3743.
- Radi, R. et al., 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free radical biology & medicine*, 33(11), pp.1451–1464.
- Richter, C., Park, J.W. & Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), pp.6465–6467.
- Ristow, M. & Schmeisser, S., 2011. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 51(2), pp.327–336.
- Ristow, M. et al., 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), pp.8665–8670.
- Rizzuto, R., Rizzuto, R. & Pozzan, T., 2006. Microdomains of Intracellular Ca<sup>2+</sup>: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological reviews*, 86(1), pp.369–408.
- Roger, V.L., 2013. Epidemiology of Heart Failure. *Circulation research*, 113(6), pp.646–659.
- Rubbo, H. et al., 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *The Journal of biological chemistry*, 269(42), pp.26066–26075.
- Rydström, J., 1977. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 463(2), pp.155–184.
- Rydström, J., 2006. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(5-6), pp.721–726.
- Rydström, J. & J B Hoek, J.R., 1988. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochemical Journal*, 254(1), pp.1–56.
- Sabbah, H.N., Mengjun, W. & Zhang, K., 2013. Long-term therapy with bendavia (MTP-131), a novel mitochondria-targeting peptide, reverses mitochondrial functional abnormalities in left ventricular myocardium of dogs with advanced heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(10), p.E709.
- Saks, V. et al., 2005. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-

- Starling law. *The Journal of physiology*, 571(2), pp.253–273.
- Sauer, U. et al., 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 279(8), pp.6613–6619.
- Scaduto, R.C. et al., 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal*, 76(1 Pt 1), pp.469–477.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp.197–223.
- Sheeran, F.L. et al., 2010. Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp.1138–1148.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), pp.291–295.
- Skulachev, V.P., 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS letters*, 397(1), pp.7–10.
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), pp.191–208.
- Starkov, A.A. & Fiskum, G., 2003. Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of Neurochemistry*, 86(5), pp.1101–1107.
- Sugden, M.C. & Holness, M.J., 2006. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Archives of Physiology And Biochemistry*, 112(3), pp.139–149.
- Swift, L.M. & Sarvazyan, N., 2000. Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(3), pp.982–990.
- Taegtmeyer, H., 2007. Fueling the Heart: Multiple Roles for Cardiac Metabolism. In *Cardiovascular medicine*. London: Springer London, pp. 1157–1175.
- Tarpey, M.M. et al., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(3), pp.R431–44.
- Toye, A.A. et al., 2005. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*, 48(4), pp.675–686.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), pp.335–344.

- Turrens, J.F., Zhang, L. & Boveris, A., 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal*, 191(2), pp.421–427.
- Umana, E., Solares, C.A. & Alpert, M.A., 2003. Tachycardia-induced cardiomyopathy. *The American journal of medicine*, 114(1), pp.51–55.
- Van Breemen, V.L., 1953. Intercalated discs in heart muscle studied with the electron microscope. *The Anatomical Record*, 117(1), pp.49–63.
- Vanden Hoek, T.L. et al., 1998. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(29), pp.18092–18098.
- Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S., 2013. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 13(2), pp.71–82.
- Vogel, R. et al., 1999. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neuroscience Letters*, 275(2), pp.97–100.
- Wagner, S. et al., 2006. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), pp.3127–3138.
- Walker, J.E. et al., 1995. Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods in enzymology*, 260, pp.163–190.
- Weber, C.R. et al., 2003. Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation*, 108(18), pp.2224–2229.
- Weiss, R.G. et al., 2005. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), pp.808–813.
- Weisser-Thomas, J. et al., 2003. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovascular research*, 57(4), pp.974–985.
- Williams, H.C. & Griendling, K.K., 2007. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *Journal of cardiovascular pharmacology*, 50(1), pp.9–16.
- Wu, G. et al., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal of Nutrition*, pp.363–411.
- Ying, W., 2008. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), pp.179–206.
- Yu, B.P. et al., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen

species. *Free radical biology & medicine*, 43(6), pp.959–967.

