

Aus dem Bereich Innere Medizin III – Kardiologie
Klinische und Experimentelle Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Ca²⁺-Sensibilisierung der Myofilamente erhöht mitochondriale Wasserstoffperoxidemission in Herzmuskelzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von:

Felix Michael Alscher

geb. am 19.11.1993

in Idar-Oberstein

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Tag der Promotion: 19.12.2019
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Maack
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Hoth

Anmerkungen:

Sämtliche Experimente wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Alexander G. Nickel und Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas von mir selbst durchgeführt und fanden größtenteils im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes statt. Nur die Superoxid-Messungen konnten dank Herrn Dr. R. Kappl in den Forschungsräumen der Biophysik im „Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM)“ in Homburg realisiert werden.

Für die Bezeichnung von Personen oder Personengruppen unbekanntem bzw. potenziell unterschiedlichen Geschlechts wird in der vorliegenden Arbeit zur Vereinfachung immer das generische Maskulinum verwendet. Selbstverständlich sind immer beide Geschlechter gemeint.

Alle im Fließtext verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgelistet. Nur die im Materialteil vorkommenden chemischen Elemente sind aus Übersichtsgründen nicht in das Abkürzungsverzeichnis aufgenommen. Für jede im Materialteil aufgeführte chemische Verbindung wird die allgemein übliche/geläufigste Bezeichnung benutzt.

Die bei den Internetquellen verwendeten Jahresangaben, die im Literaturverzeichnis und bei den Kurznachweisen im Fließtext angegeben sind, beziehen sich auf den Zeitpunkt des letzten Abrufs der Webseite.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung/Summary	1
1.1 Ca ²⁺ -Sensibilisierung der Myofilamente erhöht mitochondriale Wasserstoffperoxidemission in Herzmuskelzellen	1
1.2 Sensitization of myofilaments to Ca ²⁺ increases mitochondrial emission of hydrogen peroxide in cardiac myocytes	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Herzinsuffizienz.....	5
2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie	8
2.3 Die elektromechanische Kopplung.....	9
2.4 Inotropika	12
2.5 Mitochondriale Energetik	13
2.6 Reaktive Sauerstoffspezies	17
2.7 Zelluläre Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz	22
2.8 Das mCAT-Mausmodell.....	28
2.9 Fragestellung der Arbeit.....	32
3 Materialien	33
3.1 Allgemeine Laborutensilien	33
3.1.1 Materialien zur Genotypisierung	34
3.1.2 Verwendete chemische Substanzen	34
3.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	35
3.2 Mitochondriale Experimente	36
3.2.1 Angesetzte Lösungen und Puffer	36
3.2.2 Materialien zur Isolation von Mitochondrien.....	37
3.2.3 Materialien zur Proteinbestimmung	38
3.2.4 Materialien zur Atmungsmessung	38

3.2.5	Materialien zur Superoxidmessung	39
3.2.6	Materialien zur H ₂ O ₂ -Emissionsmessung und zum PTP-Assay.....	39
3.3	Zelluläre Experimente	40
3.3.1	Materialien zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten.....	40
3.3.2	Verwendete Puffer- und Tyrodelösungen	41
3.3.3	Instrumentarien der IonOptix-Systeme	43
3.3.4	Materialien zur Durchführung der Experimente an der IonOptix-Anlage	44
4	Methodik	45
4.1	Tiermodell	45
4.2	Isolation von Mitochondrien aus Mäuseherzen	46
4.2.1	Proteinbestimmung.....	47
4.2.2	Atmungsmessung an Mitochondrien.....	48
4.2.3	Superoxid-Messung mit der Spinprobe CMH	49
4.2.4	H ₂ O ₂ -Emissionsmessung.....	50
4.2.5	Permeabilitäts-Transitions-Pore-Assay.....	51
4.3	Isolation und Kultivierung von Mauskardiomyozyten	52
4.4	Das IonOptix-System	55
4.5	Messvorbereitungen	58
4.6	Messprotokolle.....	59
4.6.1	NAD(P)H- und FAD-Versuchsreihe	60
4.6.2	DCF-Versuchsreihe	62
4.6.3	EMD-Versuchsreihe.....	63
4.6.4	Kontraktilitätsmessungen.....	64
4.7	Graphische Darstellung und statistische Analyse	66
5	Ergebnisse.....	67
5.1	Atmungsmessung an kardialen mCAT-Mitochondrien	67
5.2	Superoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien	68
5.3	Wasserstoffperoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien.....	69
5.4	Calciumretentionskapazität von mCAT-Mitochondrien	70

5.5	Intrazellulärer Redoxstatus nativer mCAT-Kardiomyozyten.....	74
5.5.1	Kontraktilität von nativen mCAT-Kardiomyozyten.....	75
5.6	Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion in mCAT-Kardiomyozyten	77
5.7	Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion unter dem Ca ²⁺ -Sensitizer EMD.....	78
5.7.1	Kontraktilität von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten	78
5.7.2	ROS-Produktion in Kardiomyozyten unter EMD	81
6	Diskussion	83
7	Ausblick	96
8	Literaturverzeichnis	97
9	Abbildungsverzeichnis	114
10	Tabellenverzeichnis	116
11	Publikationen	117
12	Danksagung	118
13	Lebenslauf	119

Abkürzungsverzeichnis

Kurzform	Beschreibung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
·NO	Stickstoffmonoxid
·O ₂ ⁻	Superoxidradikal, Superoxid
·OH	Hydroxylradikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AfCS	engl. Alliance for Cellular Signaling
Ag/Ag ⁺	Silber/ionisiertes Silber
AMA	Antimycin A
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ANT	Adeninnucleotid-Carrier (engl. adenine nucleotide translocator)
AP	Atmungspuffer
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin-II- Subtyp-1-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl. arbitrary unit
BNP	engl. Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
bpm	engl. beats per minute
BSA	Bovines Serum Albumin
C57BL/6N	kommerziell erwerbliche Mauslinie
Ca/Ca ²⁺	Calcium/ionisiertes Calcium

Kurzform	Beschreibung
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAG	engl. CMV enhancer/chicken β-actin promoter
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches AMP
CAT	humanes Katalase-Gen
CAT1	Primer für das humane Katalase-Gen
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CMH	cyclisches Hydroxylamin (engl. 1-Hydroxy-3-methoxy-carbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine)
CM-H ₂ DCFDA	Farbstoff für ROS: Chlormethylderivat des H ₂ DCFDA
CMV	Cytomegalievirus
CN	Cyanid
Cr	Kreatin
CsA	Cyclosporin A
Cu	Kupfer
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DETC	Diethyldithiocarbamat
DF	Deferoxamin-Methansulfonat
dias.	diastolisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNP	2,4-Dinitrophenol
e ⁻	Elektron
e	Eulersche Zahl
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	engl. Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMD	Calcium-Sensitizer: (engl.) (+) enantiomer of 5-[1-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydro]-6-quinolyl]-6-methyl-3,6-dihydro-2H-1,3,4-thiadiazin-2-one
EPR	engl. electron paramagnetic resonance

Kurzform	Beschreibung
ESC	engl. European Society of Cardiology
ETC	Elektronentransportkette (engl. electron transport chain)
F/F ₀	relatives Fluoreszenzsignal (F = Fluoreszenzsignal; F ₀ = Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt [t] = 0)
F ₀	Elterngeneration
F ₁	erste Nachfolgegeneration
F ₂	zweite Nachfolgegeneration
FADH ₂ /FAD	Flavinadenindinukleotid, reduzierte/oxidierte Form
FCCP	H ⁺ -Ionophor: (engl.) Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
Fe/Fe ^{2+/3+}	Eisen/ionisiertes Eisen
FMN	Flavinmononukleotid
FS	engl. fractional shortening
g	Erdbeschleunigung
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
G _s	GTP-bindendes Protein (Aktivierung der AC)
GSH/GSSG	reduziertes/oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Proton
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFmrEF	engl. heart failure with mid-range ejection fraction
HFpEF	engl. heart failure with preserved ejection fraction
HFrEF	engl. heart failure with reduced ejection fraction
HRP	engl. horseradish peroxidase
Hz	Hertz

Kurzform	Beschreibung
HZV	Herzzeitvolumen
I_{Ca}	Ca^{2+} -Einstrom
IDH	Isocitratdehydrogenase
IL-2 F	Forward Primer für das <i>Interleukin 2</i> -Gen
IL-2 R	Reverse Primer für das <i>Interleukin 2</i> -Gen
IL-2	Interleukin 2
IMAC	engl. inner membrane anion channel
IMM	innere mitochondriale Membran
IMS	engl. intermembrane space
I_{Na}	Na^{+} -Einstrom
IS	Isolutionslösung (engl. solution)
Iso	Isoprenalin
K^{+}	ionisiertes Kalium
kg	Kilogramm
l	Liter
Li^{+}	ionisiertes Lithium
LOOH	Lipidhydroperoxide
LTCC	L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (engl. L-type- Ca^{2+} channel)
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	Molar
mCAT	engl. catalase located in mitochondria
MCU	mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter
MEP	$NADP^{+}$ -abhängiges Malatenzym
Mfn	Mitofusin
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
mitoK _{ATP}	mitochondrialer ATP-abhängiger K^{+} -Kanal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn	Mangan

Kurzform	Beschreibung
mNHE	mitochondrialer Na ⁺ /H ⁺ Austauscher
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
MSS	Mitochondrien-Suspension-Lösung (engl. solution)
mtDNA	mitochondriale DNA
mV	Millivolt
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
n	Anzahl
Na ⁺	ionisiertes Natrium
NAD(P)H/NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), reduzierte/oxidierte Form
nCAT	engl. catalase targeted to the nucleus
NCLX	mitochondrialer Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NFAT-Signalweg	engl. nuclear factor of activated T-cell pathway
NHE	sarkolemmaler Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
Nnt	Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
NT	Normaltyrode
NT _D	DMSO-haltige Normaltyrode
O ₂	molekularer Sauerstoff
OH ⁻	Hydroxidion
OMM	engl. outer mitochondrial membrane
OTC/CAT	Primer für das humane Katalase-Gen
pCAT	engl. catalase located in peroxisomes
PCr	Phosphokreatin
PCR	Polymerasekettenreaktion

Kurzform	Beschreibung
PDE	Phosphodiesterase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
PM	Pyruvat/Malat
pmol	Picomol
PMT	engl. photomultiplier tube
PRX	Peroxiredoxin
PTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore (engl. permeability transition pore)
PyRAT	Computersoftware zur Katalogisierung von Tierkolonien (engl. Python-based Relational Animal Tracking)
Q	Ubichinon
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RO·	Alkoxyradikale
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. revolutions per minute
RT	engl. relaxation time
RyR(2)	Ryanodin-Rezeptor (Typ 2)
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl. standard error of the mean)
SERCA	sarkoendoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SOD	Superoxiddismutase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SS-31	Szeto-Schiller-Peptid 31
sys.	systolisch
TAC	engl. transverse aortic constriction
Tempol	engl. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy
TG	transgen

Kurzform	Beschreibung
TR	Thioredoxin-Reduktase
TRX _r /TRX _o	reduziertes/oxidiertes Thioredoxin
TTP	engl. time to peak
T-Tubuli	transversale Tubuli
U	Enzymeinheit zur Angabe der Enzymaktivität
VDAC	engl. voltage dependant anion channel
Vol.-%	Volumenprozent
WT	Wildtyp
Zn	Zink
α	Alpha
β	Beta
β-AR	β-adrenerger Rezeptor
Δμ _H	protonenmotorische Kraft
ΔpH	Protonengradient
ΔΨ _m	mitochondriales Membranpotenzial (elektrischer Gradient)
λ _{exc} /λ _{em}	Exzitations- und Emissionswellenlänge
τ	Tau (mathematische Konstante)

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Ca²⁺-Sensibilisierung der Myofilamente erhöht mitochondriale Wasserstoffperoxidemission in Herzmuskelzellen

Hintergrund: Chronische Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, bei dem neben einer permanenten sympathischen Aktivierung vor allem eine mehrdimensionale kardiomyozytäre Dysfunktion die Persistenz und Progression der Erkrankung bedingt. Während am Herzen eine Vielzahl von verschiedenen pathologischen Konditionen in einer Herzinsuffizienz münden und diese sich je nach Ätiologie in einer Herzinsuffizienz mit verminderter oder erhaltener Ejektionsfraktion manifestiert, verursachen auf ultrastruktureller Ebene pathognomonische Mechanismen ein energetisches Defizit, eine Störung der elektromechanischen Kopplung, eine Fehlregulation der Ionenhomöostase sowie oxidativen Stress. So führen beispielsweise beim Krankheitsbild der hypertrophen Kardiomyopathie genetische Mutationen zu einer myofilamentären Ca²⁺-Sensibilisierung, die durch eine Hyperkontraktilität einen exzessiven Energieverbrauch provoziert und infolgedessen homöostatische Zellfunktionen einschränkt. Auch hier scheinen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine fundamentale Rolle in der Aufrechterhaltung und Verschärfung zellulärer Disbalancen zu spielen.

Zielsetzung: Mithilfe der vorliegenden Forschungsarbeit sollte untersucht werden, ob membranpermeable Wasserstoffperoxidmoleküle für den bei einer pharmakologischen Ca²⁺-Sensibilisierung auftretenden erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies-Anfall verantwortlich sind; und inwiefern eine vermehrte mitochondriale Wasserstoffperoxidelimination die mitochondriale Energetik sowie den zellulären Redoxstatus beeinflusst.

Methoden und Ergebnisse: Mitochondrien und einzelne Kardiomyozyten wurden aus Herzen von jungen, adulten mCAT-Mäusen mit einer 50-fach erhöhten kardialen, mitochondrialen Katalaseaktivität isoliert und mitochondrialen bzw. zellulären Funktionsmessungen zugeführt. Hierbei konnten bei Atmungs-, Superoxid- und Wasserstoffperoxid-Messungen an isolierten Mitochondrien keine nennenswerten Diskrepanzen zwischen mCAT- und Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Das gleiche Resultat zeigte sich an isolierten Kardiomyozyten bei der Überprüfung des zellulären Redoxstatus. Dieser wurde mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops anhand der Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD in einem physiologischen Stressprotokoll bestimmt, in dem

isolierte Herzmuskelzellen unter β -adrenerger Stimulation (30 nM Isoprenalin) 180 Sekunden bei 5 Hertz stimuliert wurden. Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) wurde bei gleicher Arbeitslast die kardiomyozytäre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ermittelt, die sich ebenfalls nicht zwischen beiden Versuchsgruppen unterschied. Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtyp-Myozyten im Vergleich zu den mCAT-Myozyten hier bei exogener Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine stärkere Oxidation von DCF ($p < 0,0001$). Des Weiteren führte der Einsatz des Calcium-Sensitizers EMD 57033 bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies-Konzentration ($p < 0,05$). Dagegen konnten Myozyten von mCAT-Mäusen im Vergleich zu unter Kontrollbedingungen gemessenen WT-Myozyten den Anstieg der DCF-Fluoreszenz unterbinden ($p < 0,05$) und auch unter dem Einfluss von EMD 57033 eine weitere Steigerung des DCF-Fluoreszenzsignals verhindern. Demzufolge war die mitochondriale ROS-Emission in Anwesenheit des Calcium-Sensitizers EMD 57033 durch die mitochondriale Katalase-Überexpression erheblich supprimiert. Dies legt nahe, dass H_2O_2 diejenige reaktive Sauerstoffspezies ist, die bei einer Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente eine Oxidation des DCF induziert.

Schlussfolgerung: Während unter physiologischen zellulären Bedingungen die normale antioxidative Kapazität in kardialen Mitochondrien ausreicht, um herkömmliche Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies unschädlich zu machen, werden in Abhängigkeit des zellulären Redoxstatus die mitochondrialen Entgiftungssysteme bei oxidativem Stress überfordert. Eine pharmakologische Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente initiiert diesbezüglich eine pathophysiologische Situation, bei der durch einen höheren Energieverbrauch fokale Disbalancen entstehen, die eine vermehrte Produktion von Wasserstoffperoxid hervorrufen.

1.2 Sensitization of myofilaments to Ca^{2+} increases mitochondrial emission of hydrogen peroxide in cardiac myocytes

Background: Chronic heart failure is a clinical syndrome in which, besides an incessant sympathetic activation, especially a multidimensional malfunction of cardiomyocytes causes the disease's insistence and progression. Whereas a plethora of different pathological heart conditions leads to heart failure and depending on etiology becomes manifest in either heart failure with reduced or preserved ejection fraction, pathognomonic mechanisms induce on an ultrastructural level an energetic mismatch, an impairment of excitation-contraction coupling, a dysregulation of ion homeostasis and oxidative stress. For instance, in hypertrophic cardiomyopathy, genetic mutations evoke a sensitization of myofilaments to Ca^{2+} , which provokes via hypercontractility an excessive consumption of energy and, therefore, reduces homeostatic cell functions. In this respect, reactive oxygen species (ROS) appear to play a fundamental part in the maintenance and aggravation of cellular imbalances, too.

Objective: The present research paper was intended to investigate, whether membrane-permeable hydrogen peroxide molecules are accountable for the arising accumulation of reactive oxygen species upon pharmacological Ca^{2+} -sensitization; as well as to what extent an increased mitochondrial detoxification of hydrogen peroxide affects mitochondrial energetics and the cellular redox state.

Methods and Results: Mitochondria and single cardiomyocytes were isolated from heart preparations of young, adult mCAT mice, which exhibit a 50-fold increase of catalase activity in cardiac mitochondria. Samples were then utilized in mitochondrial and cellular functional measurements, respectively. In isolated mitochondria, no noteworthy differences were detected between mCAT and wild-type mice measuring respiration plus superoxide formation and hydrogen peroxide production. An equal result was unfolded examining the cellular redox state in isolated cardiomyocytes. By use of an epifluorescence microscope and via the autofluorescence of NAD(P)H und FAD, it was determined within a physiological stress protocol in which cardiac myocytes were stimulated during β -adrenergic stimulation (30 nM Isoprenaline) for 180 seconds at 5 hertz. At identical work load, the cardiomyocytes' emission of reactive oxygen species was detected using the fluorescent dye 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF). The oxidation of DCF did not differ during the stress protocol. In contrast, wild-type myocytes displayed a larger accumulation of reactive oxygen species upon external addition of hydrogen

peroxide (H_2O_2) in comparison to mCAT myocytes ($p < 0,0001$). Furthermore, related to their control group, the application of the calcium sensitizer EMD 57033 led to an increased formation of reactive oxygen species in wild-type mice ($p < 0,05$). However, in myocytes from mCAT mice, the increase in DCF fluorescence was blunted compared to wild-type myocytes under control conditions ($p < 0,05$), and no further increase in DCF fluorescence was observed in response to EMD 57033. Accordingly, in the presence of EMD 57033, mitochondrial ROS emission was substantially suppressed by mitochondrial overexpression of catalase, indicating that H_2O_2 is the reactive oxygen species that induces DCF oxidation in response to myofilament Ca^{2+} -sensitization.

Conclusion: Whereas, under physiological cellular conditions, the antioxidative capacity of cardiac mitochondria is sufficient to eliminate conventional levels of reactive oxygen species, the mitochondrial detoxification systems are overwhelmed by oxidative stress, depending on the cellular redox state. Regarding this, a pharmacological Ca^{2+} -sensitization of myofilaments imitates a pathophysiological situation in which focal energy imbalances are developed that cause an increased formation of hydrogen peroxide.

2 Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz

In den European Society of Cardiology (ESC) Guidelines (2016) wird die Herzinsuffizienz als ein klinisches Syndrom definiert, das auf Grundlage struktureller oder funktioneller Herzanomalien typische Symptome (z.B. Luftnot, Knöchelödeme, Müdigkeit) oder Anzeichen (z.B. erhöhter Jugularvenenpuls, Rasselgeräusche über der Lunge, Verlagerung des Herzspitzenstoßes) einer kardialen Beeinträchtigung aufweist (Ponikowski et al., 2016^[144]). Trotz normaler oder erhöhter Füllungsdrücke wird keine ausreichende Versorgung der metabolisch aktiven Gewebe mit Sauerstoff gewährleistet (McMurray et al., 2012^[118]).

Eine linksventrikuläre Dysfunktion spielt bei der chronischen Herzinsuffizienz eine kausale Rolle für die Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV) (Jackson et al., 2000^[71]). Um den Blutdruck bei Abnahme des HZV aufrecht zu erhalten, werden neuroendokrine Kompensationsmechanismen aktiviert (Jackson et al., 2000^[71]). Hierbei erhöht der Sympathikus insbesondere am Herzen die Herzfrequenz und das Schlagvolumen durch Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren via Adrenalin, während an den Gefäßen vorrangig Noradrenalin den peripheren Widerstand über Stimulation von α -adrenergen Rezeptoren steigert (Ehmke, 2014^[47], S. 243-245). In der Summe führt dies zu einem Anstieg des Blutdrucks (Ehmke, 2014^[47], S. 224) und zu einer Verbesserung der Perfusion lebenswichtiger Organe (Vollert & Möckel, 2016^[178], S. 1832). Gleichfalls führt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) über eine Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion und eine verstärkte Aldosteron induzierte Salzretention (Anstieg des Extrazellulärvolumens) zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Silbernagl, 2014^[160], S. 431). Bei erhöhter Wandspannung der Ventrikel wird von den Kardiomyozyten vermehrt (engl.) „Brain Natriuretic Peptide“ (BNP) sezerniert, welches klinisch als validierter Biomarker für Diagnose, Therapie und Prognose gilt (Ghashghaei et al., 2016^[55]). BNP ist der endogene Gegenspieler des RAAS, welches in der Summe eine Natriuresis und Vasodilatation herbeiführt (Jackson et al., 2000^[71]).

Während diese neuroendokrinen Adaptationsmechanismen die Hämodynamik im Körperkreislauf kurzzeitig verbessern können, führt hingegen eine chronische sympathi-

sche Aktivierung auf lange Sicht zu diversen Endorganschäden im Herz-Kreislauf-System und spielt eine fundamentale Rolle in der Entwicklung und Progression der chronischen Herzinsuffizienz (Jackson et al., 2000^[71]; Vollert & Möckel, 2016^[178], S. 1832).

Das klassische klinische Syndrom der Herzinsuffizienz ist zum einen durch pulmonale Stauung sowie periphere Ödeme aufgrund von Flüssigkeitsretention im Sinne eines Rückwärtsversagens und zum anderen durch ein vermindertes HZV mit Vorwärtsversagen gekennzeichnet (Münzel et al., 2015^[126]). Abgesehen von der chronischen Verlaufsform kann sich die Herzinsuffizienz auch als ein innerhalb von 24 Stunden auftretendes akutes Syndrom präsentieren (Mosterd & Hoes, 2007^[123]). Neben einer plötzlichen Verschlechterung der chronischen Herzinsuffizienz kann sich eine akute Herzinsuffizienz klinisch dann unter anderem durch das Auftreten eines kardial bedingten Lungenödems, einer Hypotonie, einer Oligurie und einer peripheren Vasokonstriktion im Zuge eines kardiogenen Schocks manifestieren (Mosterd & Hoes, 2007^[123]).