Zhang, M. et al., 2010. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp.18121–18126.

Zhao, K. et al., 2004. Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury. *The Journal of biological chemistry*, 279(33), pp.34682–34690.

## 9 DANKSAGUNG

Zunächst gilt mein Dank dem hervorragenden kardiologischen Laborteam mit allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden für die großartige Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich meinen Betreuer Dr. Alexander Nickel für seine Geduld und stets offene Tür, Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas für seine kompetente Einweisung und Beratung bei den Einzelzellmessungen, Michelle Gulentz für ihre Hilfe bei den Zellisolationen, Dr. med. Jasmin Saar für die gemeinsame Etablierung der Zellisolation und Dr. Andreas Knopp für die Einweisung ins wissenschaftliche Arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack. Mit seiner ansteckenden Begeisterung und Leidenschaft für die Grundlagenforschung sowie seinem unerlässlichen Engagement, ermöglichte er mir diese wissenschaftliche Arbeit. Besonders gerne denke ich an spätabendliche Diskussionen über mitochondriale Energetik zurück. Ferner habe ich ihm die Publikation unserer Ergebnisse und Möglichkeit an internationalen Symposien aktiv teilnehmen zu können zu verdanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, Experimente im kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik durchführen zu können und seine überaus engagierte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Frau Bachmann für die Bereitstellung und Hilfe mit der Clark-Elektrode und die Zusammenarbeit mit Bastian Pasioka und Dr. Reinhard Kappl in der Biophysik bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und Brüdern bedanken. Meine Eltern haben mir das Medizinstudium ermöglicht und mich auf meinem Weg zur erfolgreichen Dissertation begleitet. Sie hatten immer ein offenes Ohr und haben mir viel Kraft gegeben.

## **10 CURRICULUM VITAE**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## 11 PUBLIKATIONEN

### Abstracts

**von Hardenberg A**, Knopp A, Maack C: Rapid NADPH Oxidation by reverse transhydrogenase activity in depolarized mitochondria – A mechanism that could favor oxidative stress

7<sup>th</sup> Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology Groups, Hamburg, Germany, February 5-7, 2009

Kohlhaas M, Saar JA, **von Hardenberg A**, Hohl M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C: Stat3 is not required for mitochondrial respiration in intact cardiac myocytes

Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland, January 28-31, 2010

Saar JA, Kohlhaas M, **von Hardenberg A**, Hohl M, Stapel B, Hilfiker-Kleiner D, Böhm M, Maack C: Stat3 deficiency induces mitochondrial superoxide generation during transitions of workload in intact cardiac myocytes

Clin Res Cardiol 2010; V1196

**von Hardenberg A**, Kohlhaas M, Nickel A, Hohl M, Saar JA, Böhm M, Maack C: NAD-Transhydrogenase regulates mitochondrial formation of reactive oxygen species in cardiac myocytes

Eur Heart J 2010 (Supplement); Abstract 207

M. Kohlhaas, B. Stapel, J A. Saar, M. Hoch, **A. von Hardenberg**, M. Hohl, M. Böhm, C. Maack, D. Hilfiker-Kleiner: STAT3 regulates mitochondrial redox-state of NAD(P)H and reactive oxygen species production in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation

Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland, 2011

A. Nickel, **A. von Hardenberg**, M. Kohlhaas, M. Hohl, B. Pasięka, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, M. Böhm, C. Maack: Mitochondrial transhydrogenase prevents reactive oxygen species generation in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in cardiac myocytes

Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland, 2011

Saar JA, Kohlhaas M, Hohl M, Stapel B, Hoch M, **von Hardenberg A**, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C: STAT3 controls mitochondrial NAD(P)H redox-state and reactive oxygen species production in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation

Clin Res Cardiol 2011; V1133

Nickel A, **von Hardenberg A**, Kohlhaas M, Reil J-C, Hohl M, Puhl S-L, Kazakov A, Bogeski I, Pasięka B, Kappl R, Hoth M, Böhm M, Maack C: Mitochondrial transhydrogenase promotes reactive oxygen species production, cardiac fibrosis and decompensation in response to hemodynamic workload in vivo