In der westlichen Welt beträgt die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz 1-2% (McMurray & Pfeffer, 2005^[117]; Mosterd & Hoes, 2007^[123]), während bei den über 65-Jährigen 6-10% von dem klinischen Syndrom betroffen sind (McMurray & Pfeffer, 2005^[117]; Vollert & Möckel, 2016^[178], S. 1830). Da die Häufigkeit der Erkrankung mit dem Lebensalter ansteigt (McMurray & Stewart, 2000^[116]), wird im Zuge der demographischen Entwicklung die Zahl der Patienten steigen (Müller-Werdan & Werdan, 2016^[125]). Im Jahr 2017 war die Herzinsuffizienz in Deutschland der häufigste Anlass eines vollstationären Krankenhausaufenthalts mit insgesamt 464.724 behandelten Patienten (Statistisches Bundesamt [Destatis], 2019^[164]). In den Industriestaaten ist die koronare Herzkrankheit die prädominante ätiologische Ursache der Herzinsuffizienz (McMurray & Stewart, 2000^[116]; Mosterd & Hoes, 2007^[123]). Während die Fortschritte in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms auch zu einer größeren Anzahl an Herzinsuffizienzpatienten beitragen (Mosterd & Hoes, 2007^[123]), ist die Mortalität bei Herzinsuffizienz nach wie vor mit der Prognose häufiger Krebsarten vergleichbar (Stewart et al., 2001^[165]). Denn die Wahrscheinlichkeit in den ersten fünf Jahren nach Diagnosestellung zu versterben liegt bei 60% (McMurray & Stewart, 2000^[116]). Dabei spielen ventrikuläre Arrhythmien die größte Rolle an dem Anteil an plötzlichem Herztod versterbender Patienten (McMurray et al., 2012^[118]). Aufgrund der gewaltigen Prävalenz und hohen Mortalität ist es deshalb essentiell, die molekularen Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz zu erforschen, bestehende Therapieansätze zu überprüfen und neue zu finden, um die Prognose der Patienten zu verbessern.

Historisch wird das Syndrom der Herzinsuffizienz anhand des echokardiographischen Parameters der Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels eingeteilt (Ponikowski et al., 2016^[144]). Die EF stellt die prozentuale Blutmenge (Schlagvolumen) dar, die während einer Herzkontraktion von den Ventrikeln ausgeworfen wird (Daut, 2010^[40], S. 562; McMurray et al., 2012^[118]). Patienten, die bei einer normalen linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) von $\geq 50\%$ ein reduziertes HZV beziehungsweise erhöhte enddiastolische Füllungsdrücke in Ruhe oder unter Belastung besitzen, weisen eine Herzinsuffizienz mit erhaltener EF auf (engl. heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF) (Ponikowski et al., 2016^[144]). Dagegen besteht bei Patienten mit einer EF $< 40\%$ eine Herzinsuffizienz mit verminderter EF (engl. heart failure with reduced ejection fraction; HFrEF), während der Graubereich (40-49% EF) neuerdings als Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter EF (engl. heart failure with mid-range ejection fraction; HFmrEF) definiert wird (Ponikowski et al., 2016^[144]). Bei steigender Prozentzahl (1% pro Jahr) liegt bei mehr als 50% der Fälle eine HFpEF vor (Shah et al., 2016^[159]). Obwohl die Herzinsuffizienz ein kontinuierliches Krankheitsspektrum zwischen den Extremen der systolischen (HFrEF) und der diastolischen Herzinsuffizienz (HFpEF) darstellt (Komamura, 2013^[87]), gibt es viele Unterschiede zwischen den Patientengruppen (MAGGIC, 2012^[122]). Während Patienten mit HFrEF öfters an koronarer Herzkrankheit leiden (MAGGIC, 2012^[122]; Owan et al., 2006^[139]), sind die Patienten mit HFpEF älter, häufiger weiblich und leiden typischer Weise an einer Vielzahl von Komorbiditäten (Gladden et al., 2014^[56]; Shah et al., 2016^[159]). Dazu gehören besonders Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, chronische Niereninsuffizienz und ein Schlafapnoe-Syndrom (Shah et al., 2016^[159]).

Phänotypisch können zwei Arten von ventrikulärem Remodeling (eine Gruppe von molekularen, zellulären sowie interstitiellen Veränderungen) unterschieden werden (Azevedo et al., 2016^[7]). Bei der HFrEF findet man eher eine progressive Dilatation oder exzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels, die sich aufgrund eines Myozytenverlustes (durch Nekrose, Apoptose, Autophagozytose (Vollert & Möckel, 2016^[178], S. 1832)), einer kardiomyozytären Hypertrophie und einer Umorganisation der extrazellulären Matrix entwickelt (Komamura, 2013^[87]). Dagegen zeigen Patienten mit HFpEF eher eine konzentrische Herzyhypertrophie einschließlich einer myokardialen Fibrose (Gladden et al., 2014^[56]; Komamura, 2013^[87]) mit resultierender erhöhter Steifigkeit und abnormaler Relaxationszeit des linken Ventrikels (Zile et al., 2004^[197]). Allerdings kann bei beiden Formen der Herzinsuffizienz charakteristischerweise eine

diastolische Dysfunktion beobachtet werden (Borlaug & Redfield, 2011^[19]). Während auf der einen Seite die HFrEF-Patienten von einer neuroendokrinen Blockade der Kompensationsmechanismen des Körpers (via z.B. ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten, β -Blocker und Aldosteron-Antagonisten) profitieren (Ponikowski et al., 2016^[144]), wird im Gegensatz dazu die Prognose der HFpEF-Patienten von einer Blockade des RAAS nicht verbessert (MAGGIC, 2012^[122]).

Wir spekulieren, dass bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz, so z.B. auch bei der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM), besonders fokale Energiedisbalancen und reaktive Sauerstoffspezies eine grundlegende Rolle in der Pathophysiologie des Krankheitsbilds spielen. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit molekulare Mechanismen des Syndroms anhand eines bezüglich der antioxidativen Kapazität gentechnisch veränderten Mausmodells weiter ergründet und ein aus den 80er Jahren stammendes Therapiekonzept (Maack et al., 2018^[111]) hinsichtlich seines Einflusses auf die kardiomyozytäre Physiologie überprüft.

2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die HCM ist mit einer Prävalenz von 0,2% die häufigste nach Mendel vererbte kardiale Erkrankung in der gesamten Bevölkerung (Frey et al., 2012^[53]; Vakrou & Abraham, 2014^[176]). Laut ESC ist die HCM durch eine erhöhte linksventrikuläre Wanddicke definiert, die nicht nur alleine auf pathologisch veränderte Füllungsdrücke zurückzuführen ist (Elliott et al., 2014^[49]). Typische Charakteristika der autosomal vererbten Krankheit sind eine Hypertrophie der Kardiomyozyten mit konsekutiver Verdickung der Ventrikelwand, eine myozytäre Umstrukturierung, eine interstitielle Fibrose und eine diastolische Dysfunktion (Vakrou & Abraham, 2014^[176]; Watkins et al., 2011^[183]). Die HCM wird durch dominante Mutationen von einzelnen Genen ausgelöst, die für strukturelle und/oder funktionelle Proteine des Sarkomers codieren (Maron & Maron, 2013^[114]). Dabei wird bei der Mehrzahl der erfolgreich genotypisierten HCM-Patienten die krankheitsauslösende Mutation entweder in dem *MYH7*- (codierend für engl. β -myosin heavy chain) oder dem *MYBPC3*-Gen (codierend für Myosin-bindendes Protein C/MyBP-C) gefunden (Frey et al., 2012^[53]; Maron & Maron, 2013^[114]; Watkins et al., 2011^[183]). Diese und aus anderen Mutationen hervorgehenden Genprodukte spielen eine Rolle bei der elektromechanischen Kopplung (Bers, 2002^[14]; Vakrou & Abraham,

2014^[176]). Auf molekularer Ebene führen diese Veränderungen der Expression zu einer gesteigerten Kontraktilität, die durch eine Ca^{2+} -Sensibilisierung der Aktinfilamente, eine veränderte Myosin-ATPase-Aktivität oder eine Aberration der MyBP-C-abhängigen Regulation der Querbrückenbildung im Herzen bedingt wird (Watkins et al., 2011^[183]). Die hieraus entstehende Hyperkontraktilität führt innerhalb der Zelle zu exzessivem Energieverbrauch mit resultierender Einschränkung ATP-abhängiger Prozesse (insbesondere die sarkoendoplasmatische Reticulum Ca^{2+} -ATPase/ SERCA) (Watkins et al., 2011^[183]) und gestörtem Calcium-Handling (Frey et al., 2012^[53]; Vakrou & Abraham, 2014^[176]; Watkins et al., 2011^[183]). Da die zelluläre Energiegewinnung über die zwei Hauptregulatoren der oxidativen Phosphorylierung, Ca^{2+} und Adenosindiphosphat (ADP), moduliert wird (Maack, 2016^[110]; Nickel et al., 2013^[130]), spielt die Energiehomöostase eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HCM (Frey et al., 2012^[53]).

Die klinische Manifestation der HCM reicht von einem asymptomatischen Verlauf bis hin zum plötzlichen Herztod (Marian & Roberts, 2001^[112]). Bei jungen Erwachsenen ist die HCM der häufigste Grund für einen plötzlichen Herztod (Frey et al., 2012^[53]; Maron, 2003^[113]; Maron & Maron, 2013^[114]); dieser tritt in Folge von ventrikuläre Tachykardien bzw. Kammerflimmern ein (Maron, 2003^[113]). Daneben kann sich die kongenitale HCM auch als eine Herzinsuffizienz mit HFpEF typischen Symptomen präsentieren (Maron & Maron, 2013^[114]) und gilt als eine eigenständige Ätiologie in der Pathogenese der Herzinsuffizienz (Ponikowski et al., 2016^[144]).

2.3 Die elektromechanische Kopplung

Unter dem Begriff der elektromechanischen Kopplung versteht man alle ablaufenden Prozesse von der elektrischen Erregung der Muskelzelle durch ein Aktionspotenzial bis hin zur mechanischen Kontraktion (Bers, 2002^[14]). Hierbei spielt Ca^{2+} sowohl in der elektrischen Aktivität des Herzens als auch in der kontraktionsauslösenden direkten Aktivierung der Myofilamente eine essentielle Rolle (Bers, 2002^[14]). Nach anfänglicher Depolarisation via spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle (I_{Na}) und einer durch einen transienten K^+ -Ausstrom vermittelten partiellen Repolarisation des initialen Aktionspotenzials (Piper, 2010^[142], S. 518) kommt es in der Plateauphase zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (I_{Ca}) über spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC), die in der

Tiefe der Zelle entlang der transversalen Tubuli (T-Tubuli) lokalisiert sind (Kraft & Brenner, 2014^[90], S. 166). In der Herzmuskelzelle bilden die T-Tubuli mit den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ca. 10 nm große Dyaden (engl. junctional cleft), die eine Art der zellulären Ca^{2+} -Mikrodomänen darstellen (Maack & O'Rourke, 2007^[108]) und in Abbildung 1 rot unterlegt sind. In dieser liegen 10-25 LTCC 100-200 Ryanodin-Rezeptoren des Typ 2 (RyR2) gegenüber (Bers, 2008^[16]). Bei Einstrom der Ca^{2+} -Ionen über LTCC kommt es im Sinne einer „ Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung“ zu einer Ausschüttung der im SR gespeicherten Ca^{2+} -Ionen (Fabiato, 1983^[51]; Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Zeitlich und lokal auf die Dyade begrenzt kommt es dann zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, welche von ca. 10 μM bis hin zu 7 mM innerhalb der ersten Millisekunden (ms) reichen kann (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Infolge von Diffusion verteilen sich die Ca^{2+} -Ionen innerhalb des Sarkoplasmas und erreichen dort später geringere Ca^{2+} -Spitzenkonzentrationen (subsarkolemmal ca. 1,5 μM , übriges Cytosol ca. 0,5 μM) (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Dagegen beträgt im ruhenden Herzen die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration ca. 100 nM (Schraeder et al., 2014^[155], S. 195). Innerhalb des kontraktile Apparats bilden Troponin C, Troponin I (inhibitorische Untereinheit), Troponin T (Tropomyosin-assoziierte Untereinheit) und Tropomyosin einen Proteinkomplex, der die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des Querbrückenzyklus zwischen den Filamenten Aktin und Myosin reguliert (Kraft & Brenner, 2014^[90], S. 136-140). Bindet Troponin C Ca^{2+} , so wird die Bindung zu Troponin I forciert, Troponin I gibt seine Aktinbindestelle frei und im Zuge einer Konformationsänderung des gesamten Troponin/Tropomyosinkomplexes kann Myosin mit Aktin im Rahmen des Querbrückenzyklus interagieren (Bers, 2008^[16]). Für eine Relaxation muss die Ca^{2+} -Konzentration wieder abnehmen, sodass Ca^{2+} von Troponin C abdiffundieren kann (Bers, 2002^[14]). Zu den Hauptmechanismen der cytosolischen Ca^{2+} -Elimination zählen die SERCA, der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) über seinen (engl.) „forward-mode“ und die plasmalemmale Ca^{2+} -ATPase (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Dabei arbeitet der NCX in einer Stöchiometrie von 3 Na^+ zu 1 Ca^{2+} (Bay et al., 2013^[12]). Während in größeren Säugetieren die SERCA ca. 70% und der NCX ca. 28% der Ca^{2+} -Ionen extrudieren (auch beim Menschen), liegt das Verhältnis bei Ratte und Maus deutlicher auf der Seite der SERCA mit ca. 92% zu etwa 7% (Bers, 2002^[14]; Bers, 2006^[15]). Die Tätigkeit des NCX ist eng an die Funktion der sarkolemmalen Na^+/K^+ -ATPase (NKA) gekoppelt, die unter ATP-Verbrauch 3 Na^+ im Austausch gegen 2 K^+ aus der Zelle hinaus transportiert (Bay et al., 2013^[12]).

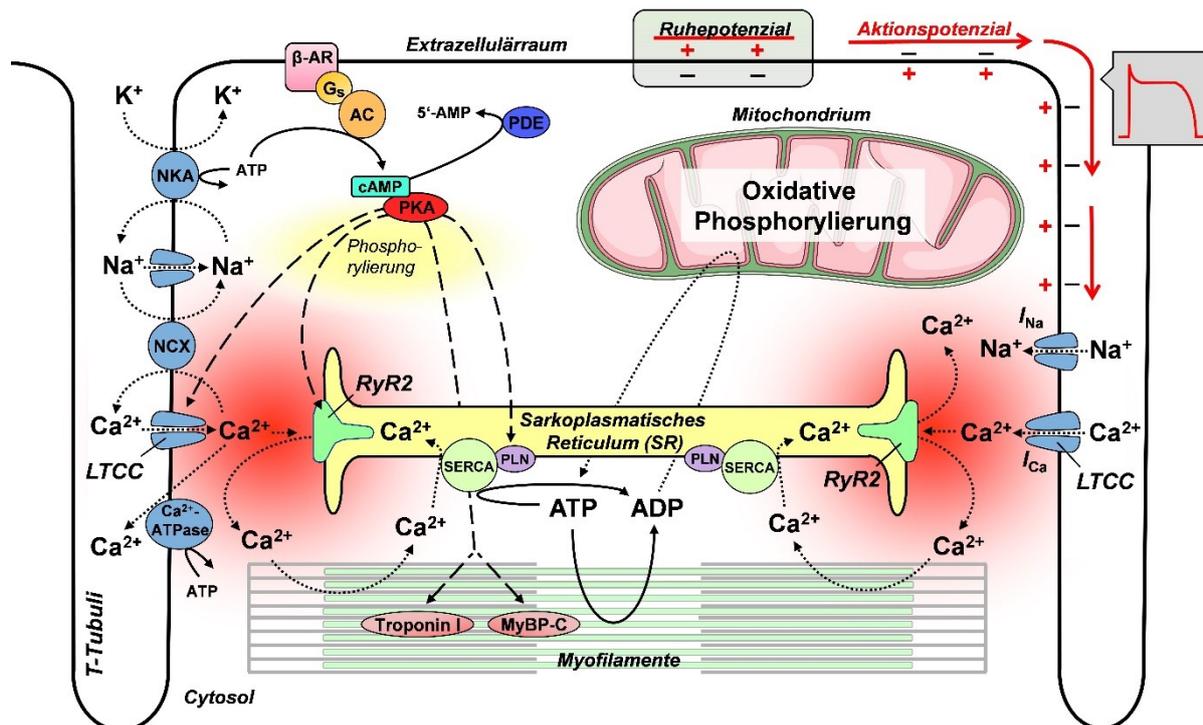


Abbildung 1: Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten

In der Herzmuskelzelle werden bei elektrischer Erregung durch ein Aktionspotenzial eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen äußerst koordiniert in Gang gesetzt, die letztendlich in einer Kontraktion der Myofilamente münden. Abkürzungen: AC, Adenylatcyclase; ADP, Adenosindiphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat; ATP, Adenosintri-phosphat; β-AR, β-adrenerger Rezeptor; Ca²⁺, ionisiertes Calcium; cAMP, cyclisches AMP; G_s, GTP-bindendes Protein; I_{Ca}, Ca²⁺-Einstrom, I_{Na}, Na⁺-Einstrom; K⁺, ionisiertes Kalium; LTCC, L-Typ-Ca²⁺-Kanal; MyBP-C, Myosin-bindendes Protein C; Na⁺, ionisiertes Natrium; NCX, Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; NKA, Na⁺/K⁺-ATPase; PDE, Phosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; PLN, Phospholamban; RyR2, Ryanodin-Rezeptor Typ 2; SERCA, sarkoendoplasmatisches Reticulum Ca²⁺-ATPase; T-Tubuli, transversale Tubuli; (Abbildung modifiziert nach Maack & O'Rourke, 2007^[108]).

Auf die Ca²⁺-Konzentration und somit auf die elektromechanische Kopplung kann die sympathische Aktivierung über die Stimulation von β-adrenergen Rezeptoren (β-AR) modulierend wirken (Bers, 2002^[14]). In menschlichen Herzen werden neben β₂- (zu ca. 30%) hauptsächlich β₁-Adrenorezeptoren (zu ca. 70%) exprimiert, die überwiegend für die Katecholamin vermittelten Effekte verantwortlich sind (Lohse et al., 2003^[100]). Bei β-adrenerger Stimulation wird die membranständige Adenylatcyclase (AC) über stimulatorische GTP-bindende Proteine (G_s) zur Bildung von cyclischem AMP (cAMP) aus ATP angeregt (Piper, 2010^[142], S. 521). Nach Aktivierung durch cAMP phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA) verschiedene Proteine der elektromechanischen Kopplung (Phospholamban/PLN, LTCC, RyR, Troponin I und Myosin-bindendes Protein C; siehe Abbildung 1) (Bers, 2002^[14]). So wird z.B. die Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente durch Phosphorylierung von Troponin I und dem MyBP-C moduliert (Lohse et al., 2003^[100]). Ebenfalls wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR durch die PKA beeinflusst

(Bers, 2002^[14]). Der lusitrope Effekt der PKA beruht zum einen auf der Phosphorylierung von Troponin I mit damit verbundener Abdissoziation der Ca^{2+} -Ionen von den Myofilamenten und zum anderen auf der Phosphorylierung von Phospholamban (Li et al., 2000^[97]). Phospholamban ist ein natürliche Inhibitor der SERCA und beschleunigt deshalb bei Inaktivierung durch Phosphorylierung die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR (Piper, 2010^[142], S. 522). In der Summe führt somit die cAMP-abhängige Phosphorylierung der PKA zu einem positiv inotropen Effekt, der auf einer erhöhten Ca^{2+} -Transienten-Amplitude beruht, die wiederum durch einen vermehrten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über LTCC und eine größere Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR bedingt wird (Bers, 2002^[14]).

Im Gegensatz dazu spielen Phosphodiesterasen eine essentielle Rolle in der Kontrolle von Signalkaskaden, die durch cyclische Nukleotide ausgelöst werden (Knight & Yan, 2012^[80]). Zur Begrenzung des zuvor beschriebenen Signalwegs wird der Second Messenger cAMP insbesondere durch die Phosphodiesterasen 3 und 4 (PDE3 und PDE4) zu 5'-AMP gespalten und somit inaktiviert (Gulbins & Lang, 2010^[60], S. 27; Maack et al., 2018^[111]).

2.4 Inotropika

Beim Auftreten einer akuten Herzinsuffizienz mit Hypotension, Hypoperfusion oder kardiogenem Schock sind manche Patienten auf eine intravenöse Applikation von Inotropika zur Aufrechterhaltung der peripheren Perfusion durch Steigerung des HZV und Blutdrucks angewiesen (Nagy et al., 2014^[129]). Dabei bewirken die klassischen Inotropika wie β -adrenerge Agonisten und Phosphodiesterase-III-Inhibitoren über eine Steigerung des cAMP-Spiegels eine konsekutive Erhöhung und Beschleunigung intrazellulärer Ca^{2+} -Transienten mit daraus resultierender Verbesserung der Kontraktilität und Relaxation (Pathak et al., 2013^[140]; Perrone & Kaplinsky, 2005^[141]). Die Digitalisglykoside wie z.B. Digoxin mobilisieren und erhöhen durch Inhibition der NKA intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen über eine Beeinflussung der Kinetik des sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) und agieren somit unabhängig von der adrenergen Stimulation über cAMP (Maack et al., 2018^[111]; Nagy et al., 2014^[129]).

Der Einsatz klassischer Inotropika hat trotz Verbesserung der Hämodynamik langfristig adverse Effekte (z.B. Myokardischämien, erhöhter myokardialer Sauerstoffverbrauch

und ventrikuläre Arrhythmien (Belletti et al., 2015^[13]; Maack et al., 2018^[111]; Pathak et al., 2013^[140]), die mit einer erhöhten Mortalität (Elkayam et al., 2007^[48]; Nagy et al., 2014^[129]; Perrone & Kaplinsky, 2005^[141]) und Rehospitalisierung (Elkayam et al., 2007^[48]) einhergehen.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Inotropika bewirken Calcium-Sensitizer einen Anstieg der Kontraktionskraft bei gleichbleibenden Calciumtransienten (Nagy et al., 2014^[129]; Pollesello et al., 2016^[143]). Die Sensibilisierung der Filamente für Ca^{2+} wird durch verschiedene pharmakologische Mechanismen realisiert und erstreckt sich von einer direkter Aktivierung des Motorproteins Myosin bis hin zu einer Ca^{2+} -Affinitätssteigerung des Troponin C (Kass & Solaro, 2006^[76]). Die Substanz EMD 57033 greift an der Bindestelle des Aktins und Myosins an (Nagy et al., 2014^[129]; Schlecht et al., 2016^[154]) und sorgt primär für eine Verstärkung der Kraftentwicklung jeder einzelnen Querbrücke (Schlecht et al., 2016^[154]). Allerdings besitzt EMD 57033 auch eine Phosphodiesterase-III-inhibitorische Funktion (Kass & Solaro, 2006^[76]; de Zeeuw et al., 2000^[195]) und beeinträchtigt darüber hinaus die diastolische Relaxation (Kass & Solaro, 2006^[76]; Nagy et al., 2014^[129]; Perrone & Kaplinsky, 2005^[141]).

2.5 Mitochondriale Energetik

Um den variablen Energieverbrauch der Kardiomyozyten bei permanenter Änderung der Arbeitslast des Herzens decken zu können, ist eine effiziente Abstimmung zwischen Energiebereitstellung und -bedarf entscheidend (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Neben dem ATP-Verbrauch verschiedener Ionenpumpen (insbesondere SERCA) (Doenst et al., 2013^[46]) wird der Großteil der Energie im Herzen an der myofilamentären Myosin-ATPase konsumiert (Maack, 2016^[110]). Dies geschieht unter einem extrem hohen Energieumsatz; so wird der gesamte myozytäre ATP-Pool beispielsweise innerhalb von wenigen Sekunden verbraucht (Balaban, 2002^[9]; Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Unter aeroben Bedingungen werden über 90% des ATP durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien produziert (Chen & Zweier, 2014^[31]; Doenst et al., 2013^[46]). Diese nehmen ein Zellvolumen von über 30% innerhalb der hochorganisierten Kardiomyozyten ein (Chen & Zweier, 2014^[31]; Maack, 2016^[110]) und sind über mechanische Verbindungen wie z.B. über die Proteine Mitofusin (Mfn) 1 und 2 mit dem

SR verknüpft (Chen et al., 2012^[30]; Kohlhaas et al., 2017^[86]). Ca^{2+} -Ionen können aufgrund dieser engen Assoziation der beiden Organellen innerhalb einer Ca^{2+} -Mikrodomäne effizient aufgenommen werden und stimulierend auf mitochondriale Proteine wirken (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]). Im Speziellen gelangen die Ca^{2+} -Ionen über den unselektiven, in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) gelegenen (engl.) „voltage dependant anion channel“ (VDAC) in den Intermembranraum (engl. intermembrane space/ IMS) und werden dann über den in der inneren mitochondrialen Membran (IMM) lokalisierten mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) in den Matrixraum transportiert (Feissner et al., 2009^[52]; Rizzuto et al., 2009^[150]). Als Treibkraft dieses Prozesses dient ein großer elektrochemischer Gradient, der sich aus dem mitochondrialen Membranpotenzial von $\Delta\Psi_m \sim -180 \text{ mV}$ sowie zeitlich und räumlich begrenzten (Mikrodomäne) Ca^{2+} -Spitzenkonzentrationen zusammensetzt (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]).

Innerhalb der mitochondrialen Matrix werden die verschiedenen Abbauprodukte von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren an unterschiedlichen Stellen in den Citratzyklus (auch Krebs-Zyklus) eingeschleust (Löffler & Brandt, 2007^[99], S. 478-479). Im menschlichen Herz wird der Zyklus zu ca. 70% von Metaboliten des Fettsäureabbaus und ca. 30% von Intermediaten des Glucoseabbaus gespeist (Nickel et al., 2013^[130]). Dabei wird z.B. vor dem Eintritt in den Citratzyklus das Endprodukt der Glykolyse (Pyruvat) durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) unter Bildung von Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) und NADH decarboxyliert (Löffler & Brandt, 2007^[99], S. 479-481). Ebenfalls werden aktivierte Fettsäuren unter Produktion von Acetyl-CoA, NADH und FADH_2 via β -Oxidation in der mitochondrialen Matrix zuerst abgebaut (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Das gebildete Acetyl-CoA wird dann mittels Citratsynthase in den Citratzyklus eingeführt und generiert beim einmaligen Durchlaufen neben einem Guanosintriphosphat (GTP) gleichfalls NADH (3) und FADH_2 (1) (Löffler & Brandt, 2007^[99], S. 478-481). Beide Reduktionsäquivalente (NADH und FADH_2) geben ihre Elektronen an der Atmungskette ab und induzieren dadurch entlang der Komplexe I-IV sequenzielle Redoxreaktionen, die zu einer Translokation von Protonen (H^+) über die IMM in den IMS führen (Nickel et al., 2014^[131]). Der hieraus resultierende Protonengradient (ΔpH) erzeugt zusammen mit dem elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi_m$) die protonenmotorische Kraft ($\Delta\mu_{\text{H}}$), die die Treibkraft für die ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATPase (Komplex V) darstellt (Nickel et al., 2014^[131]). Das entstandene ATP kann anschließend über

den Adeninnucleotid-Carrier (engl. adenine nucleotide translocator/ ANT) im Austausch gegen ADP aus der mitochondrialen Matrix exportiert werden (Brandt, 2007^[22], S. 492-494) und die cytosolischen ATP-Konsumenten über das Kreatinkinase/CK-Phosphokreatin-System erreichen (Schlattner et al., 2006^[153]). Als finale Reaktion der Atmungskette werden am Komplex IV die Elektronen unter Bildung von Wasser (H_2O) auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen (Rich & Maréchal, 2010^[147]).

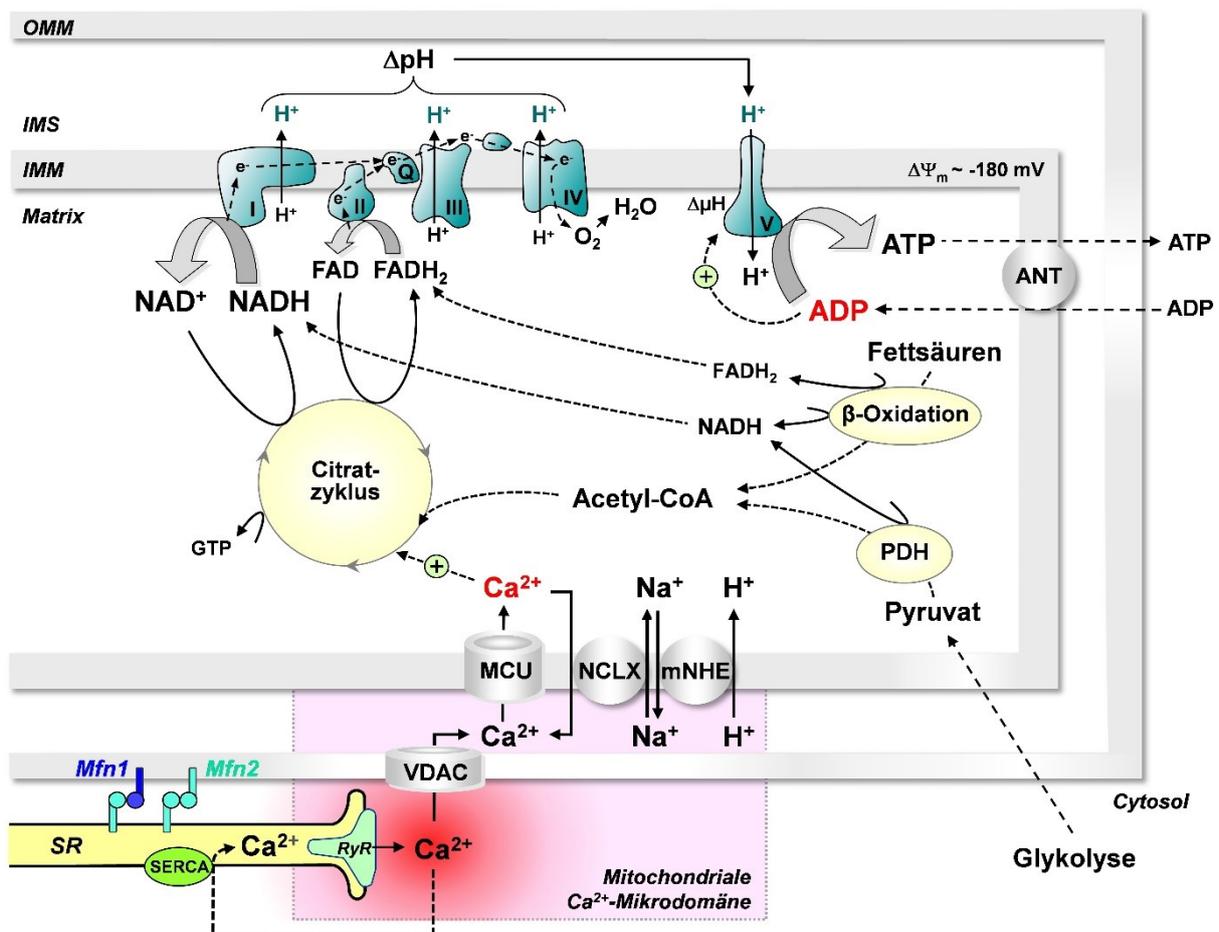


Abbildung 2: Mitochondriale Energetik

Mithilfe einer hochspezialisierten, feinabgestimmten und komplexen Maschinerie regulieren Myozyten ihre Energieproduktion im Mitochondrium. Hierbei entsteht an Komplex V Energie in Form von ATP. Abkürzungen: Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym A; ADP, Adenosindiphosphat; ANT, Adeninnucleotid-Carrier; ATP, Adenosintriphosphat; β , Beta; Ca^{2+} , ionisiertes Calcium; e^- , Elektron; $FADH_2/FAD$, reduziertes/oxidiertes Flavinadenindinukleotid; GTP, Guanosintriphosphat; H^+ , Proton; H_2O , Wasser; IMM, innere mitochondriale Membran; IMS, (engl.) intermembrane space; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} -Unipor; Mfn, Mitofusin; mNHE, mitochondrialer Na^+/H^+ Austauscher; Na^+ , ionisiertes Natrium; $NADH/NAD^+$, reduziertes/oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid; NCLX, mitochondrialer Na^+/Ca^{2+} -Austauscher; O_2 , molekularer Sauerstoff; OMM, (engl.) outer mitochondrial membrane; PDH, Pyruvatdehydrogenase; Q, Ubichinon; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SERCA, sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; VDAC, (engl.) voltage dependant anion channel; $\Delta\mu H$, protonenmotorische Kraft; $\Delta p H$, Protonengradient; $\Delta\Psi_m$, mitochondriales Membranpotenzial; (Abbildung modifiziert nach Nickel et al., 2014^[131]).

Die zwei Hauptregulatoren der mitochondrialen Atmung (in Abbildung 2 in roter Schrift dargestellt) sind Ca^{2+} und ADP (Cortassa et al., 2006^[32]; Maack, 2016^[110]). Diese können bei Erhöhung der Arbeitslast die ATP-Produktion ungefähr um ein Vierfaches steigern (Balaban, 2002^[9]; Nickel et al., 2015^[132]). Denn die F_1F_0 -ATPase wird direkt durch ADP stimuliert und führt über eine Beschleunigung der ATP-Produktion zu einer Abnahme der protonenmotorischen Kraft ($\Delta\mu_{\text{H}}$) (Nickel et al., 2014^[131]). Um $\Delta\mu_{\text{H}}$ aufrecht zu erhalten, geben NADH und FADH_2 vermehrt Elektronen an die Atmungskette ab und fördern so den Elektronenfluss und Sauerstoffverbrauch (Nickel et al., 2014^[131]). Dies wird als die sogenannte „Pull“-Kondition bezeichnet (Kohlhaas et al., 2017^[86]). Dagegen führt die vermehrte mitochondriale Aufnahme von Ca^{2+} zu einer akzelerierten Regeneration von NADH und FADH_2 über die Aktivierung von Schlüsselenzymen des Citratzyklus (Nickel et al., 2014^[131]) (sogenannte „Push“-Kondition (Kohlhaas et al., 2017^[86])). Neben Schlüsselenzymen des Krebs-Zyklus (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Isocitratdehydrogenase) werden auch andere mit der Energieproduktion assoziierte Enzyme und Transporter (PDH, F_1F_0 -ATPase, Aspartat-Glutamat-Carrier und ATP-Mg/ P_i -Carrier) durch Ca^{2+} aktiviert (Glancy & Balaban, 2012^[57]). Hierbei wird das Muster der mitochondrialen Ca^{2+} -Stimulation als „parallele Aktivierung“ bezeichnet, denn Ca^{2+} fördert sowohl die NADH- und FADH_2 -Regeneration durch den Citratzyklus als auch die ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATPase (Balaban, 2002^[9]; Kohlhaas et al., 2017^[86]).

Zur Elimination wird Ca^{2+} primär im Austausch gegen Na^+ (oder Li^+) über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCLX) aus der Matrix befördert (Bay et al., 2013^[12]). Allerdings besitzt der NCLX eine langsamere Kinetik als der für die Ca^{2+} -Aufnahme verantwortliche MCU und begründet daher eine mitochondriale Ca^{2+} -Akku-mulation bei einer erhöhten Frequenz und Amplitude cytosolischer Ca^{2+} -Transienten (Bay et al., 2013^[12]). Die importierten Na^+ -Ionen müssen letztendlich auf Kosten der über die Atmungskette aufgebauten protonenmotorischen Kraft ($\Delta\mu_{\text{H}}$) mittels des mitochondrialen Na^+/H^+ Austauschers (mNHE) aus dem Matrixraum exportiert werden (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]).

2.6 Reaktive Sauerstoffspezies

Unter dem Begriff der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fasst man sowohl freie Sauerstoffradikale wie Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) und Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) als auch potente Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) zusammen (Feissner et al., 2009^[52]; Zorov et al., 2014^[200]). Neben diesen spielen auch andere sauerstoffhaltige Radikale wie beispielsweise Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$), Alkoxyradikale ($\text{RO}\cdot$) und Lipidhydroperoxide (LOOH) eine essentielle Rolle in einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Prozessen (Zorov et al., 2014^[200]).

ROS besitzen die Fähigkeit, durch ihre hohe Reaktivität zelluläre Komponenten wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren zu schädigen (Feissner et al., 2009^[52]), können allerdings auch in physiologischen Konzentrationen intrazelluläre Signalfunktionen übernehmen (Dietl & Maack, 2017^[43]). Zu den kardiomyozytär relevanten ROS-Quellen gehören Mitochondrien, NADPH-Oxidasen (NOX), entkoppelte Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), die Monoaminoxidase A und die Xanthinoxidase (Nickel et al., 2015^[132]). Während beispielsweise die sarkolemmale NOX2 - durch Angiotensin II getriggert - vermehrt $\cdot\text{O}_2^-$ generiert, produziert die im endoplasmatischen Retikulum, Nukleus und womöglich Mitochondrium vorkommende NOX4 eher H_2O_2 (Münzel et al., 2017^[127]). Ebenso können NOS $\cdot\text{O}_2^-$ anstelle von $\cdot\text{NO}$ infolge einer Verarmung an dem Cofaktor Tetrahydrobiopterin in einem entkoppelten Zustand bilden (Burgoyne et al., 2012^[24]).

Die Mehrzahl der ROS werden aber innerhalb der Mitochondrien produziert (Balaban et al., 2005^[10]; Chen & Zweier, 2014^[31]; Maack, 2016^[110]). Hierbei ist das Superoxidradikal ($\cdot\text{O}_2^-$) die primär und am häufigsten vorkommende reaktive Sauerstoffspezies (Zorov et al., 2014^[200]). Dieses wird je nach metabolischem Status der Zelle von etwa 0,2-2% aberranter Elektronen der Atmungskette in der Interaktion mit O_2 gebildet (Kembro et al., 2013^[77]; Münzel et al., 2015^[126]). Dabei werden die meisten $\cdot\text{O}_2^-$ an der Flavinmononukleotid(FMN)-Gruppe des Komplex I und im Ubichinon(Q)-Zyklus des Komplex III erzeugt (siehe Abbildung 3) (Murphy, 2009^[128]; Nickel et al., 2014^[131]). Neben den Komplexen der Atmungskette können auch andere reduzierte Flavine und Flavoproteine (z.B. α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) $\cdot\text{O}_2^-$ generieren (Feissner et al., 2009^[52]). Während in der mitochondrialen Matrix die $\cdot\text{O}_2^-$ -Moleküle über die Mangan-abhängige Superoxiddismutase (Mn-SOD, SOD2) zu H_2O_2 umgewandelt werden, findet

die gleiche Reaktion extramitochondrial über die Kupfer/Zink-abhängige Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD, SOD1) statt (Zorov et al., 2014^[200]). Aus H₂O₂ können dann z.B. über die Interaktion mit dreiwertigem Eisen (Fe³⁺) und ·O₂⁻ gemäß der Haber-Weiss-Reaktion oder über die Reaktion mit Fe²⁺ entsprechend der Fenton-Reaktion äußerst aggressive Hydroxylradikale (·OH) entstehen (Chen & Zweier, 2014^[31]; Zorov et al., 2014^[200]). Zur Elimination werden die anfallenden H₂O₂-Moleküle intramitochondrial durch Peroxiredoxin (PRX) und die Glutathion-Peroxidase (GPX) zu H₂O umgesetzt (Nickel et al., 2014^[131]). Die Regeneration dieser H₂O₂-abbauenden Enzyme wird zum einen bei der GPX durch reduziertes Glutathion (GSH) und zum anderen bei PRX via reduziertem Thioredoxin (TRX_r) gewährleistet (Nickel et al., 2014^[131]). Der antioxidative Mechanismus wird durch Redoxreaktionen zweier NADPH-abhängiger Enzyme (Glutathion-Reduktase/GR und Thioredoxin-Reduktase/TR) komplettiert und weist damit NADPH eine zentrale Rolle in der terminalen mitochondrialen ROS-Elimination zu (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]). NADPH wird selbst von drei Enzymen (Isocitratdehydrogenase/IDH, NADP⁺-abhängiges Malatenzym/MEP, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase/Nnt) regeneriert, die ihre Substrate aus Produkten des Citratzyklus beziehen (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]). Somit kontrolliert Ca²⁺ via Aktivierung des Krebszyklus auch die Regeneration von NADPH (antioxidative Kapazität) und als Folge die Netto-H₂O₂-Produktion der Mitochondrien (Kohlhaas et al., 2010^[83]). Die Nnt fungiert darüber hinaus als zentrale und kritische Verbindung der mitochondrialen NADPH- und NADH-Pools, denn sie katalysiert die an die Δμ_H gekoppelte bidirektionale Reaktion NADH + NADP⁺ ↔ NADPH + NAD⁺, die bei einer pathologischen Steigerung der Arbeitslast die Generation von NADH auf Kosten der NADPH-abhängigen antioxidativen Kapazität favorisiert (Nickel et al., 2015^[132]).

Als oxidativen Stress bezeichnet man einen quantitativen Anstieg der ROS jenseits eines physiologischen Niveaus (Zorov et al., 2014^[200]) in Folge einer Imbalance zwischen ROS-Produktion und -Entgiftung (Kohlhaas et al., 2017^[86]; Zorov et al., 2014^[200]). So tritt z.B. die maximale ·O₂⁻-Produktion bei geringem zellulären Energie- und Sauerstoffverbrauch in der Anwesenheit von Substraten (experimentell als State 2 und State 4 Atmung definiert) auf (Kohlhaas & Maack, 2013^[84]). In diesem Zustand ist die Atmungskette äußerst reduziert und Elektronen tendieren vermehrt dazu, auf O₂ überzuspringen (Nickel et al., 2014^[131]). Dagegen werden die Komplexe der Atmungskette bei beschleunigtem Elektronenfluss und Sauerstoffverbrauch durch ADP (State 3 Atmung) mehr oxidiert, was zu einer Abnahme des Redoxpotenzials und

damit einer konsekutiven Verringerung der $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung führt (Murphy, 2009^[128]; Nickel et al., 2014^[131]). Nach dem Konzept des „redox-optimierten ROS-Gleichgewichts“ (engl. Redox-optimized ROS balance (Aon et al., 2010^[6])) befinden sich Mitochondrien in einem intermediären Redoxstatus (siehe auch Abbildung 25), der es ihnen erlaubt, eine maximale Leistung bei minimaler ROS-Produktion zu erbringen (Aon et al., 2010^[6]; Nickel et al., 2013^[130]). Gemäß dieser Hypothese kommt es auf der einen Seite bei extremer Oxidation des Redoxmilieus zu einer Erschöpfung der antioxidativen Kapazität, während es auf der anderen Seite bei extremer Reduktion des Milieus zu einer $\cdot\text{O}_2^-$ -Überflutung seitens der Atmungskette kommt (Aon et al., 2010^[6]; Cortassa et al., 2014^[33]).

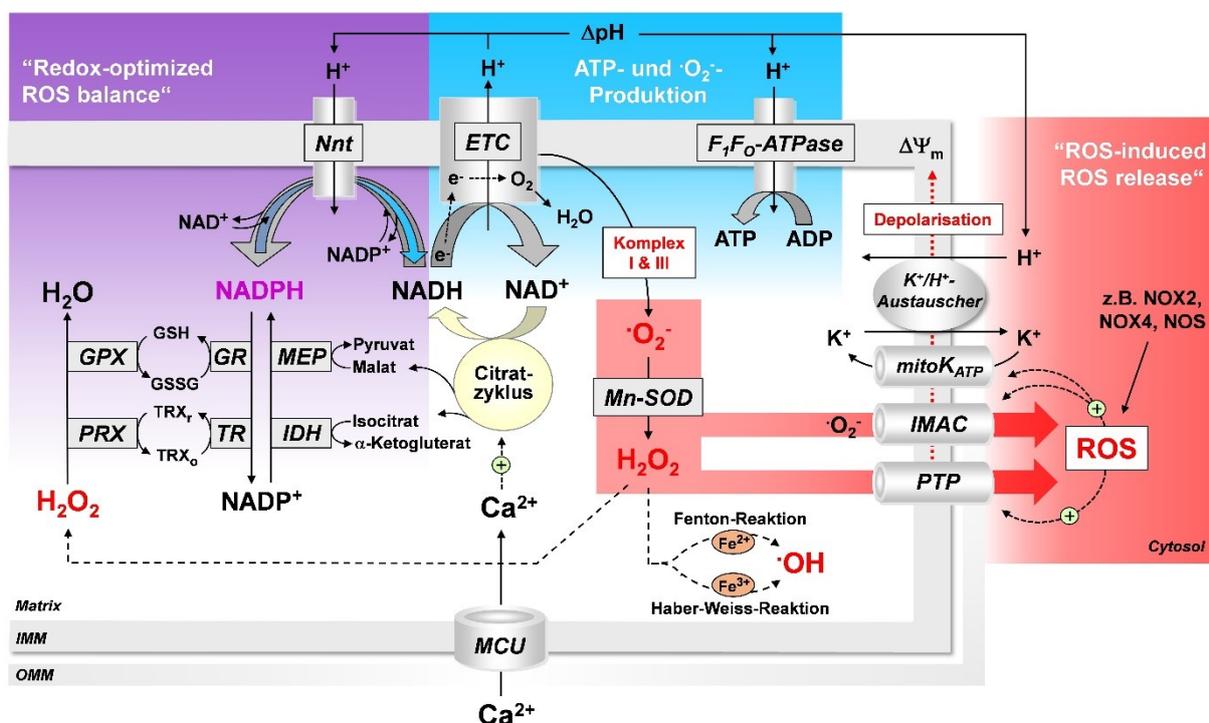


Abbildung 3: Reaktive Sauerstoffspezies und deren Metabolismus

Zur Elimination der besonders im Mitochondrium anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies gibt es innerhalb des Organells wirkungsvolle Entgiftungsmechanismen, die oxidativen Stress vorbeugen sollen. ROS können aber auch als essentielle Signalmoleküle innerhalb der Zelle fungieren. Abkürzungen: α , Alpha; ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; Ca^{2+} , ionisiertes Calcium; e^- , Elektron; ETC, Elektronentransportkette; $\text{Fe}^{2+/3+}$, ionisiertes Eisen; GPX, Glutathion-Peroxidase; GR, Glutathion-Reduktase; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; H^+ , Proton; H_2O , Wasser; H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; IDH, Isocitratdehydrogenase; IMAC, (engl.) inner membrane anion channel; IMM, innere mitochondriale Membran; K^+ , ionisiertes Kalium; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; MEP, NADP^+ -abhängiges Malatenzym; mitoKATP, mitochondrialer ATP-abhängiger K^+ -Kanal; Mn, Mangan; NAD(P)H/NAD(P)^+ , reduziertes/oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid(phosphat); Nnt, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase; NOS, Stickstoffmonoxid-Synthase; NOX, NADPH-Oxidase; O_2 , molekularer Sauerstoff; $\cdot\text{O}_2^-$, Superoxidradikal; $\cdot\text{OH}$, Hydroxylradikal; OMM, (engl.) outer mitochondrial membrane; PRX, Peroxi-redoxin; PTP, Permeabilitäts-Transitions-Pore; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; SOD, Superoxiddismutase; TR, Thioredoxin-Reduktase; $\text{TRX}_r/\text{TRX}_o$, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; ΔpH , Protonengradient; $\Delta\Psi_m$, mitochondriales Membranpotenzial; (Abbildung modifiziert nach Nickel et al., 2014^[131]).