Clin Res Cardiol 2011; V927

**von Hardenberg A**, Nickel A, Kohlhaas M, Hohl M, Pasiaka B, Bogeski I, Kappl R, Hoth M, Böhm M, Maack C: Mitochondrial transhydrogenase: Yin and Yang of antioxidative capacity in cardiac myocytes  
55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, March 5-9 2011, Abstract # 2502

Nickel A, **von Hardenberg A**, Kohlhaas M, Reil J-C, Hohl M, Puhl S L, Kazakov A, Pasiaka B, Bogeski I, Kappl R, Hoth M, Böhm M, Maack C (2011): Mitochondrial transhydrogenase is a key regulator of antioxidative capacity in cardiac myocytes  
Annual meeting of the Working Groups on "Myocardial Function" and "Cellular Biology of the Heart" of the European Soc. of Cardiol., Villa Monastero, Varenna, Italy, April 15-17 2011

A. Nickel, **A. von Hardenberg**, M. Kohlhaas, J.-C. Reil, M. Hohl, S. L. Puhl, A. Kazakov, B. Pasiaka, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, M. Böhm, C. Maack: Mitochondrial transhydrogenase consumes NADPH and provokes oxidative stress and maladaptive remodeling in response to elevated cardiac workload  
Basic Science Meeting auf der Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rythmologie, 6.-8. Oktober 2011; BS35

A. Nickel, J.-C. Reil, J. Löffler, J. Becker, **A. von Hardenberg**, M. Kohlhaas, M. Hohl, S. L. Puhl, A. Kazakov, B. Pasiaka, I. Bogeski, C. Maack: Mitochondrial transhydrogenase consumes NADPH during cardiac work and triggers oxidative stress and maladaptive remodeling  
Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland, 2012

A. Nickel, J. Löffler, J.-C. Reil, **A. von Hardenberg**, M. Kohlhaas, M. Hohl, A. Kazakov, B. Pasiaka, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, M. Böhm, C. Maack: Reversal of the mitochondrial transhydrogenase consumes NADPH during cardiac workload and triggers oxidative stress and maladaptive remodeling  
Clin Res Cardiol 2012; V482

J. Becker, A. Nickel, M. Hohl, J. Löffler, **A. von Hardenberg**, I. Bogeski, R. Kappl, M. Hoth, C. Maack: Organ-specific expression of mitochondrial transhydrogenase determines reactive oxygen species production in response to high workload  
Clin Res Cardiol 2012; V483

A. Nickel, **A. von Hardenberg**, J. Löffler, J.-C. Reil, J. Becker, M. Hohl, M. Kohlhaas, A. Kazakov, B. Pasiaka, I. Bogeski, R. Kappl, S. L. Puhl, M. Hoth, M. Böhm, C. Maack. Reverse-Mode of the Mitochondrial Transhydrogenase Consumes NADPH and Provokes Oxidative Stress in Response to Elevated Cardiac Workload. Biophysical. Journal , Volume 104 , Issue 2 , 2013, 658a

#### **Zeitschriftenartikel:**

A. Nickel, **A. von Hardenberg**, M. Hohl, J. Löffler, M. Kohlhaas, J. Becker, J.-C. Reil, A. Kazakov, J. Bonnekoh, M. Stadelmaier, S.-L. Puhl, M. Wagner, I. Bogeski, S. Cortassa, R. Kappl, B. Pasiaka, M. Lafontaine, C. R. D. Lancaster, T. S. Blacker, A. R.

---

Hall, M. R. Duchon, L. Kästner, P. Lipp, T. Zeller, C. Müller, A. Knopp, U. Laufs, M. Böhm, M. Hoth, C. Maack: Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metabolism*. 22, 472–484 (2015).

**A. von Hardenberg**, A. Nickel, C. Maack: Mitochondriale Transhydrogenase: Yin und Yang der antioxidativen Kapazität. *Biospektrum* 23, 22-24 (2017)