ROS beeinflussen typischerweise Proteine durch posttranslationale Modifikationen der entsprechenden redox-suszeptiblen Sensoren in ihrer Stabilität, Aktivität, molekularen Interaktion und Konformation (Burgoyne et al., 2012^[24]). Während z.B. die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase durch H_2O_2 inaktiviert werden (Nulton-Persson & Szweda, 2001^[134]), wird der gleiche Effekt bei der Aconitase durch $\cdot\text{O}_2^-$ ausgelöst (Gardner et al., 1995^[54]; Kohler et al., 2009^[81]; Nickel et al., 2013^[130]). Ferner werden auch andere Proteine wie Ionenkanäle, Kinasen, Phosphatasen, Strukturproteine, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren in ihrer Aktivität moduliert (z.B. PKA, NKA, RyR2, SERCA, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II/ CaMKII) (Burgoyne et al., 2012^[24]).

Dem gleichen redox-sensiblen Mechanismus unterliegt das Konzept der „ROS-induzierten ROS-Freisetzung“ (engl. ROS-induced ROS release) (Aon et al., 2003^[5]; Zorov et al., 2000^[199]). Laut diesem Modell können ROS durch eine Aktivierung von mitochondrialen Ionenkanälen einen Abbau des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$) und eine ROS-Freisetzung bewirken (Aon et al., 2003^[5]; Zorov et al., 2000^[199]). Während der (engl.) „inner membrane anion channel“ (IMAC) bei Aktivierung durch ROS neben einer Depolarisation des $\Delta\Psi_m$ auch eine Freisetzung von $\cdot\text{O}_2^-$ ins Cytoplasma verursachen kann (Aon et al., 2003^[5]), bildet die aktivierte Permeabilitäts-Transitions-Pore (PTP) eine unselektive Pore in der IMM (Kowaltowski et al., 2001^[89]) und setzt mitochondriale ROS stoßweise frei (Zorov et al., 2000^[199]). Die Öffnung der PTP kann neben einer ROS-induzierten Oxidation von Thiolgruppen (Kowaltowski et al., 2001^[89]) auch durch eine Ca^{2+} -Überladung des mitochondrialen Matrixraums ausgelöst werden (Zoratti & Szabò, 1995^[198]) und steht im Zusammenhang mit dem apoptotischen oder nekrotischen Zelltod (Feissner et al., 2009^[52]). Dagegen können zellweite IMAC-vermittelte Schwankungen des $\Delta\Psi_m$ elektrische Potentiale der Zelle verändern (Aon et al., 2003^[5]) und Arrhythmien im Zellverband des Herzens begünstigen (Akar et al., 2005^[2]).

Ein weiterer Ionenkanal, der die mitochondriale Energetik beeinflussen kann, ist der mitochondriale ATP-abhängige K^+ -Kanal (mitoK_{ATP}) (O'Rourke, 2004^[136]). Dieser kann ebenfalls durch ROS aktiviert werden (Kimura et al., 2005^[78]; Zhang et al., 2001^[196]) und führt bei seiner Öffnung zu einem Einstrom von K^+ -Ionen, die auf Kosten des Protonengradienten (ΔpH) über einen K^+/H^+ -Austauscher wieder aus dem Mitochondrium exportiert werden (O'Rourke, 2004^[136]). Infolge dieser partiellen Entkopplung der oxi-

dativen Phosphorylierung kommt es im Zuge der Regeneration des ΔpH zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch (O'Rourke, 2004^[136]). Eine Öffnung dieser mitoK_{ATP} führt im Rahmen einer ischämischen Präkonditionierung zu einer transienten Erhöhung der mitochondrialen ROS, die über eine Aktivierung von redox-sensiblen Signalwegen eine PTP-Induktion verhindern und so vor Ischämie- und Reperfusionsschäden schützen (Maack & Böhm, 2011^[109]). Mithilfe dieses Mechanismus sollen Mitochondrien auch in der Lage sein, cytosolische ROS-Signale im Sinne der ROS-induzierten ROS-Freisetzung verarbeiten und verstärken zu können (Kimura et al., 2005^[78]; Maack & Böhm, 2011^[109]; Nickel et al., 2014^[131]). So konnte z.B. in Ischämie- und Reperfusionsexperimenten gezeigt werden, dass die kurzfristige Applikation von Angiotensin II, ein Aktivator der NOX2, durch eine ROS-abhängige Aktivierung von mitoK_{ATP} mit nachfolgender Freisetzung mitochondrialer ROS einen kardioprotektiven Effekt bewirkt (Kimura et al., 2005^[78]; Nickel et al., 2014^[131]). Im Zuge einer längerfristigen Angiotensin II-Behandlung führt dagegen eine chronische Exposition von ROS zu einem maladaptiven Remodeling und einer diastolischen Dysfunktion des Herzens (Dai et al., 2011^[37]; Maack & Böhm, 2011^[109]).

ROS werden aber auch mit dem Alterungsprozess und degenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Harman, 1956^[65]). Das Altern stellt hierbei eine progressive und generelle Einschränkung physiologischer Funktionen dar, die mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Umweltfaktoren und einem erhöhten Risiko für Krankheit und Tod einhergeht (Kirkwood, 2005^[79]). Gemäß der (engl.) „Free Radical Theory of Aging“ (Harman, 1956^[65]) führen ROS-induzierte Schädigungen von Biomolekülen über die Zeit zu funktionellen Beeinträchtigungen von zellulären Prozessen (López-Lluch et al., 2015^[102]). Exzessive oxidative Schäden von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Proteinen und Lipiden tragen so hauptsächlich zum endogenen Alterungsprozess und Auftreten degenerativer Alterungserscheinungen wie Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, Immunoseneszenz, Hirnfunktionsstörungen und Katarakten bei (Ames et al., 1993^[4]). Insbesondere die mitochondriale DNA (mtDNA) ist aufgrund ihrer Nähe zur Hauptproduktionsstätte der ROS sowie fehlendem schützendem Proteingerüst suszeptibel für oxidative Schäden und kann letztendlich bei Integritätsverlust die mitochondriale Physiologie verändern (Gonzalez-Freire et al., 2015^[58]). Die hieraus entstehende mitochondriale Dysfunktion kann in einem Circulus vitiosus die ROS-Produktion und damit die oxidativen Schäden weiter verstärken (Ludovico & Burhans, 2014^[105]).

und steht auch deswegen schon seit längerem unter Verdacht, vorrangig am Alterungsprozess beteiligt zu sein (Gonzalez-Freire et al., 2015^[58]).

Im Gegensatz dazu weist das Konzept der „Mitohormesis“ (Tapia, 2006^[168]) geringen Dosen von ROS auch gesundheitsfördernde und lebensverlängernde Signalfunktionen zu (Ristow & Zarse, 2010^[149]). Während hohe ROS-Konzentrationen Makromoleküle schädigen, führt eine niedrige mitochondriale Konzentration von ROS nach diesem Modell zur Induktion einer adaptiven Antwort und letztlich zu verbesserten systemischen Abwehrmechanismen und einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen Stress (Gonzalez-Freire et al., 2015^[58]). Im Speziellen kann jeder endogene oder exogene Stress zu einer Störung der mitochondrialen Funktion führen, durch ROS-abhängige Signalwege die nukleäre Transkription verändern und dadurch zytoprotektive Signalwege induzieren (Yun & Finkel, 2014^[192]).

2.7 Zelluläre Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Zu den charakteristischen kardiomyozytären Veränderungen der chronischen Herzinsuffizienz zählen neben den zuvor beschriebenen makroskopischen Merkmalen eine gestörte elektromechanische Kopplung, ein Energiedefizit und vermehrter oxidativer Stress (Nickel et al., 2013^[130]). Des Weiteren trägt eine ultrastrukturelle Desorganisation der normalerweise hoch organisierten Kardiomyozyten zur Pathophysiologie bei (Maack, 2016^[110]). So kann z.B. bei einer Reorganisation der T-Tubuli die Beziehung der RyR2 des SR zu den sarkolemmlen LTCC verändert werden und dadurch deren lokal und synchron abgestimmtes Aktivitätsmuster verloren gehen (Song et al., 2006^[161]). Ein ähnliches Desorganisationsphänomen zeigt sich angesichts einer verminderten Expression von Mitofusinen innerhalb des mitochondrialen Netzwerks der Kardiomyozyten und soll neben einer intermitochondrialen Desynchronisation ebenfalls zu Störungen zellulärer Funktionen führen (Maack, 2016^[110]). Demgegenüber korrelieren morphologische Auffälligkeiten der Mitochondrien, wie z.B. eine zerstörte Struktur der mitochondrialen Cristae (Auffaltungen der IMM) und eine Schwellung der Mitochondrien, direkt mit einer mitochondrialen Dysfunktion (Abel & Doenst, 2011^[1]).

Während bei der Herzinsuffizienz diastolische Ca^{2+} -Konzentrationen erhöht sind (Bay et al., 2013^[12]; Beuckelmann et al., 1992^[17]; Maack & O'Rourke, 2007^[108]) und ein ver-

langsamer Abfall der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer diastolischen Dysfunktion führt (Bers, 2006^[15]), resultiert die kontraktile Dysfunktion der systolischen Herzinsuffizienz hauptsächlich aus reduzierten systolischen Ca^{2+} -Transienten (Kohlhaas et al., 2017^[86]). Die herabgesetzten Transienten haben eine verringerte Ca^{2+} -Beladung des SR zur Ursache und basieren zum einen auf einer verminderten Expression und Aktivität der SERCA und zum anderen auf Ca^{2+} -Lecks von hyperphosphorylierten RyR2 (Maack & O'Rourke, 2007^[108]). Des Weiteren ist die intrazelluläre Na^+ -Konzentration (physiologisch zwischen 4-10 mM) durch einen vermehrten Na^+ -Einstrom und eine verminderte Na^+ -Eliminierung erhöht (Despa & Bers, 2013^[41]). Dies beruht zum einen auf einem vermehrten und im Verlauf des Aktionspotenzials spät auftretenden Na^+ -Einstrom (engl. late I_{Na}) via spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle (Despa & Bers, 2013^[41]) sowie zum anderen auf einer Einschränkung der Na^+ -extrudierenden Funktion der NKA (Nickel et al., 2014^[131]). Darüber hinaus kann es auch bei einer zellulären Azidose zu einem gesteigerten Na^+ -Einstrom über den sarkolemmalen Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) kommen (Despa & Bers, 2013^[41]). Eine erhöhte Na^+ -Konzentration fördert andererseits während des Aktionspotenzials einen trans-sarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom über den (engl.) „reverse-mode“ des NCX (Maack et al., 2006^[107]; Weber et al., 2003^[184]) und kann so teilweise die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung des SR kompensieren (Kohlhaas et al., 2017^[86]; Weisser-Thomas et al., 2003^[185]). Dagegen soll aber auch die erhöhte Aktivität des vermehrt exprimierten NCX die defiziente Ca^{2+} -Speicherung des SR durch einen nach extrazellulär gesteigerten Ca^{2+} -Transport aggravieren (Bay et al., 2013^[12]). Außerdem vermittelt der eher langsame Ca^{2+} -Einstrom des NCX im Vergleich zu einer koordinierten Ca^{2+} -Freisetzung des SR eine weniger effiziente mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme (Kohlhaas & Maack, 2010^[82]). Gleichzeitig führt eine erhöhte cytosolische Na^+ -Konzentration zu einem vermehrten mitochondrialen Ca^{2+} -Efflux über den NCLX und resultiert wie bei einer verminderten MCU-abhängigen Ca^{2+} -Aufnahme in einer reduzierten mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration (Maack et al., 2006^[107]). Alles in allem führt eine Störung der elektromechanischen Kopplung zu einer Beeinträchtigung der fein abgestimmten mitochondrialen Ca^{2+} -Akkumulation und damit zu einer Diskrepanz zwischen dem Energiebedarf und der Energieerzeugung sowie zu einer reduzierten antioxidativen Kapazität (Kohlhaas et al., 2017^[86]). Denn während auf der einen Seite eine fehlende Ca^{2+} -getriggerte Aktivierung des Krebs-Zyklus die NADPH-Regeneration und dadurch die Wiederherstellung der antioxidativen Kapazität verhindert und so oxidativen Stress in

Form von ROS fördert, bleibt eine suffiziente ATP-Produktion durch eine ebenfalls verminderte NADH-Regeneration aus (Nickel et al., 2014^[131]). Diese Störung der Energiebalance spiegelt sich auch an dem primären Energiereservoir der Kardiomyozyten, dem Kreatinkinase-Phosphokreatin-System (Phosphokreatin/PCr + ADP ↔ Kreatin/Cr + ATP), in einem verminderten Phosphokreatin-Gehalt wider (Weiss et al., 2005^[186]).

Metabolische Veränderungen der Substratutilisation und des intermediären Stoffwechsels sollen ebenfalls zu einem Teil an der Energieverarmung der Kardiomyozyten beteiligt sein (siehe Abbildung 4) (Nickel et al., 2013^[130]). Während in fortgeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz Plasmaspiegel freier Fettsäuren und deren kardiomyozytäre Aufnahme eher erhöht sind, ist die mitochondriale Aufnahme der Fettsäuren und die Fettsäureoxidation (β -Oxidation) generell vermindert (Nickel et al., 2013^[130]). Die hieraus resultierende zelluläre Akkumulation von toxischen Fettsäureintermediaten vermittelt z.B. durch eine Apoptose-Induktion, eine mitochondriale Dysfunktion und eine vermehrte ROS-Produktion einen unter dem Begriff der „Lipotoxizität“ zusammengefassten adversen Effekt (Wende & Abel, 2010^[187]).

Obwohl andererseits die Oxidation von Glucose insgesamt nicht erhöht und eher in fortgeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz vermindert ist, ist die Glykolyse wahrscheinlich aus Kompensationsgründen im Allgemeinen erhöht (Nickel et al., 2013^[130]) und kann bei der Herzinsuffizienz typischen vermehrten Glucoseaufnahme durch den verstärkten Abbau zu Laktat eine intrazelluläre Azidose begünstigen (Bay et al., 2013^[12]). Die vermehrt anfallenden glykolytischen Intermediate werden zum Teil in andere Stoffwechselwege eingeschleust, können aber auch über eine β -N-Acetylglucosamin (GlcNAc) O-Glykosylierung zu posttranslationalen Modifikationen verschiedener Proteine führen, die die Prozesse der elektromechanischen Kopplung stören oder Apoptose induzieren (Nickel et al., 2013^[130]). Weiterhin scheint eine effiziente zelluläre Energiebereitstellung (die Ausbeute an Reduktionsäquivalenten) vermindert zu sein, da die Reaktionsschritte des Citratzyklus vermehrt unter Umgehung von Energie erzeugenden Reaktionen durch Anaplerose aufrechterhalten werden (Abel & Doenst, 2011^[1]; Nickel et al., 2013^[130]).

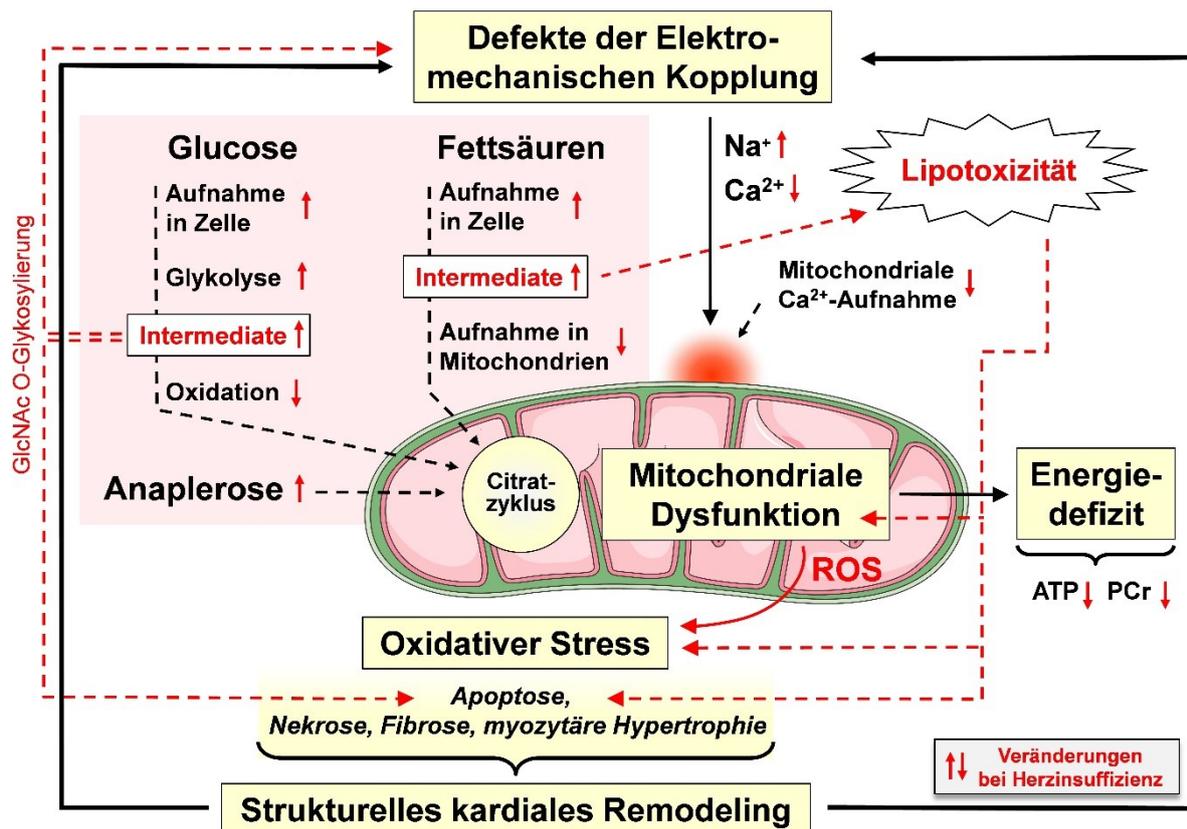


Abbildung 4: Metabolische Veränderungen und deren Auswirkungen bei Herzinsuffizienz

Innerhalb der Herzmuskelzelle kommt es im Zuge einer Herzinsuffizienz zu einer unvorteilhaften Umstellung herkömmlicher Stoffwechselwege, die die zelluläre Pathophysiologie aggravierend beeinflussen. Abkürzungen: ATP, Adenosintriphosphat; Ca^{2+} , ionisiertes Calcium; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Na^+ , ionisiertes Natrium; PCr, Phosphokreatin; (Abbildung modifiziert nach Nickel et al., 2013^[130]).

Vermehrter oxidativer Stress in Form von ROS kann selbst die Prozesse der elektromechanischen Kopplung negativ beeinflussen, zu Arrhythmien führen und durch eine Induktion Hypertrophie fördernder Signalwege zum kardialen Remodeling beitragen (Nickel et al., 2013^[130]). Des Weiteren kann z.B. das IMM-spezifische Phospholipid Cardiolipin, das eine zentrale Rolle in der strukturellen Formation der Cristae und Organisation der Atmungskette spielt (Szeto, 2014^[166]), aufgrund seiner vielen ungesättigten Fettsäuren leicht durch ROS beschädigt werden (Abel & Doenst, 2011^[1]) und folglich gravierende Veränderungen in der Funktion der Atmungskomplexe induzieren (Szeto, 2014^[166]). Darüber hinaus können ROS neben der direkten Inaktivierung von einigen redox-sensiblen Enzymen des Citratzyklus (z.B. Aconitase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, Succinat-Dehydrogenase/ siehe 2.6) (Nickel et al., 2013^[130]) beispielsweise auch eine Isoform der CaMKII durch eine direkte Methionin-Oxidation aktivieren und dadurch indirekt eine Vielzahl von Ionen-homöostatischen Funktionen beeinflussen (Viatchenko-Karpinski et al., 2014^[177]). Hierbei kann eine CaMKII-abhängige

Phosphorylierung von $\text{Nav}1.5$ -Kanälen zu einem vermehrten späten Na^+ -Einstrom (late I_{Na}) führen (Despa & Bers, 2013^[41]) und damit verbunden eine Verlängerung des Aktionspotenzials sowie eine frühe Nachdepolarisation auslösen (Wagner et al., 2013^[181]). Auf der anderen Seite kann eine CaMKII-vermittelte Phosphorylierung von RyR2 das Auftreten von Ca^{2+} -Lecks des SR begünstigen (Viatchenko-Karpinski et al., 2014^[177]) und letztendlich so arrhythmogene späte Nachdepolarisationen fördern (Bers, 2008^[16]). Alles in allem sind Veränderungen des Na^+ - und Ca^{2+} -Handlings mit einer elektrischen Instabilität assoziiert und können z.B. durch CaMKII-abhängige Modulationen in lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien enden (Wagner et al., 2013^[181]). So wird letztendlich in der Herzinsuffizienz durch erhöhten oxidativen Stress, CaMKII-Aktivierung und daraus resultierende erhöhte Na^+ -Konzentration ein Teufelskreis etabliert, der eine weitere ROS-Produktion begünstigt und die kontraktile Dysfunktion verschlimmert (Nickel et al., 2013^[130]). Abbildung 5 veranschaulicht in diesem Kontext die zugrunde liegende Pathophysiologie bei Herzinsuffizienz.

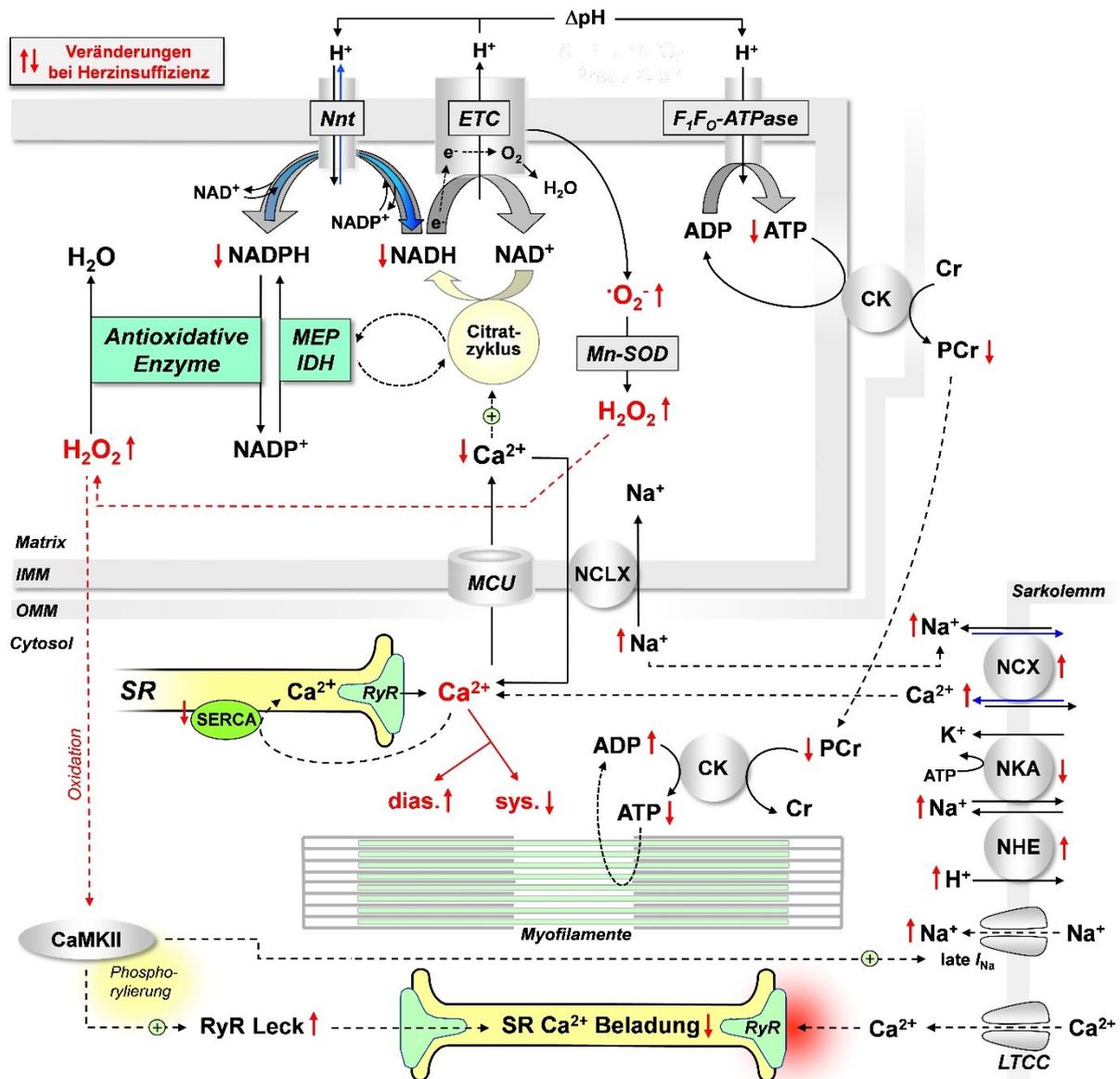


Abbildung 5: Die grundlegende zelluläre Pathophysiologie bei Herzinsuffizienz

Störungen des zellulären Ca^{2+} -Haushalts, eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration, ein energetisches Defizit und vermehrter oxidativer Stress sind wesentliche Charakteristika der Herzinsuffizienz, die mit verschiedensten kardiomyozytären Strukturen interagieren. Über den (engl.) reverse-mode (blaue Pfeile) des NCX kann teilweise die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums in der Systole kompensiert werden. Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; Ca^{2+} , ionisiertes Calcium; CaMKII, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase; CK, Kreatinkinase; Cr, Kreatin; dias., diastolisch; e⁻, Elektron; ETC, Elektronentransportkette; H⁺, Proton; H₂O, Wasser; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; IDH, Isocitratdehydrogenase; IMM, innere mitochondriale Membran; I_{Na} , Na^+ -Einstrom; K⁺, ionisiertes Kalium; LTCC, L-Typ- Ca^{2+} -Kanal; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; MEP, NADP^+ -abhängiges Malatenzym; Mn, Mangan; Na^+ , ionisiertes Natrium; NAD(P)H/NAD(P)^+ , reduziertes/oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid(phosphat); NCLX, mitochondrialer $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; NHE, sarkolemmaler Na^+/H^+ -Austauscher; NKA, Na^+/K^+ -ATPase; Nnt, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase; O₂, molekularer Sauerstoff; $\cdot\text{O}_2^-$, Superoxidradikal; OMM, (engl.) outer mitochondrial membrane; PCr, Phosphokreatin; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SERCA, sarkoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase; SOD, Superoxiddismutase; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; sys., systolisch; ΔpH , Protonengradient; (Abbildung modifiziert nach Nickel et al., 2014^[131]).

2.8 Das mCAT-Mausmodell

In der Arbeitsgruppe von Peter Rabinovitch (University of Washington in Seattle, USA) wurden genetisch veränderte Mäuse entwickelt, die das Genprodukt des humanen Katalase/*CAT*-Gens spezifisch in den Mitochondrien exprimieren (mCAT), um den Einfluss einer gesteigerten H_2O_2 -Elimination auf die Lebensspanne von Säugetieren zu überprüfen (Schriner et al., 2005^[156]). Während bei den auf einem C57BL/6N-Hintergrund (funktionstüchtige Nnt) basierenden mCAT-Mäusen die Expression des *CAT*-Gens durch den CAG-Promotor (engl. CMV enhancer/chicken β -actin promoter) gesteuert wird, unterliegt der ins Mitochondrium vermittelte Transport des Proteinprodukts einer artifiziell zugefügten und modulierten Signalsequenz der Ornithin-Transcarbamylase (The Jackson Laboratory, 2019^[169]). In einer Überlebenszeitstudie zeigten die mCAT-Mäuse im Vergleich zu zwei weiteren humane Katalase überexprimierenden Mauslinien, die spezifisch das Genprodukt im Nukleus (nCAT) oder in den Peroxisomen (pCAT) anreichern, einen deutlichen geschlechterneutralen Überlebensvorteil, der sich in einer Erhöhung der mittleren Lebensspanne um 17% in der Abstammungslinie 4403 und um 21% in der Abstammungslinie 4033 widerspiegelte (Schriner et al., 2005^[156]). Alles in allem können die mCAT-Daten der Überlebenszeitstudie inklusive der ebenfalls beobachteten Erhöhung der maximalen Lebensdauer als ein verzögerter Beginn des Alterns interpretiert werden, unterstützen demzufolge die (engl.) „Free Radical Theory of Aging“ (Harman, 1956^[65]) von Denham Harman und unterstreichen die zentrale Rolle der Mitochondrien als Radikal-Quelle (Schriner et al., 2005^[156]).

Das hauptsächlich in den Peroxisomen vorkommende hämhaltige tetramere Protein Katalase (Schriner & Linford, 2006^[157]) katalysiert den enzymatischen Abbau von H_2O_2 zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) gemäß der Reaktion $2\text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Hasilik, 2007^[66], S. 205) und besitzt darüber hinaus im Vergleich zu anderen Enzymen eine extrem hohe Wechselzahl (engl. turnover number) (Heck et al., 2010^[67]). Die Katalase wurde im Gegensatz zur üblichen Lokalisation, den Peroxisomen (Li et al., 2009^[95]), aber auch schon in Herz- (Nohl & Hegner, 1978^[133]; Radi et al., 1991^[146]) und Lebermitochondrien (Salvi et al., 2007^[152]) von Ratten detektiert. Endogen sind die höchsten Aktivitätslevel der Katalase in Leber, Niere und roten Blutkörperchen anzutreffen, während Gehirn, Skelettmuskel und Herz eher geringe Umsetzungsraten aufweisen (Schriner & Linford, 2006^[157]).

Die auch in dieser Arbeit verwendeten mCAT-Mäuse der Abstammungslinie 4033 besitzen eine gesteigerte Aktivität der humanen Katalase im Gehirn, Skelett- und Herzmuskel und weisen im Speziellen in kardialen Mitochondrien eine ca. 50-fach erhöhte Enzymaktivität gegenüber dem Wildtyp (WT) auf (Schriner et al., 2005^[156]; The Jackson Laboratory, 2019^[169]). Phänotypisch bestehen im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern keine Unterschiede in der Nahrungsaufnahme (Dai et al., 2009^[34]), im Körpergewicht (Dai et al., 2009^[34]) und in der Körpergröße (Schriner & Linford, 2006^[157]). Allerdings wird die mitochondriale humane Katalase (mCAT) in dem von Rabinovitch et al. stammenden Mausmodell in Form eines Mosaiks exprimiert, in dem 10-50% der kardialen Zellen der mCAT-Maus detektierbare Spiegel des Enzyms aufweisen (Schriner et al., 2005^[156]). Dieses Expressionsmuster unterliegt möglicherweise einer in der frühen Entwicklung ablaufenden negativen Selektion von Zellen mit hohen Katalasespiegeln und könnte als Folge einer Verarmung von mitogenen ROS-Signalen entstehen (Schriner et al., 2005^[156]).

Dennoch zeigt dieses mCAT-Modell protektive Eigenschaften in kardialen Alterungsprozessen (Dai et al., 2009^[34]; Schriner et al., 2005^[156]), Ischämie- und Reperfusionsexperimenten (Zaha et al., 2016^[194]) und verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen (Dai et al., 2011^[36]; Dai et al., 2012^[38]). So konnte z.B. mithilfe der Echokardiographie ein signifikant abgeschwächter und verzögerter kardialer Alterungsprozess in mCAT-Mäusen in Bezug auf den linksventrikulären Massenindex, den myokardialen Performance Index, eine linksatriale Dilatation und eine diastolische Dysfunktion im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Mäusen festgestellt werden (Dai et al., 2009^[34]). In histopathologischen Untersuchungen von Schriner et al. zeigten 20-25 Monate alte mCAT-Mäuse im Vergleich zum WT abgeschwächte kardiale Pathologien (subendokardiale interstitielle Fibrose, hyaline cytoplasmatische Veränderungen, Vakuolisierung des Cytoplasmas, Größenvariabilität der Myozyten, Hyperzellularität, Destruktion von Sarkomeren, Mineralisation, Arteriosklerose) (Schriner et al., 2005^[156]), die im Einklang mit den Beobachtungen einer verringerten ventrikulären Fibrose und einer verminderten Kardiomyozytenhypertrophie von Dai et al. stehen (Dai et al., 2009^[34]). Des Weiteren schützt die mCAT ultrastrukturell vor einer übermäßigen oxidativen Inaktivierung der im Mitochondrium lokalisierten Aconitase (Schriner et al., 2005^[156]), vor ROS-induzierten exzessiven Carbonylierungen mitochondrialer Proteine sowie vor Punktmutationen und Deletionen der mitochondrialen DNA (Dai et al., 2009^[34]). Darüber hinaus scheinen die mCAT-Mäuse im Alter intrazelluläre Ca²⁺-Transienten sowie das Expressionsmuster

der SERCA besser erhalten zu können und weisen eine nicht so stark ausgeprägte mit kardialen Altern oder einer Herzinsuffizienz vergesellschafteten Hochregulation des NCX auf (Dai et al., 2009^[34]). Die kardioprotektiven Effekte der mCAT-Maus zeigen sich auch in einer verminderten Aktivität des mit einer pathologischen Herzhypertrophie assoziierten Calcineurin-NFAT-Signalwegs (engl. calcineurin-nuclear factor of activated T-cell pathway) und damit verbunden in einer verringerten Transkription (mRNA-Spiegel) der entsprechenden fetalen Zielgene (z.B. BNP und Atriales natriuretisches Peptid/ANP) (Dai et al., 2009^[34]).

Sowohl in einem Angiotensin II-vermittelten als auch in einem Gαq-induzierten Herzinsuffizienzmodell, in dem Gαq als Untereinheit von Katecholamin- und Angiotensin II-Rezeptoren überexprimiert wird, konnte die mCAT die durch den Stimulus ausgelöste Herzinsuffizienz verbessern, kardiales Remodeling abmildern sowie im Speziellen beispielsweise die mitochondriale DNA vor oxidativen Schäden schützen und in einem gewissen Ausmaß die respiratorische Kapazität der Mitochondrien erhalten (Dai et al., 2011^[36]). In einem Druck induzierten Herzinsuffizienzmodell, in dem durch eine transversale Ligatur der Aorta (engl. transverse aortic constriction) die Nachlast gesteigert wurde, konnte bei mCAT-Mäusen in der Echokardiographie eine ähnliche Abmilderung der Herzinsuffizienz-Symptomatik beobachtet und darüber hinaus ein im Vergleich zu den Kontrolltieren abgeschwächtes Remodeling des mitochondrialen Proteoms festgestellt werden (Dai et al., 2012^[38]). Während in diesem Modell in den WT-Mäusen eher eine Herabregulation der Enzyme der β-Oxidation und eine Hochregulation der glykolytischen Stoffwechselwege beobachtet wurden, war dieser Remodeling-Prozess des Proteoms in den mCAT-Mäusen nicht so ausgeprägt (Dai et al., 2012^[38]). Des Weiteren konnte die mCAT in einer durch eine defekte mitochondriale Polymerase Gamma ausgelösten Kardiomyopathie partiell vor der Akkumulation von mitochondrialen DNA-Schäden schützen und somit den durch die homozygot fehlerhafte Korrekturlesefunktion bedingten Phänotyp abmildern (Dai et al., 2010^[35]). In einer Ischämie- und Reperfusionstudie mit transgenen Mäusen, die eine defekte AMP-aktivierte Kinase besitzen, die normalerweise als Antwort auf zellulären Stress den ATP-Konsum einschränkt und die ATP-Produktion steigert, konnte die mCAT die exzessive Aktivierung des mit Nekrose und Apoptose assoziierten c-Jun-N-terminale Kinase-Signalwegs verhindern sowie das Auftreten von myokardialer Nekrosen in der Reperusionsphase abmildern (Zaha et al., 2016^[194]). Ferner konnten mithilfe der mCAT eine links-

ventrikuläre Dysfunktion und oxidativer Stress im Rahmen einer durch das antiretrovirale Nukleosidanalogen Zidovudin ausgelösten Kardiomyopathie reduziert werden (Kohler et al., 2009^[81]). In einem etwas anderen Mausmodell, in welchem neugeborene Mäuse mit einem viralen Vektor infiziert wurden, der eine mitochondriale Expression der Katalase hervorrief, konnte die körperliche Leistung durch eine erhöhte mitochondriale antioxidative Kapazität auf dem Laufband gesteigert werden (Li et al., 2009^[95]).

Im Gegensatz zur Theorie der „antagonistischen Pleiotropie“ (Williams, 1957^[188]), die den Alterungsprozess auf pleiotrop wirkende Gene zurückführt, die in frühen Lebensabschnitten vorteilhafte und im späteren Leben eher nachteilige Effekte vermitteln (Ljubuncic & Reznick, 2009^[98]; Williams, 1957^[188]), konnte in jungen (4 Monate) mCAT-Mäusen von Basisty et al. eine „inverse antagonistische Pleiotropie“ im Rahmen eines global veränderten Proteoms beobachtet werden (Basisty et al., 2016^[111]). So zeigten sich unter physiologischen Bedingungen erste Hinweise, dass die genetische Expression der mCAT in jungen Jahren bei relativ geringem oxidativen Stress nicht unbedingt vorteilhaft sein muss, denn das globale kardiale und hepatische Proteom der 4 Monate alten transgenen Tiere schien eher mit dem Proteom älterer (20 Monate) WT-Mäuse vergleichbar zu sein, während im Alter (20 Monate) das Proteom der mCAT-Maus vielmehr dem Proteom 4 Monate alter WT-Mäuse glich (Basisty et al., 2016^[111]). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass mitochondriale Antioxidantien nicht im Allgemeinen vorteilhaft sein müssen, dass ihre vorteilhaften Effekte besonders bei hohem oxidativen Stress vermittelt werden und dass mitochondriale Antioxidantien wahrscheinlich ein altersabhängiges therapeutisches Fenster besitzen (Basisty et al., 2016^[111]). Darüber hinaus sorgte z.B. nur eine moderate mCAT-Expression in Mitofusin 2 defizienten Mäusen für eine Normalisierung der mitochondrialen ROS-Produktion sowie einen Schutz vor mitochondrialer Depolarisation, vor Störungen der mitochondrialen Atmung und struktureller kardialer Degeneration, während eine hohe Expression der mCAT dies nicht verhindern konnte (Song et al., 2014^[162]).

2.9 Fragestellung der Arbeit

Im Herzen kontrollieren redox-abhängige Signalkaskaden neben etlichen physiologischen Prozessen auch pathophysiologische Signalwege und homöostatische Stressreaktionen (Burgoyne et al., 2012^[24]). Wir spekulieren, dass insbesondere das membranpermeable H_2O_2 (Feissner et al., 2009^[52]) eine essentielle Rolle in der intrazellulären Kommunikation und Interaktion zwischen den hochspezialisierten Funktionen der Mitochondrien und der sarkomerischen Myofilamente spielt. In diesem Zusammenhang lauten zwei der konkreten Fragestellungen: erstens, inwieweit H_2O_2 die Prozesse der elektromechanischen Kopplung und der mitochondrialen Energetik unter physiologischen Bedingungen beeinflusst und zweitens, in welchem Ausmaß eine erhöhte mitochondriale H_2O_2 -Elimination (mCAT) eine Veränderung der zellulären Energetik und damit verbunden der zellulären ROS-Produktion bedingt. Im Speziellen stellt sich die Frage, ob sich eine pharmakologische Ca^{2+} -Sensibilisierung mit dem Ca^{2+} -Sensitizer EMD 57033 wie bei der hypertrophen Kardiomyopathie negativ auf die Energiehomöostase auswirkt und dementsprechend eine mitochondriale H_2O_2 -Generation triggert.

Diese molekularmechanistischen Fragen sollen auch im Hinblick auf die klinische Anwendung von Ca^{2+} -Sensitizern im Rahmen einer Herzinsuffizienztherapie anhand von jungen, adulten mCAT-Mäusen geklärt werden. Hierbei soll hauptsächlich das Augenmerk auf dem Vergleich zwischen physiologischen und pathophysiologischen zellulären Bedingungen liegen. Für diese Gegenüberstellung spielt neben isoliert betrachteten mCAT-Mitochondrien (mitochondriale Atmung, ROS-Produktion) vor allem ihre Funktion im gesamtzellulären Kontext (besonders ihr Redoxstatus) unter physiologischer und pathophysiologischer Arbeitslast eine essentielle Rolle.

3 Materialien

3.1 Allgemeine Laborutensilien

Material	Hersteller
Eppendorf Research® plus Pipetten 0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl	Eppendorf AG
Vortex-Genie 2 560E	Scientific Industries, Inc.
Vornado Miniature Vortex Mixer BV101-B myFuge Mini Centrifuge C1008-B	Benchmark Scientific Inc.
Feinwaage ABS 120-4	Kern und Sohn GmbH
Trockenschrank ED 53	BINDER GmbH
Safe 2020 1.2 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II Orion Star A111 pH-Tischmessgerät	Thermo Fisher Scientific Inc.
pH Elektrode SenTix 22	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH
Schott DURAN® GL 45 Laborglasflaschen 250 ml, 500 ml, 1000 ml	DWK Life Sciences
PlastiBrand Messzylinder 500 ml, 1000 ml	Brand GmbH & Co. KG
Akku-betriebene Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Oregon Scientific Timer TR118	Oregon Scientific

3.1.1 Materialien zur Genotypisierung

Material	Hersteller
Thermocycler peqSTAR 96X Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH
Primerpaar OTC/CAT und CAT1	Microsynth AG
Primerpaar IL-2 F und IL-2 R	
Gelelektrophorese Set-up	BioRad Laboratories, Inc.

3.1.2 Verwendete chemische Substanzen

Substanz	MG	Hersteller
KOH 1M	56.11	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
HCL 1M	36.46	
NaOH 1M	40	
Tris HCL 1M	157.6	
Tris base 1M	121.14	
Natriumpyruvat	110.04	
Kaliumglutamat	203.23	
Natriummalat	156.1	
CaCl ₂ 1M	110.98	
2,4-Dinitrophenol	184.11	
Antimycin A from Streptomyces sp.		
Adenosine 5'-diphosphate monopotassium salt dehydrate/ADP	501.32	
Wasserstoffperoxid 30%		

3.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Zellkulturschalen Ø 60 x 15 mm, Ø 10 x 20 mm Greiner Centrifuge Tubes 15 ml, 50 ml CELLSTAR® Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Eppendorf Tubes 5 ml	Eppendorf AG
SafeSeal ReagiergefäÙe 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt Ag & Co. KG
Pasteur-Plast Pipetten 3 ml Makro	Ratiolab GmbH
Wägeschalen aus Polystyrol 7 ml, 100 ml	A. Hartenstein GmbH
Discofix® C-3 Dreiwegehahn Exadrop® Präzisions-Tropfenregler Original-Perfusor®-Spritze 50 ml vollentsalzt und destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG
Ethanol 99,5% vergällt mit 1% MEK	VWR International GmbH
Isotonische Kochsalz-/Infusionslösung 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Octeniderm® farblos	Schülke & Mayr GmbH

3.2 Mitochondriale Experimente

3.2.1 Angesetzte Lösungen und Puffer

Isolutionslösung (IS):

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
Saccharose	342.29	75 mM	Merck KGaA
Mannitol	182.17	225 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
HEPES	238.3	2 mM	
EGTA	380.35	1 mM	

Die Chemikalien wurden in vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Tris base/Tris HCL auf 7,4 eingestellt.

BSA/Proteinase-Lösung:

Substanz	Konzentration	Hersteller
Bovines Serum Albumin	4 mg/ml	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
Bacterial Proteinase 7.0 - 14.0 U/mg	0,16 mg/ml	

Die Chemikalien wurden in die Isolutionslösung aufgenommen.

Mitochondrien-Suspension-Lösung (MSS):

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
Saccharose	342.29	75 mM	Merck KGaA
Mannitol	182.17	225 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
HEPES	238.3	2 mM	

Die Chemikalien wurden in vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Tris base/Tris HCL auf 7,4 eingestellt.

Atmungspuffer (AP):

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
KH ₂ PO ₄	136.1	2 mM	Merck KGaA
MgCl ₂ *6H ₂ O	203.3	2,5 mM	
KCl	74.55	137 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
HEPES	238.3	20 mM	
EGTA	380.35	0,5 mM	

Die Chemikalien wurden in vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit KOH auf 7,2 eingestellt.

PTP-Puffer:

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
KH ₂ PO ₄	136.1	5 mM	Merck KGaA
Saccharose	342.29	25 mM	
KCl	74.55	120 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
HEPES	238.3	20 mM	
Mannitol	182.17	70 mM	

Die Chemikalien wurden in vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Tris base/Tris HCL auf 7,5 eingestellt.

3.2.2 Materialien zur Isolation von Mitochondrien

Substanz/Instrumentarium	Hersteller
Ketaset® 100 mg/ml	Zoetis Inc.
Rompun® 2%	Bayer HealthCare AG
Homogenisator (Glaszylinder), 15 ml	A. Hartenstein GmbH
Homogenisator-Kolben (PTFE-Kopf)	
Mikroskopierschere 233-2121	VWR International GmbH
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge, gekühlt	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.2.3 Materialien zur Proteinbestimmung

Substanz/Instrumentarium	Hersteller
DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter, Inc.
Halb-Mikro-Küvette 1,6 ml aus PMMA (Acryl)	Sarstedt AG & Co. KG
Protein Assay Reagent A #5000113 Protein Assay Reagent B #5000114	BioRad Laboratories, Inc.

3.2.4 Materialien zur Atmungsmessung

Substanz/Instrumentarium	MG	Hersteller
Oxygraph System mit DW1/AD-Sauerstoffelektrodenkammer sauerstoffpermeable Membran, PTFE 0.0125 x 25 mm Magnetic follower, PTFE coated		Hansatech Instruments Ltd
Wärmebad Haake C10/B3		Föhr Medical Instruments GmbH
Hamilton Microliter Syringe #702, 25 µl		Hamilton Company
Natriumdithionit Na ₂ S ₂ O ₄	174.11	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
Oligomycin A	791.06	

3.2.5 Materialien zur Superoxidmessung

Substanz/Instrumentarium	MG	Hersteller
Bruker Spektrometer ESP300E		Bruker Corporation
Temperature & Gas Controller BIO-III - NOX-E.4-TGC		Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH
Critoseal NOX-A.3-VP		
CMH	237.8	
DETC	225.31	
DF	656.79	
Tempol	172.24	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
Glaskapillare ringcaps® 50µl		Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG

3.2.6 Materialien zur H₂O₂-Emissionsmessung und zum PTP-Assay

Substanz/Instrumentarium	MG	Hersteller
Infinite® M200 Pro Plate Reader		Tecan Group Ltd.
Falcon® 96-well Black/Clear Flat Bottom TC-treated Imaging Microplate with Lid		Corning B.V. Life Sciences
Calcium Green-5N (C3737)		Thermo Fisher Scientific
Amplex® UltraRed Reagent (A36006)		Inc./Invitrogen
Cyclosporin A	1202.6	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP (P8125)		Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
Superoxide Dismutase from bovine erythrocytes (S7571)		

3.3 Zelluläre Experimente

3.3.1 Materialien zur Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten

Substanz/Instrumentarium	Hersteller
Narkosesystem bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> • Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5 l/min mit 5% Isofluran) • Isoflurane Funnel-Fill Vaporizer • Anti-Spill Adapter, Isoflurane • Anesthesia Induction Box • Fluosorber • Fluovac Gas Evacuation System • Gas flow director • Bain Circuit Set • Rodent Mask for Bain Circuit Aortic Cannula Ø 1 mm Langendorff Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH
Sauerstoff	Taiyo Nippon Sanso Corporation/Praxair Deutschland GmbH
Lauda Ecoline 003/E100 Heating Circulator	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG
Rimadyl Injektionslösung, 1 ml enthält 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol	Pfizer Deutschland GmbH
Heparin-Natrium aus Schweinemukosa 5000 I.E./ml Aesculap Mikro-Knüpfpinzette FD281R	B. Braun Melsungen AG
Chirurgische Feinschere 14088-10, 91450-11 Gebogene Pinzette (Student Dumont #7 Forceps) 91197-00	Fine Science Tools GmbH
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson-Johnson International

Substanz/Instrumentarium	Hersteller
BD Plastipak Syringe 1 ml	Becton Dickinson GmbH
BD Microlance 3 26G ½"	
Binokulares Stereomikroskop SMZ645	Nikon Instruments Inc.
VWR® Biological microscope BI 100	VWR International GmbH
Heraeus Brutschrank BB16	Heraeus Instruments GmbH
FCS (fetales Kälberserum)	Thermo Fisher Scientific Inc./Gibco
Hepes-Pufferlösung 1M	
Medium 199, GlutaMAX	
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	
Trypsin from porcine pancreas 1,000 - 2,000 BAEE U/mg	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
Liberase TH	Roche Diagnostics GmbH

3.3.2 Verwendete Puffer- und Tyrodelösungen

Normaltyrode:

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
NaCl	58.44	130 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG
KCl	74.55	5 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
CaCl ₂	110.98	1 mM	
D-(+)-Glucose	180.16	10 mM	
Na-HEPES	260.29	10 mM	
MgCl ₂	95.22	1 mM	Merck KGaA

Die Chemikalien wurden in vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH/HCL auf 7,54 eingestellt.

Isolationstyrode:

Substanz	MG	Konzentration	Hersteller
NaCl	58.44	113 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG
KCl	74.55	4,7 mM	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	1,2 mM	
Phenolrot	354.38	0,032 mM	
NaHCO ₃	84.01	12 mM	
KHCO ₃	100.12	10 mM	
D-(+)-Glucose	180.16	5,5 mM	
2,3-Butanedione monoxime	110.1	10 mM	
Taurin	125.15	30 mM	
KH ₂ PO ₄	136.09	0,6 mM	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄	141.96	0,6 mM	
Hepes-Pufferlösung 1M		10 mM	Thermo Fisher Scientific Inc./Gibco

Die Chemikalien wurden in 250 ml vollentsalztem und destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH/HCL auf 7,46 eingestellt.

Puffer	Zusammensetzung
Liberaselösung (20ml)	20 ml Isolationstyrode 2 mg Liberase (0.08 mg/ml) 40 µl Trypsin (0.14mg/ml) 25,2 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)
Stopp-Puffer 1 (10ml)	9 ml Isolationstyrode 1 ml FCS 12,5 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)
Stopp-Puffer 2 (30ml)	28,5 ml Isolationstyrode 1,5 ml FCS 37,5 µl 10 mM CaCl ₂ (12,5 µM)

3.3.3 Instrumentarien der IonOptix-Systeme

Instrumentarium	Hersteller
FSI700 Fluorescence system interface IonWizard-Core and Analysis (IonWizard 6.4) MCS100 MyoCam-S Digital Variable filed rate CCD MUS200 μ Step stand-alone filter wheel and con- troller PMT400 Photomultiplier sub-system PTV100 PMT to Voltage Converter CFA300 Cell framing adapter CFA Option D: Dual Emission for CFA300 SARACQ SarcLen Sarcomere length Acquisition Module MyoPacer Field Stimulator	IonOptix LLC
Nikon Eclipse Ti-E/B und Ti-S/L100 (Epifluores- zenzmikroskope)	Nikon Instruments Inc.
Constant Current Stimulator DG2A	Digitimer Ltd
Lichtfilter und Strahlenteiler (siehe Abbildung 10)	Chroma Technology GmbH
Xenon Short Arc Lamp -75XE	Ushio Inc.
SC Automatic Heater Controller TC-324B SC Automatic Heater Controller TC-324C Stimulus Isolation Unit SIU-102 RC-27NE2 Narrow Bath Chamber with Field Stimulation PH-1 Platform SA-NIK-AL Stage Adapter	Warner Instruments LLC
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision GmbH & Co. KG

3.3.4 Materialien zur Durchführung der Experimente an der IonOptix-Anlage

Substanz/Instrumentarium	MG	Hersteller
Eglo 9228 Basic Tischleuchte E27		EGLO Leuchten GmbH
Korasilon-Paste niedrigviskos		Kurt Obermeier GmbH & Co. KG
Laminin from mouse Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma		Roche Diagnostics GmbH
Deckgläser 24 x 50 mm		VWR International GmbH
A0699,0250 Immersion Oil for microscopy		PanReac AppliChem ITW Reagents
Pluronic® F-127 CM-H ₂ DCFDA (C6827)		Thermo Fisher Scientific Inc./Invitrogen
Natriumcyanid NaCN	49.01	Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation
DMSO (CH ₃) ₂ SO	78.13	
FCCP	254.17	
Isoprenaline hydrochloride	247.72	
EMD 57033	425.51	Merck KGaA/Merck Serono Research

4 Methodik

4.1 Tiermodell

Alle mCAT Versuchsmäuse entstammen der eigenen Zucht, die durch Spermienbereitstellung von der Arbeitsgruppe von Peter Rabinovitch (University of Washington in Seattle, USA) etabliert werden konnte. Weibliche C57BL/6N Mäuse (Charles River Laboratories Inc.) wurden hierzu künstlich befruchtet und die Nachkommen als F0 Generation in der Software PyRAT Animal Facility Software (Scionics Computer Innovation GmbH) registriert. Zur Aufrechterhaltung der Zucht wurden und werden die männlichen Nachkommen jeweils mit neuen C57BL/6N Mäusen verpaart. Damit handelt es sich bei allen transgenen (TG) Tieren um heterozygote mCAT-Mäuse (The Jackson Laboratory, 2019^[169]). Als murine Kontrollen (WT) galten jeweils die Wurfgeschwister ohne das mCAT-Genprodukt. Während alle Versuchstiere (ausschließlich F1 und F2 Generation) zum Zeitpunkt der Isolation kardiomyozytärer Zellen und Mitochondrien acht - 33 Wochen alt waren, unterschied sich das Alter der Mäuse innerhalb jeder einzelnen Messreihe nur um einige wenige Wochen.

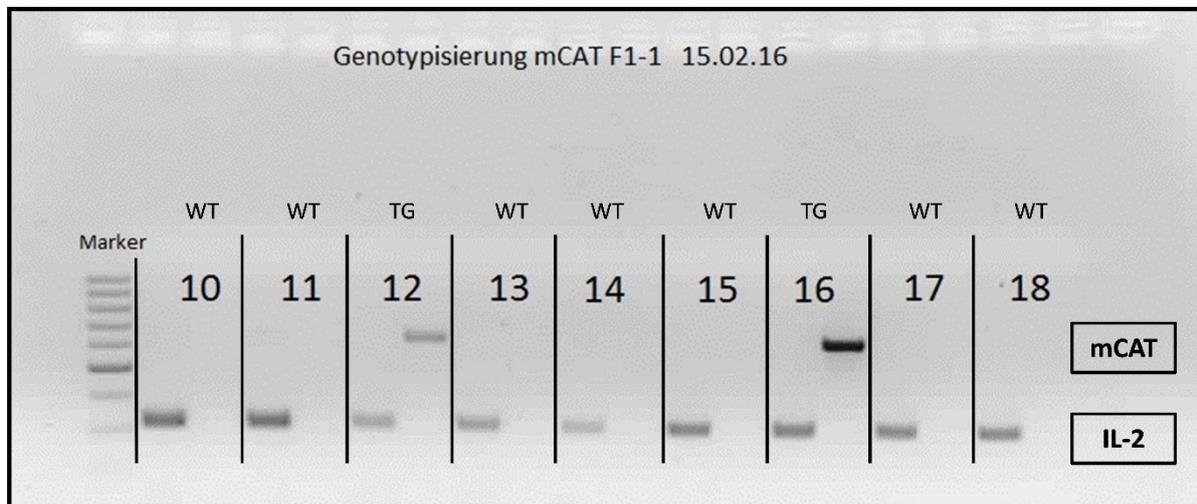


Abbildung 6: Gelelektrophorese zur Genotypisierung der Versuchstiere

Die Zahlen repräsentieren die jeweilige Identifikationsnummer der Versuchsmäuse in der PyRAT-Software. Zur Genotypisierung wurden bei jeder Maus zwei Felder mit dem jeweiligen PCR-Produkt belegt. Hierbei dient das *Interleukin 2*-Gen als Positivkontrolle. Abkürzungen: F1, erste Nachfolgeneration; IL-2, Interleukin 2; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; TG, transgen; WT, Wildtyp.

Die Genotypisierung wurde mithilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) und einer anschließenden Gelelektrophorese vor den eigentlichen Versuchstagen durchgeführt. Als Primer für die transgene DNA-Sequenz werden nach John Morton (University of

Washington in Seattle, USA) die Primer OTC/CAT und CAT1 mit einem DNA-Produkt von 645 Basenpaaren (bp) gewählt (Rabinovitch Laboratory [University of Washington], 2019^[145]). Als Positivkontrolle gilt das Primerpaar IL-2 F und IL-2 R für das *Interleukin 2*-Gen mit einer Produktmenge von 350 bp.

4.2 Isolation von Mitochondrien aus Mäuseherzen

Die Isolation von Mitochondrien aus den Mäuseherzen wurde nach der Methode von Mela und Seitz (Mela L & Seitz S, 1979^[120]) durchgeführt. Dazu sollen alle an der Entnahme des Herzes beteiligten Materialien auf Eis vorgekühlt werden und alle anschließenden Schritte auf Eis vollzogen werden, um die Qualität der Isolation zu erhöhen. Alle Zentrifugalschritte sollen ebenfalls gekühlt bei 4 °C durchgeführt werden. Jede Versuchsm Maus wurde durch eine intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Ketaset® (Ketaminhydrochlorid 1000 mg/kg) und Rompun® (Xylazinhydrochlorid 100 mg/kg) getötet und im direkten Anschluss das Herz der Thoraxhöhle entnommen. In einer mit Isolationslösung (IS) befüllten Zellkulturschale wurde das Herz entsprechend freipräpariert, die Ventrikel durch Einschneiden und Schwenken von Blut befreit und vom restlichen Organ abgesetzt. Danach wurden die isolierten Ventrikel in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl BSA/Proteinase-Lösung überführt und mit einer spitzen, geraden Mikroskopierschere klein geschnitten. Um den Zellaufschluss zu ermöglichen, wurden anschließend in einem Potter-Elvehjem-Gewebehomogenisator die Herzstückchen 7 Minuten (min) homogenisiert. Danach wurden weitere 500 µl der BSA/Proteinase-Lösung in das Glasgefäß gegeben und weitere 7 min homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde die gesamte Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß mithilfe einer Pipette überführt und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der aus dem Zellinhalt (Cytosol und Organellen) der aufgeschlossenen Zellen bestehende Überstand wurde nach abgelaufener Zeit in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit dem Label „Mitochondrien“ überführt und das entstandene Pellet verworfen. Bei 7700 g wurde nun das Reaktionsgefäß „Mitochondrien“ 10 min zentrifugiert, danach der Überstand in ein drittes 2 ml Reaktionsgefäß mit der Beschriftung „Cytosol“ überführt und auf Eis gelagert. Das entstandene Pellet, welches die mitochondriale Fraktion enthielt, wurde mit 400 µl Mitochondrien-Suspension-Lösung (MSS) resuspendiert und das Reaktionsgefäß anschließend mit 1 ml MSS aufgefüllt. Darauf folgend wurde bei 7700 g 5 min zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Der zuvor beschriebene Reinigungsschritt wurde wiederholt. Nach

insgesamt zweimaliger 5-minütiger Zentrifugation bei 7700 g wurde das gereinigte Pellet in Abhängigkeit seiner Größe in entweder 100 µl oder 200 µl MSS resuspendiert.

4.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde anhand einer photometrischen Extinktionsmessung nach Lowry et al. (Lowry et al., 1951^[104]) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl der mit MSS zuvor resuspendierten Mitochondrienlösung mit 18 µl vollentsalztem und destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurden zuerst 100 µl Protein Assay Reagent A zur Bildung eines blauvioletten Komplexes und anschließend 800 µl Protein Assay Reagent B zur Bildung von Molybdänblau in das 2 ml Reaktionsgefäß hinzugefügt (Lowry et al., 1951^[104]). Nach mehrmaliger Durchmischung mit einem Vortex-Mischer wurde die Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde bei 750 nm Wellenlänge die Extinktion der Probe gegen einen Leerwert gemessen. Anhand einer Kalibrierungskurve, die vorab aus verschiedenen Konzentrationen von Bovinem Serum Albumin (BSA) bestimmt wurde, konnte die Proteinkonzentration der isolierten Mitochondrien berechnet werden. Die finale Proteinkonzentration aller Proben basierte auf dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Das verwendete Pipettierschema zeigt Tabelle 1.

Reagenz	Messung	Leerwert
Probe	2 µl	---
Wasser	18 µl	20 µl
Reagenz A	100 µl	100 µl
Reagenz B	800 µl	800 µl

Tabelle 1: Reagenzien und Pipettierschema zur Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde anhand einer photometrischen Extinktionsmessung nach Lowry et al. bestimmt. Abkürzungen: µl, Mikroliter.

4.2.2 Atmungsmessung an Mitochondrien

Die mitochondriale Atmung wurde an einer Clark-Elektrode (Oxygraph System, Hansatech Instruments Ltd) gemessen und mit der dazugehörigen Software, Oxygraph Plus (Oxygraph Version 1.02), aufgezeichnet. Dabei laufen innerhalb einer Clark-Zelle, deren Elektroden über eine innere Elektrolytlösung elektrisch verbunden sind, (Hansatech Instruments Ltd, 2019^[63]; Koudelka, 1986^[88]), bei polarisierten Elektroden an der Anode die Oxidation von Silber ($4\text{Ag} \rightarrow 4\text{Ag}^+ + 4\text{e}^-$) und an der Kathode die Reduktion von Sauerstoff ($\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$) ab (Warner Instruments LLC, 2019^[182]). Im amperometrischen Modus kann so der aktuelle Sauerstoffverbrauch einer Versuchsprobe über die Proportionalität der Sauerstoffkonzentration zum bestehenden Elektronenfluss gemessen werden (Koudelka, 1986^[88]). Beide Elektroden sind von einer sauerstoffpermeablen Membran bedeckt und haben über diese Kontakt zu der auf 37 °C temperierten Messkammer (Hansatech Instruments Ltd, 2019^[63]). Ein Magnetrührer sorgt in der Messkammer für den Ausgleich des durch den an der Kathode ablaufenden Sauerstoffverbrauch entstehenden Konzentrationsgradienten, der O_2 in Richtung Kathode diffundieren lässt (Warner Instruments LLC, 2019^[182]).

Nach Kalibration mithilfe von Natriumdithionit sowie einem Mediumwechsel wurden 400 µg ventrikuläre Mitochondrien in die 2 ml große Messkammer pipettiert und diese anschließend mit Atmungspuffer (AP) auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Als Substrat für die Mitochondrien wurden Pyruvat und Malat in einer finalen Konzentration von jeweils 5 mM gewählt. Bei einem stabilen Signal wurde das Substrat mittels einer Hamilton-Spritze hinzugegeben und somit die sogenannte State 2 Atmung (Mitochondrien und exogenes Substrat) (Lanza & Nair, 2009^[93]) über 3 min etabliert. Darauf folgend wurden unterschiedliche ADP-Endkonzentrationen (30, 100, 300 µM, 1 mM) in einem zeitlichen Abstand von 1 min mithilfe der Hamilton-Spritze in die Messkammer gegeben, um die State 3 Atmung zu simulieren (Lanza & Nair, 2009^[93]). Am Ende der Atmungsmessung wurde der Inhibitor der F_1F_0 -ATPase Oligomycin in der Konzentration von 1,2 µM hinzugefügt und das Experiment nach 3 weiteren Minuten (State 4) beendet (Lanza & Nair, 2009^[93]). Bei einem Großteil der Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine mitochondriale Atmungsmessung der Versuchsreihe.

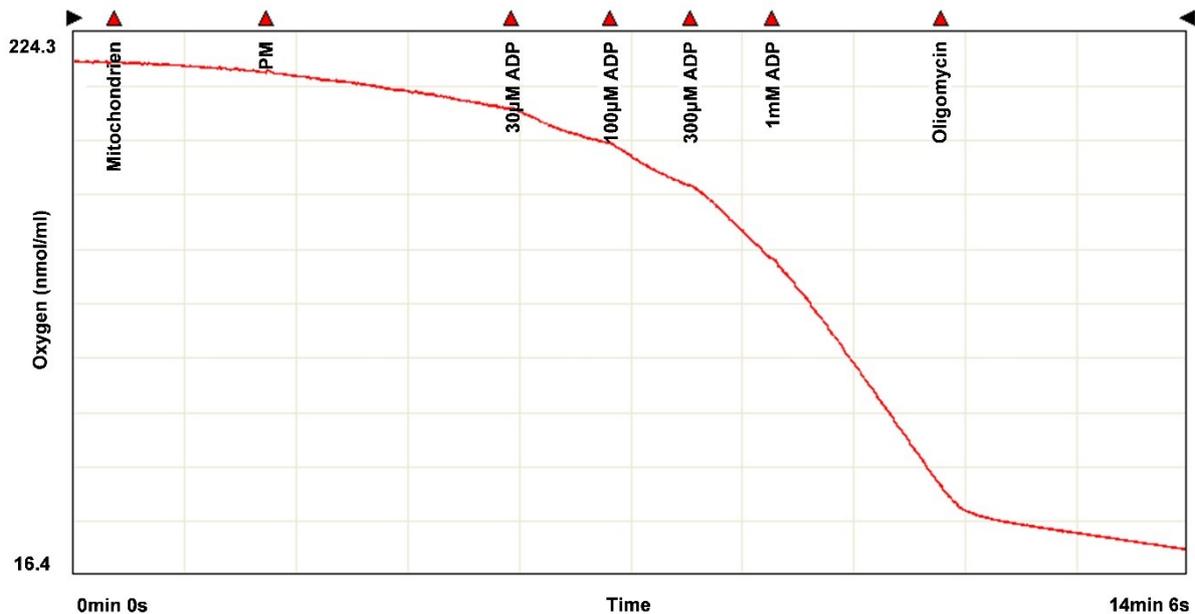


Abbildung 7: Mitochondriale Atmungsmessung an einer Clark-Elektrode

Sauerstoffverbrauch transgener mCAT-Mitochondrien (PyRAT-Maus-Identifikationsnummer: 21). Das Experiment wurde am 23.02.2016 mithilfe der Software Oxygraph Plus durchgeführt. Die roten Dreiecke stellen den Zeitpunkt der Hinzugabe der jeweiligen Versuchslösungen im Messprotokoll dar. Abkürzungen: μM , Mikromolar; ADP, Adenosindiphosphat; min, Minute; ml, Milliliter; mM, Millimolar; nmol, Nanomol; PM, Pyruvat/Malat; s, Sekunde.

4.2.3 Superoxid-Messung mit der Spinprobe CMH

An isolierten Mitochondrien wurden in einem starken äußeren Magnetfeld unter Ausnutzung der paramagnetischen Elektronenspinresonanz Spektroskopie (engl. electron paramagnetic resonance/EPR) Superoxidradikale ($\cdot\text{O}_2^-$) mit einem Bruker Spektrometer ESP300E (Bruker Corporation) gemessen. In diesen Experimenten wurden $300 \mu\text{M}$ cyclisches Hydroxylamin (CMH) von den mitochondrial produzierten Superoxiden in stabilere Nitroxid-Verbindungen umgewandelt, die dann zur Detektion benutzt wurden (Bruker BioSpin Corporation, 2019^[23]). Neben 400 nM Deferoxamin-Methansulfonat (DF) wurde zusätzlich $1 \mu\text{M}$ Diethyldithiocarbamat (DETC) eingesetzt. DETC inhibiert die endogene Superoxiddismutase (SOD) (Lijnen et al., 2008^[96]). Somit waren quantitative Rückschlüsse auf die Superoxidproduktion der Mitochondrien möglich. Die über 8 min erhobenen Intensitätsspektren wurden anhand einer Referenzprobe ($100 \mu\text{M}$ Tempol) und Integralrechnung mit einem speziell entwickelten Programm (g_Medeia) und Microsoft Excel 2016 analysiert. Bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde eine mit $50 \mu\text{l}$ gefüllte Glaskapillare in die vorgesehene Halterung der Messkammer gestellt, um insgesamt fünf unter-

schiedliche Bedingungen zu messen. Bei allen Versuchsansätzen wurden die Mitochondrien 3 min bei 37 °C mit Pyruvat/Malat (PM) vorinkubiert. Danach wurden in einer Glaskapillare jeweils 12 µg kardialer Mitochondrien bei stets 5 mM PM in den folgenden Versuchsansätzen gemessen:

- 1) 5 mM PM
- 2) 100 µM ADP
- 3) 1 mM ADP
- 4) 250 µM DNP
- 5) 15 µM Antimycin A

Dabei stellen die Substanzen 2,4-Dinitrophenol (DNP) einen mitochondrialen Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung (Chan et al., 2005^[27]) und Antimycin A (AMA) einen an das Q_i-Zentrum bindenden Inhibitor der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) der Elektronentransportkette (engl. electron transport chain/ETC) (Ma et al., 2011^[15]) dar.

4.2.4 H₂O₂-Emissionsmessung

Die mitochondriale H₂O₂-Produktion wurde mittels des H₂O₂-sensitiven Farbstoffs Amplex® UltraRed (A36006) und eines Infinite® M200 Pro Plate Readers (Tecan Group Ltd.) unter Benutzung der Software iTecan 1.7 detektiert. In einer Stöchiometrie von 1:1 reagiert das farblose Amplex® UltraRed mit H₂O₂ zu fluoreszentschem Resorufin (Thermo Fisher Scientific Inc., 2019^[170]). Diese Reaktion wurde in einem ca. zwei Stunden langen Assay (50 Messzyklen mit einer Zykluslänge von 120 Sekunden/s) durch das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase/HRP) mit einer Aktivität von 0,5 U/ml katalysiert (Thermo Fisher Scientific Inc., 2019^[171]). Hierbei wurde die H₂O₂-Produktionsrate pro mg Protein * min nach 26 min verwendet (laborinternes Verfahren). Durch zusätzliche Addition von Superoxiddismutase (SOD) mit einer Aktivität von 100 U/ml wurde die Umwandlung von Superoxidradikalen zu H₂O₂ sichergestellt (Balaban et al., 2005^[10]; Kohlhaas et al., 2017^[86]; Murphy, 2009^[128]; Nickel et al., 2013^[130]). Dadurch konnten alle anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies der isolierten Mitochondrien messbar gemacht werden. Bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von $\lambda_{exc} = 535 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ wurden in schwarzen/transparen-

96-Well-Platten insgesamt acht unterschiedliche Versuchsansätze in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Hierbei wurden stetig 30 µg Mitochondrien pro Well verwendet. Bei 37 °C wurden diese zum einen nativ (State 1) und zum anderen in Anwesenheit von 5 mM PM gemessen (PM; 30; 100; 300 µM ADP; 1 mM ADP; 250 µM DNP; 15 µM AMA). Alle Versuchsbedingungen wurden im Atmungspuffer ausgeführt und über eine Kalibrationskurve bekannter H₂O₂-Konzentrationen quantifiziert.

4.2.5 Permeabilitäts-Transitions-Pore-Assay

Ein nach Chen et al. (Chen et al., 2013^[28]) adaptierter PTP-Assay wurde ebenfalls mit dem Infinite® M200 Pro Plate Reader durchgeführt. Mithilfe der Software iTecan 1.7 konnten die Calciumretentionskapazität der zuvor isolierten Mitochondrien gemessen und in diesem Zusammenhang die Funktion der mitochondrialen PTP beurteilt werden. Der Injektor des Readers, der mit einer EGTA-freien Calcium/PTP-Pufferlösung befüllt wurde, gab während des ca. 28-minütigen Versuchsprotokolls zehn Calciumpulse in einer Endkonzentration von 10 µM in einem Abstand von jeweils 120 Sekunden ab. Die extramitochondrialen Calciumkonzentrationen wurden bei 37°C mit dem Farbstoff Calcium Green-5N (C3737) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2019^[173]) in einer finalen Konzentration von 1 µM alle 5 s gemessen.

Für die restlichen Schritte des Assays wurde ein PTP-Puffer mit 20 µM EGTA benutzt, um endogenes Calcium aus den Versuchslösungen zu chelatieren (Zaha et al., 2016^[194]). Zuerst wurden 412,5 µg Mitochondrien in insgesamt 437,5 µl Gesamtvolumen (Mitochondrienlösung und PTP-Puffer mit EGTA) aufgenommen. In jeden Reaktionsansatz wurden dazu 4,4 µl einer Substratlösung (0,5 M Glutamat/0,25 M Malat) gegeben. Für die jeweilige Bedingung wurde entweder für 10 min mit Wasserstoffperoxid (Endkonzentration von 100 µM oder 200 µM H₂O₂) oder für 5 min mit Cyclosporin A (CsA) in einer finalen Konzentration von 1 µM inkubiert. CsA stellt einen Inhibitor der PTP (Feissner et al., 2009^[52]; Zorov et al., 2014^[200]) und somit eine Positivkontrolle dar. Dabei wurden jeweils basale Kontrollen mit äquivalenten Volumina und Endkonzentrationen als Vergleichswerte gemessen. Nach Inkubation wurde der Farbstoff Calcium Green-5N in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die gesamten Lösungen durch Resuspendieren mehrmals durchmischt. Anschließend wurden für jeden Reaktionsan-

satz insgesamt zwei Wells einer Mikrotiterplatte mit 175 μl belegt und als Doppelbestimmung bei $\lambda_{\text{exc}} = 503 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ gemessen. Aus der Kinetik der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme (Fluoreszenzsignalen) konnte dann in Analogie zu einem exponentiellen radioaktiven Zerfall eine Zeitkonstante Tau (τ) berechnet werden. Diese ließ im Zusammenhang mit den Fluoreszenzverläufen eine Beurteilung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme und Calciumretentionskapazität (Erschöpfung mit Öffnung der PTP (Li et al., 2012^[94])) zu.

4.3 Isolation und Kultivierung von Mauskardiomyozyten

Kardiale Zellen konnten mithilfe des AfCS Procedure Protocol (O'Connell et al., 2003^[135]) und einer modifizierten Langendorff Perfusionsanlage aus Mäuseherzen kultiviert werden. Nach intraperitonealer Applikation des nichtsteroidalen Antirheumatikums Carprofen (Rimadyl® - 0,1 ml 1:15 verdünnt) und des Antikoagulans Heparin (0,5 ml 1:10 verdünnt) sowie 10-minütiger Wartezeit wurde die Maus durch eine Isofluran-Narkose (5 Vol.-% bei 0,5 l/min O_2) betäubt. Bei einsetzender Wirkung der Anästhesie wurde die bewusstlose Maus in Rückenlage an ihren Extremitäten fixiert. Die vorausgegangene Injektion von Heparin sollte die Blutgerinnung insbesondere bei Herz-Kreislauf-Stillstand hemmen (Jelkmann, 2010^[72], S. 497) und so die Herzkranzgefäße in den folgenden Operations- und Isolationsschritten vor übermäßiger Blutkoagulation schützen. Nach sensomotorischer Überprüfung der Narkosetiefe via Zwischenzehenreflex konnte das Abdomen nach Desinfektion mit einer feinen, spitzen chirurgischen Schere eröffnet und nach kranial präpariert werden. Dabei wurde ausgehend von der Peritonealhöhle der Thorax durch die Durchtrennung des Diaphragmas eröffnet und das Herz freigelegt. Nach Mobilisation und Anheben wurde das Herz nahe der dorsalen Thoraxwand an der Aorta abgesetzt und in eine mit Isolationstyrode befüllte Zellkulturschale überführt. In dieser wurde das Herz von anderen Geweben freipräpariert. Eine spezielle Kanüle, die für die antegrade Perfusion des Herzens an der Langendorff Anlage benötigt wurde, konnte nach Kanülierung der Aorta (distal der Koronarostien) an soeben dieser mit einem 5-0 Polyesterfaden befestigt werden. Das Explantat wurde danach an die in Abbildung 8 gezeigte Anlage angeschlossen und zunächst 4 min mit der auf 37 °C erwärmten Ca^{2+} -freien Isolationstyrode gespült (2 ml/min), um neben der Entfernung von Blutresten insbesondere die Ca^{2+} -vermittelten Zell-Zell-Kontakte (Cadherin- und Integrin-abhängigen Zellverbindungen) zu lösen

(Alberts et al., 2008^[3], S. 1135 und 1177). Anschließend wurde eine enzymatische Liberaselösung je nach Erfahrungswert vorheriger Isolationen und visueller Kontrolle (blasses, aufquellendes Organ) ca. 7 min perfundiert. Hiernach wurde das Herz kaudal der Vorhöfe von der Anlage abgesetzt und in eine neue mit Isolationstyrode gefüllte Zellkulturschale transferiert. Um die enzymatischen Verdauungsprozesse zeitnah abzustoppen, wurde das Herz zur Vergrößerung der Oberfläche durch vier Einschnitte aufgefächert und in eine andere mit 5 ml Isolationstyrode und 5 ml Stopp-Puffer 1 befüllte Zellkulturschale überführt. Danach wurde die Kunststoffschale vorsichtig und kontinuierlich in Form der Zahl Acht geschwenkt, um einzelne Kardiomyozyten aus dem Gewebe zu lösen. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Zellisolation und gegebenenfalls Nachverdau konnte das verbleibende Herz verworfen werden und die Lösung mit den Myozyten in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 5-10 min sedimentieren. Der Überstand wurde in ein zweites 15 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und 1 min bei 800 rpm zentrifugiert. Die in dem ersten und zweiten Zentrifugenröhrchen (nach Abpipettieren des Überstands) entstandenen Pellets wurden mit jeweils 5 ml des Stopp-Puffers 2 resuspendiert.

Nach Vereinigung beider Pelletlösungen in einer Zellkulturschale wurden den Zellen Ca^{2+} -Ionen mithilfe eines Calciumaufbaus wieder zugeführt. Unter kontinuierlichen Schwenkbewegungen (in Form der Zahl Acht) wurden alle 4 min Calciumlösungen in zunehmenden Mengen zu den Kardiomyozyten hinzugegeben, um sukzessiv die Ca^{2+} -Konzentration zu steigern:

- 1) 50 μl 10 mM CaCl_2
- 2) 50 μl 10 mM CaCl_2
- 3) 100 μl 10 mM CaCl_2
- 4) 30 μl 100 mM CaCl_2
- 5) 50 μl 100 mM CaCl_2

Nach Überführen der Lösung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde der Überstand nach ca. 10-minütiger Sedimentation wieder bei 800 rpm 1 min zentrifugiert. Das zuvor entstandene Sediment und das im Zentrifugationsschritt gebildete Pellet wurden in eine Zellkulturlösung (Medium 199 mit 5% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin Streptomycin (Pen/Strep) und 1% Hepes-Pufferlösung) gegeben. Die Primärkultur wurde im Brutschrank bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit verwahrt und

bei Bedarf in einzelne 2 ml Reaktionsgefäße für Inkubationen und Messungen unter sterilen Bedingungen abgefüllt.

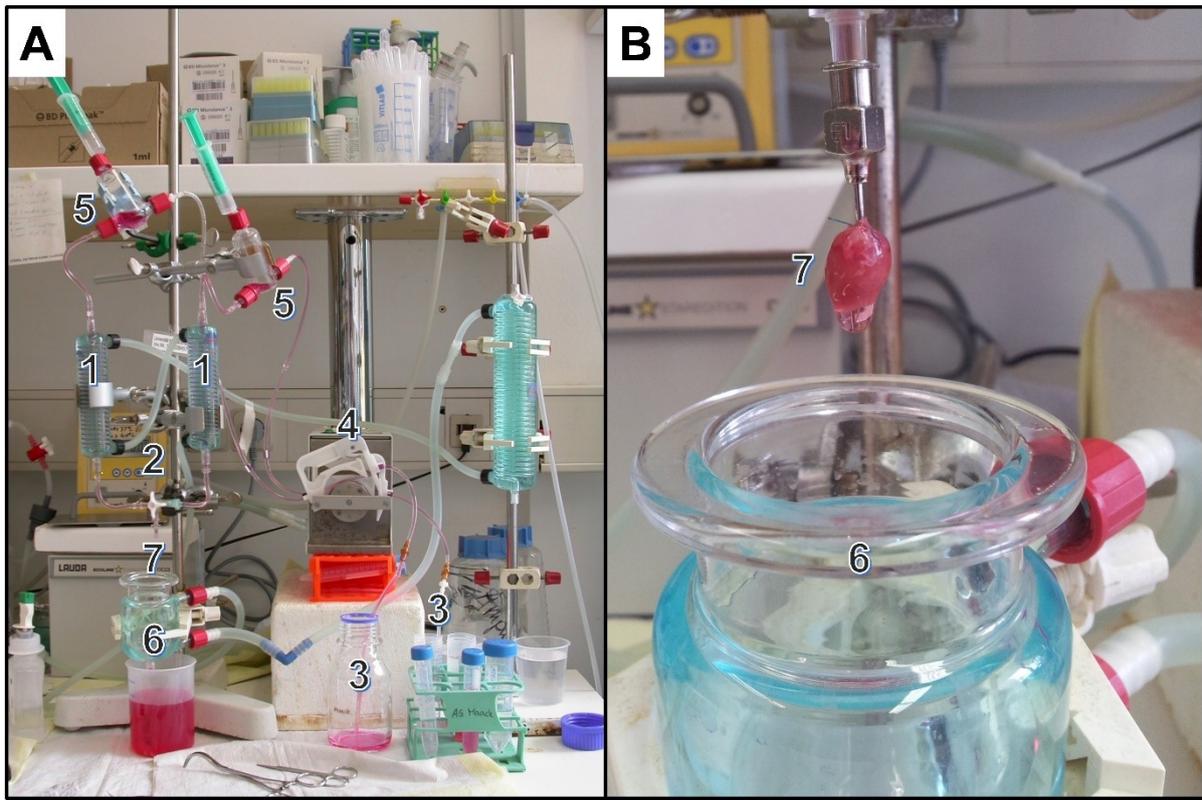


Abbildung 8: Aufbau der modifizierten Langendorff Perfusionsanlage

A, Über ein durch ein Schlauchsystem zirkulierendes Wasserbad und spiralförmige Wärmeaustauscher werden die Isolationstyrode und Liberaselösung auf 37 °C temperiert. Eine peristaltische Pumpe generiert einen kontinuierlichen Fluss beider Perfusionslösungen durch das System, welches mittels eines Dreiwegehahns eine exakte Regulation der Perfusion des Herzens zulässt. **B**, Die Wärmekammer ist zur besseren Demonstration des Herzens abgesenkt; (Bilder freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Kohlhaas).

- 1 → spiralförmige Wärmeaustauscher
- 2 → Kontrolleinheit des Wasserbads
- 3 → Zuleitungen der Perfusionslösungen
- 4 → peristaltische Pumpe
- 5 → Blasenfallen
- 6 → Wärmekammer
- 7 → Über die Aorta kanüliertes Herz (A: Anschlussstelle)

4.4 Das IonOptix-System

Alle zellulären Experimente wurden an zwei individuell angepassten, kongruenten IonOptix-Systemen (Myocyte Calcium & Contractility Recording System [μ Step Configuration], IonOptix LLC) in einer Dunkelkammer in Rotlicht gemessen. Das in ein System integrierte inverse Epifluoreszenzmikroskop benutzt kürzerwelliges monochromatisches Licht, um per Auflichtmikroskopie Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen und deren Emissionen zu messen (IonOptix LLC, 2019^[70]; Mulisch & Welsch, 2010^[124], S. 20-22). Dabei sind die durch IonOptix gelieferten Systeme in der Lage, Kontraktionsparameter von elektrisch stimulierten Kardiomyozyten mithilfe einer Kamera (MyoCam-S) und digitaler Zellgeometrie simultan aufzuzeichnen. Während Abbildung 9 ein reales Bild einer Fluoreszenzanlage zeigt, verdeutlicht Abbildung 10 den Aufbau der IonOptix-Systeme schematisch.

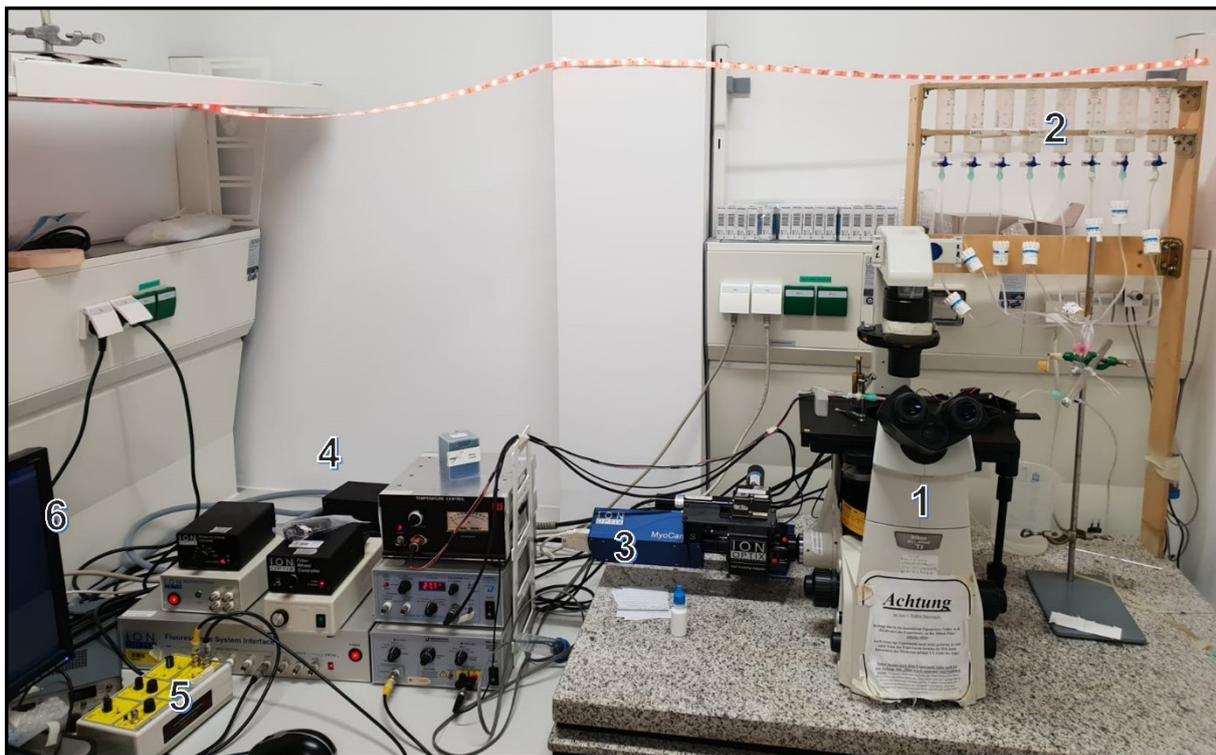


Abbildung 9: Aufbau eines der laboreigenen IonOptix-Systeme

Arbeitsplatz am inversen Epifluoreszenzmikroskops Nikon Eclipse Ti-S/L100 mit individuell konfigurierter IonOptix-Messanlage.

- 1 → Epifluoreszenzmikroskop
- 2 → Zulaufgefäße
- 3 → Kamera (MyoCam-S)
- 4 → Kontrolleinheiten
- 5 → Zell-Stimulator (Constant Current Stimulator DG2A)
- 6 → Computer

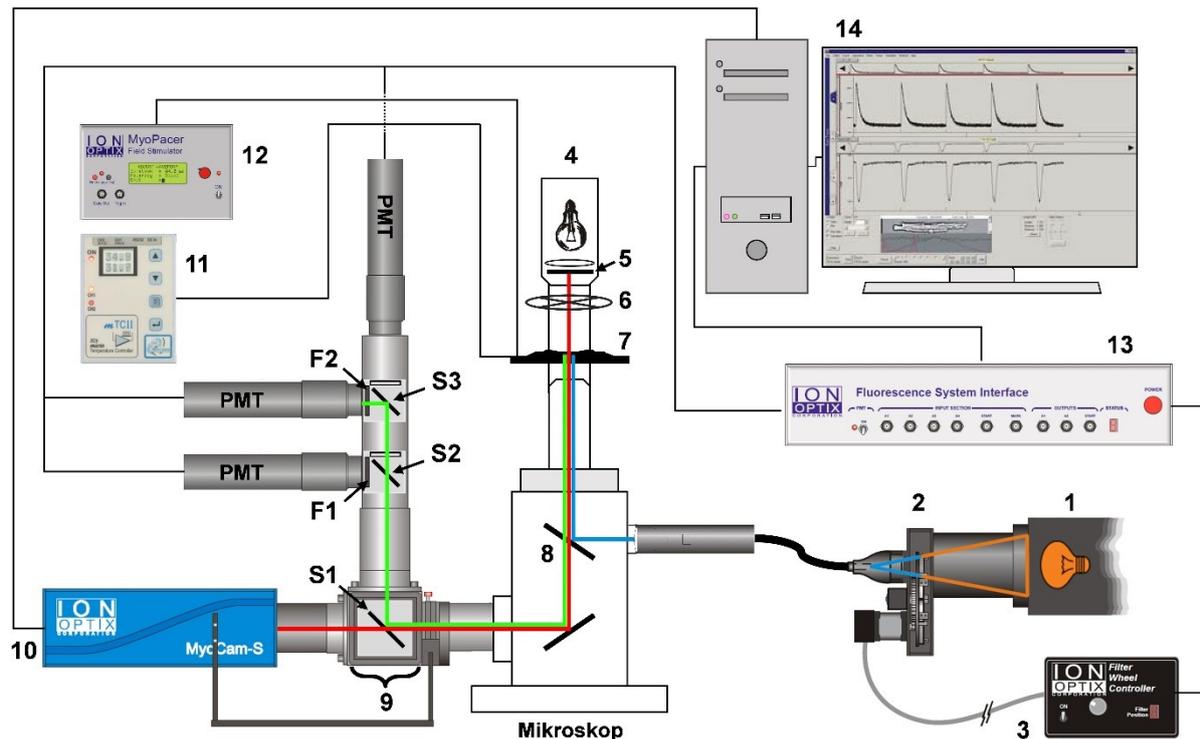


Abbildung 10: Setup der IonOptix-Systeme zur Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessung

Schematische Darstellung eines inversen Epifluoreszenzmikroskops mit Anbau einer modifizierten IonOptix-Anlage (Myocyte Calcium & Contractility Recording System) in μ Step Konfiguration. Die schwarzen Verbindungslinien visualisieren die relevantesten technischen Verknüpfungen des Systems; (Abbildung modifiziert nach IonOptix LLC, 2019^[70]).

- 1 → μ Step Lichtquelle (Xenon Short Arc Lamp -75XE) [blauer Strahlengang]
- 2 → Anregungsfilter (D340/12x, S490/20x)
- 3 → Filterrad-Controller/Filterwechsler
- 4 → Lichtquelle zur Durchlichtmikroskopie [roter Strahlengang]
- 5 → Lichtfilter (T660LPXR)
- 6 → Filterrad zur Phasenkontrastierung
- 7 → Mikroskopiertisch mit Kardiomyozyten
- 8 → Strahlenteiler (89017bs FITC/Texas Red)
- 9 → Säule mit Cell Framing Adaptern, Spiegeln (S1, 650DCXR; S2, 490DCLP; S3, total reflektierender Spiegel), Filtern (F1, D435/35x; F2, D525/30x) und Photomultiplier Tubes/PMT zur Verarbeitung des Emissionslichts [grüner Strahlengang]
- 10 → Kamera (MyoCam-S)
- 11 → Temperaturkontrollereinheit
- 12 → Zell-Stimulator (MyoPacer)
- 13 → Fluorescence System Interface
- 14 → Computer (Software, IonWizard 6.4)

Eine Xenonlampe erzeugt ein Licht, welches über Kollimatorlinsen gebündelt wird; ein Filter lässt dieses als monochromatisches Exzitationslicht durch, welches über einen dichroitischen Spiegel die Myozyten auf dem Mikroskopiertisch erreicht (Mulisch & Welsch, 2010^[124], S. 20-22). Durch einen eingebauten Filterwechsler in der „µStep-Lichtquelle“ können verschiedene Anregungswellenlängen (λ_{exc}) in einem Messvorgang erzeugt werden. Bei Anregung der Fluorochrome des Präparats wird gemäß des Stokes Shifts energieärmeres Licht einer größeren Wellenlänge emittiert (λ_{em}) (Mulisch & Welsch, 2010^[124], S. 20). Cell Framing Adapter minimieren Hintergrund- und Störsignale über eine Blende und optimieren somit die Fluoreszenzsignale des einzeln eingestellten Kardiomyozyten. Das emittierte Licht gelangt über ein komplexes Spiegelsystem zu Verstärkern (Photomultiplier Tube/PMT) und wird dort in ein elektrisches Signal umgewandelt. Durch das IonOptix-Modul „Fluorescence System Interface“ und die Software IonWizard 6.4 kann das umgewandelte Fluoreszenzsignal mithilfe eines Computers erfasst werden.

Gleichzeitig wird mittels Rotlicht und Durchlichtmikroskopie ein Bild im Mikroskop erzeugt und von einer Kamera (MyoCam-S) auf einen Computerbildschirm projiziert (IonOptix LLC, 2019^[70]). Dabei interferiert das langwellige Rotlicht auch hier nicht mit den anderen Fluoreszenzsignalen des Mikroskops. Somit können Kontraktionen (Sarcomerlängen) einer einzelnen kardialen Zelle in Echtzeit bei elektrischer Stimulation an Hand von digitaler Zellgeometrie registriert werden. Kontraktionsparameter konnten so später mit IonWizard 6.4 berechnet werden.

Stimulationsfrequenzen wurden von einem Zell-Stimulator (MyoPacer/Constant Current Stimulator DG2A) generiert und in die Zellkammer auf dem Mikroskopiertisch weitergeleitet. Während der Messungen befanden sich die Kardiomyozyten dort unter ständigem Flüssigkeitsfluss, der durch einen schwerkraftgetriebenen Zulauf und einen Ablauf mit Vakuumpumpe hergestellt wurde. Eine Temperaturkontrolleinheit ermöglichte konstante Versuchsbedingungen bei 37 °C. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Funktion und Eigenschaften der verwendeten Lichtfilter und Strahlenteiler der Messanlage.

Bezeichnung	Spiegelfunktion (nm)	Transmission (nm)	Farbstoffe/Funktion
89017bs FITC/Texas Red	340/490	435/>505	NAD(P)H/FAD/ DCF
490DCLP	<490	>490	NAD(P)H/FAD/ DCF
T660LPXR	---	>660	Durchlicht
650DCXR	<650	>650	Durchlicht
D340/12x,	---	340±6	NAD(P)H
D435/35x	---	435±17,5	NAD(P)H
S490/20x	---	490±10	FAD/DCF
D525/30x	---	525±15	FAD/DCF

Tabelle 2: Verwendete Lichtfilter und Strahlenteiler des Epifluoreszenzmikroskops

Dichroitische Spiegel und selektive Lichtfilter ermöglichten die Transmission und Spiegelung verschiedener Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung innerhalb eines Messvorgangs. Abkürzungen: DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; FAD, oxidiertes Flavinadeninukleotid; NAD(P)H, reduziertes Nicotinamidadeninukleotid(phosphat); nm, Nanometer.

4.5 Messvorbereitungen

Vor der eigentlichen Zellisolation wurde das Nährmedium aller zellulären Versuche (Normaltyrode/NT) hergestellt. Dieses Medium enthielt bei einem pH-Wert von 7,54 unter anderem 1 mM Calciumchlorid (CaCl₂) und 10 mM Glucose. Alle weiteren Reagenzien (Isoprenalin, FCCP, Cyanid, DMSO, EMD) wurden in die NT-Lösung aufgenommen und in verschiedene Zulaufgefäße gefüllt. Die Zulaufgefäße besitzen manuelle Durchflussregler und sind über ein Schlauchsystem in einen einzigen Zulauf vereint. Diese Vorrichtung erlaubte es, einen konstanten Flüssigkeitsspiegel und -fluss im Zusammenspiel mit einer Vakuum-Absaugpumpe beim Ein- und Auswaschen der verschiedenen Reagenzlösungen zu gewährleisten.

Die aus der Primärkultur entnommenen ventrikulären Kardiomyozyten wurden entweder nativ oder nach einer Inkubation mit dem Farbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) an der IonOptix-Anlage untersucht. Zuerst wurde Laminin (4 µl), welches über eine Fixation der Zellen ein späteres Absaugen während der Messung verhindern sollte, auf einem Deckglas aufgebracht und nach Eintrocknen dieser Substanz das Glas mit

wenigen Tropfen der Zellsuspension bedeckt. Dieses Deckglas wurde in eine Messkammer eingebaut und auf dem Mikroskopiertisch eingespannt. Nach 5 min Wartezeit waren die Kardiomyozyten sedimentiert und über das Laminin am Deckglas befestigt.

Danach wurde die Messkammer an die verschiedenen Kontrolleinheiten (Temperaturkontrolleinheit, MyoPacer, Zu- und Ablauf) des Mikroskops angeschlossen und ein gleichmäßiger Durchfluss mit NT-Lösung hergestellt. Dazu musste der Sauger der Vakuumpumpe so auf dem Deckglas positioniert werden, dass ein gewisser Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer gehalten werden konnte. Zusätzlich wurden der Temperaturregler (37 °C) und die bipolare Stimulation (Einzelimpulsdauer 5 ms) mit 0,5 Hz angeschaltet. Die Kardiomyozyten wurden für alle verwendeten Messprotokolle über das Okular nach vier phänotypischen Kriterien ausgesucht:

1. Kontraktionen (stimulussynchron)
2. Lage (frei von anderen Zellen)
3. Zellbegrenzung (intakt/schroff)
4. Form (deutliche Querstreifung; mit den Blenden des IonOptix-Systems einstell- und fokussierbar; mittelgroß)

Nach Projektion der einzelnen Kardiomyozyte auf den Computerbildschirm mittels der MyoCam konnten die in den folgenden Abschnitten erklärten Versuchsprotokolle durchgeführt werden.

4.6 Messprotokolle

Alle Kardiomyozyten wurden unter gleichen Bedingungen für die jeweilige Versuchsreihe in vorher etablierten Versuchsprotokollen durch eine Arbeitslasterhöhung physiologisch gestresst. Bei jeder Messung wurden eine Kalibration mit FCCP und CN durchgeführt und am Ende des Protokolls mit H₂O₂ pathologische Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies simuliert. Bei der NAD(P)H- und FAD-Messreihe wies das H₂O₂ dagegen eine funktionstüchtige Nnt nach und galt somit als Positivkontrolle (Nickel et al., 2015^[132]). Mithilfe der ebenfalls gemessenen Hintergrundsignale war eine spätere rechnerische Aufbereitung der Daten möglich. Abbildung 11 veranschaulicht zusammenfassend den Ablauf aller Messprotokolle der unterschiedlichen Versuchsreihen.

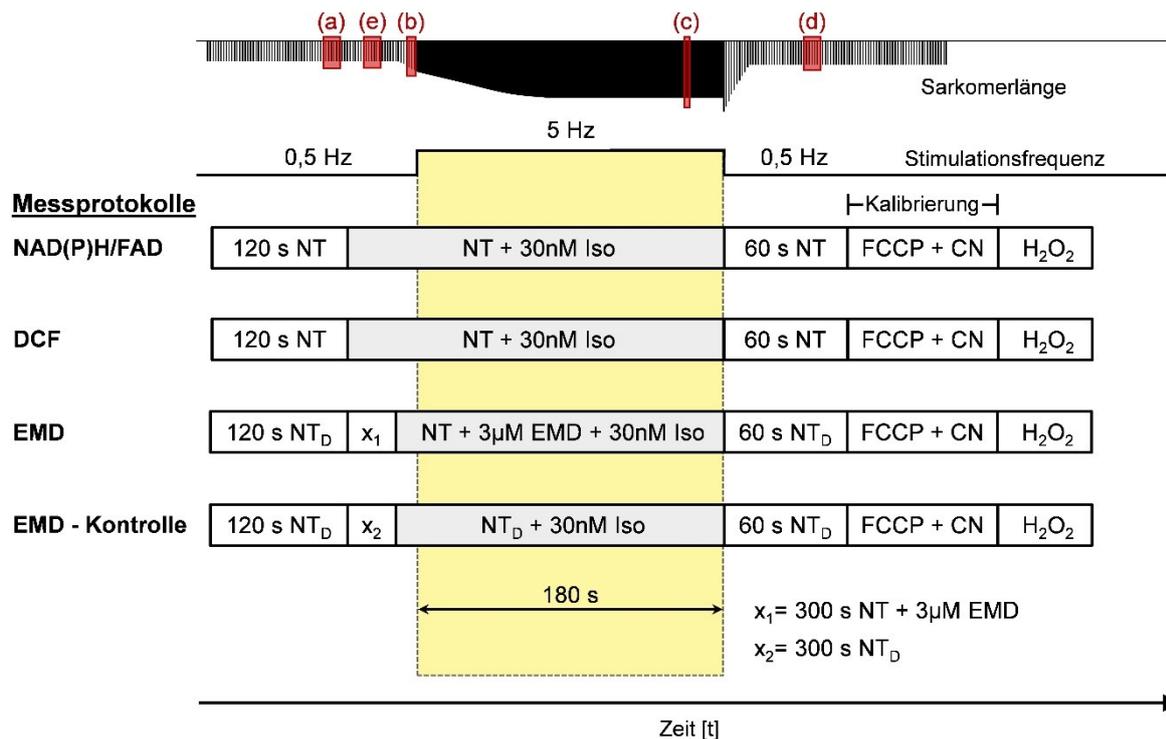


Abbildung 11: Messprotokolle zur zellulären Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung

In einem Stressprotokoll wurden adulte ventrikuläre Kardiomyozyten nach einer anfänglichen Stimulation von 0,5 Hz dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin ausgesetzt und in einer 180 s langen Stressphase (gelbe Schattierung) bei 5 Hz elektrisch stimuliert. Neben der im Verlauf einer Messung auftretenden Veränderung der kardiomyozytären Sarkomerlänge und der applizierten Stimulationsfrequenz sind die in die Zelle einzuspülenden Reagenzien für jedes Protokoll dargestellt. Die Buchstaben (a)-(e) illustrieren die Zeitpunkte, an denen repräsentative myozytäre Kontraktionen einer Transientenanalyse zugeführt wurden. Abkürzungen: μ M, Mikromolar; CN, Cyanid; DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; EMD, Calcium-Sensitizer; FAD, oxidiertes Flavinadenindinukleotid; FCCP, H⁺-Ionophor; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; NAD(P)H, reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat); nM, Nanomolar; NT, Normaltyrode; NT_D, DMSO-haltige Normaltyrode; s, Sekunde; (Abbildung modifiziert nach Meiser, 2015^[119]).

4.6.1 NAD(P)H- und FAD-Versuchsreihe

Der Redoxstatus der einzelnen Kardiomyozyten wurde über die Autofluoreszenzmoleküle NAD(P)H und FAD unter Ausnutzung der jeweilig spezifischen Wellenlängenspektren bestimmt. Die Moleküle NADH und NADPH besitzen identische Absorptionsmaxima im ultravioletten Wellenlängenbereich bei 260 nm und 340 nm und werden folglich unter NAD(P)H zusammengefasst (Doane, 1967^[45]; Rover Jr. et al., 1998^[151]). In oxidiert Form zeigen NAD⁺ und NADP⁺ keine signifikante Absorption bei einem Ultraviolettlicht von 340nm (Eng et al., 1989^[50]). Deswegen werden vorrangig NAD(P)H-Moleküle bei genau dieser Wellenlänge ($\lambda_{exc} = 340$ nm) angeregt, welche eine blaue Breitbandstrahlung bei $\lambda_{em} \approx 450$ nm emittieren (Eng et al., 1989^[50]). Durch die Verwendung derselben Wellenlängen bei den zellulären Fluoreszenzmessungen

wurde sich dieser spektrophotometrische Unterschied zunutze gemacht. Dabei stammt die Mehrzahl der Fluoreszenzsignale des NAD(P)H kardialer Zellen aus den Mitochondrien und nur ein geringer Teil aus dem Cytosol (Eng et al., 1989^[50]). Bei dem oxidierten Coenzym FAD liegt dagegen ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, während sein reduzierter Redoxpartner, FADH₂, in diesem Wellenlängenbereich kaum absorbiert (Kao et al., 2008^[74]). Da jene Wellenlänge bereits für die Emissionswellenlänge des NAD(P)H in dem Messsetup belegt war, wurde das FAD aus technischen Gründen mit einem blauen Licht von $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ angeregt. FAD emittierte grünes Licht einer Wellenlänge im Bereich von 530 nm (Kao et al., 2008^[74]), welches bei $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ detektiert wurde. Alle 4 Sekunden wurden die Fluoreszenzsignale alternierend (Filterwechsler) im Abstand von 200 ms für 150 ms gemessen.

Die Messungen begannen mit einer 120 s langen Einschlagphase bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz und laufender NT-Lösung. Danach wurde mithilfe von Dreiwegehähnen auf die 30 nM Isoprenalin/Iso-Lösung umgeschaltet. Die β -adrenerge Substanz Isoprenalin führt zu einer Steigerung der Herzfrequenz, die mit einer physiologischen chronotropen Stimulation wie z.B. bei maximaler körperlicher Bewegung via Adrenalin und Noradrenalin vergleichbar ist (Kass et al., 1998^[75]; Vornanen, 1992^[179]). Bei visuell beobachtbarer einsetzender inotroper Wirkung (Zunahme der Sarkomerverkürzung) wurde am Stimulationsgerät 180 s auf 5 Hz geschaltet. Die Kalibration schloss sich nach einer 60 s langen Auswaschphase (engl. wash-out phase) mit NT-Lösung bei 0,5 Hz an.

Dazu wurde die Zelle zuerst mit einer 5 μM Lösung des H⁺-Ionophors FCCP (Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation, 2019^[121]) umspült und auf die an den Fluoreszenzsignalen sichtbare Oxidation des NAD(P)H und des FADH₂ gewartet (Eng et al., 1989^[50]). Setupbedingt (lange Flüssigkeitsleitungen) wurde bereits während des rapiden Abfalls des NAD(P)H-Signals auf eine 4 mM Cyanid/CN-Lösung umgeschaltet. Damit wurde die Oxidation der Reduktionsäquivalenten gestoppt, denn CN hemmt den Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette kompetitiv (Brandt, 2007^[22], S. 500; Eng et al., 1989^[50]). Durch Blockierung der ETC akkumulierten NAD(P)H und FADH₂ und folglich stieg das NAD(P)H-Signal wieder an (Eng et al., 1989^[50]). Dabei verhielt sich die Autofluoreszenz von FAD reziprok zu dem NAD(P)H-Signal (Nickel et al., 2015^[132]). Diese pathologisch denkbaren Maximal- und Minimalwerte wurden in der späteren Auswertung für die Relativierung der absoluten Messwerte genutzt. Anschließend wurde weiterer exzessiver Stress der Muskelzelle mit dem Oxidationsmittel H₂O₂

in einer Konzentration von 9,8 mM zugeführt. Am Ende jeder Messung wurde die auf dem Computerbild sichtbare Kardiomyozyte mithilfe einer Quetschpipette weggespült und die Fluoreszenzsignale des Hintergrunds gemessen. Aus den aufgezeichneten Sarkomerverkürzungen konnten wie in 4.6.4. beschrieben Kontraktionsparameter berechnet werden. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 12 die Primärdaten einer Messung exemplarisch abgebildet.

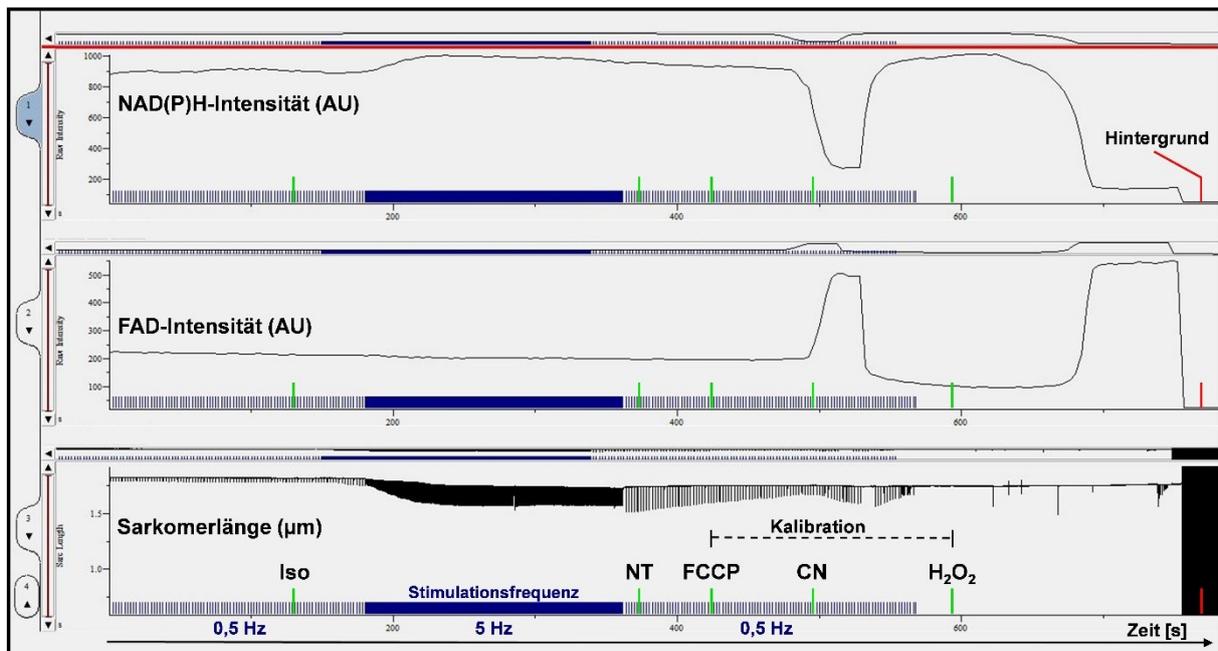


Abbildung 12: Zelluläre Kontraktilitäts- und Autofluoreszenzmessung [NAD(P)H und FAD]
 Rohdaten eines dem NAD(P)H- und FAD-Stressprotokoll ausgesetzten mCAT-Kardiomyozyten (Py-RAT-Maus-Identifikationsnummer: 51). Diese entstammen der ersten experimentell gemessenen Zelle des Versuchstags am 09.06.2016 und wurden mithilfe der Software IonWizard 6.4 erhoben. Während die grünen Balken die Zeitpunkte symbolisieren, an denen die jeweiligen Lösungen eingespült wurden, stellt der rote den Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung des Hintergrunds dar. Abkürzungen: μm , Mikrometer; AU, (engl.) arbitrary unit; CN, Cyanid; FAD, oxidiertes Flavinadenindinukleotid; FCCP, H^+ -Ionophor; H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; NAD(P)H, reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat); NT, Normaltyrode; s, Sekunde.

4.6.2 DCF-Versuchsreihe

Der stark fluoreszierende Farbstoff DCF wurde als ein zellmembranpermeables Chlor-methylderivat (CM- H_2DCFDA) des reduzierten und acetylierten 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetats (H_2DCFDA) verwendet und dient als zellulärer Farbstoff für reaktive Sauerstoffspezies (Dikalov et al., 2007^[44]). Nach Eintritt in die Zelle werden zunächst die Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten und erst dann kann DCF bei intrazellulärer Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies seine Fluoreszenzeigenschaft entfalten (Dikalov et al., 2007^[44]; Thermo Fisher Scientific Inc., 2019^[172]). Bei

diesen Reaktionen entsteht eine zellgebundene Form des DCF, die nicht mehr durch die Zellmembran permeieren kann und folglich in der Zelle eingeschlossen ist (Dikalov et al., 2007^[44]).

Für die anschließende Inkubation wurden 50 µg DCF in 86,5 µl Pluronic® F-127 gelöst und in Aluminiumfolie abgedunkelt gelagert. Aus der Primärkultur wurden ca. 1,5 ml der Zellsuspension in ein neues Reagenzgefäß gefüllt. Nach 5-minütiger Sedimentation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml NT-Lösung aufgenommen. Danach wurden 0,5 - 0,8 µl der DCF-Lösung (Endkonzentration 0,5-0,8 µM) hinzugegeben und nach zehnmalig vorsichtigem Schwenken im Brutschrank bei 37 °C erst 15 min liegend und dann 5 min stehend inkubiert. Darauf wurde der Überstand verworfen und das Pellet je nach Größe in ca. 1 - 1,5 ml NT-Lösung gelöst. Nach der Inkubation wurden die mit DCF beladenen Myozyten bis zur Messung ebenfalls abgedunkelt aufbewahrt.

Die Messungen wurden nach dem NAD(P)H- und FAD-Protokoll wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt. Da DCF in einem ähnlichen Wellenlängenbereich wie FAD absorbiert und emittiert (Thermo Fisher Scientific Inc., 2019^[172]), konnten die Einstellungen der vorherigen Versuchsreihe übernommen werden ($\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). Es wurden hier keine Kontraktionsparameter berechnet, weil bei dieser Versuchsreihe das DCF-Signal im Verlauf des Stressprotokolls und die zelluläre Response auf exzessiven oxidativen Stress im Vordergrund standen.

4.6.3 EMD-Versuchsreihe

In einem Stressprotokoll wurde das kardiomyozytäre Redox-Handling unter Perfusion des Calcium-Sensitizers EMD 57033 mit dem Farbstoff DCF getestet. Neben den zuvor beschriebenen Kalibrationslösungen (siehe 4.6.1) wurden vier weitere Lösungen für die Versuchsreihe angesetzt. Hierfür wurden jeweils in zwei Zentrifugenröhrchen 5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO/ Endverdünnung 1:10.000) oder 5 µl EMD (Endkonzentration 3 µM) in 50 ml Normaltyrode aufgenommen. Jeweils eine der EMD- und DMSO-Lösungen wurde mit 15 µl Iso (Endkonzentration 30 nM) erweitert, sodass man vier unterschiedliche Spüllösungen erhielt. DMSO galt unter diesen Versuchsbedingungen als Kontrolle, denn das EMD wurde ebenfalls in diesem Lösungsmittel gelöst. EMD- oder DMSO-haltige Lösungen wurden in dem in Abbildung 11 beschriebenen

Stressprotokoll abwechselnd eingesetzt. Im Unterschied zu den anderen Messprotokollen wurden die Kardiomyozyten 120 s in DMSO-haltiger Normaltyrode (NT_D) bei 0,5 Hz stimuliert. Danach schloss sich eine 300 s lange Einwaschphase (engl. wash-in phase) mit entweder EMD/NT oder NT_D bei 0,5 Hz an. Ferner enthielten die für die darauffolgende 180 s lange 5 Hz Stimulation verwendeten Iso-Lösungen ebenfalls EMD oder DMSO. Auch im anschließenden „Wash-out“ wurde die DMSO-haltige NT-Lösung benutzt. Die Kalibration, die H₂O₂-Zugabe und die Messung des Hintergrundsignals wurden gemäß der NAD(P)H/FAD-Messung durchgeführt.

Die ermittelten Kontraktionsparameter der mit EMD und DMSO behandelten Myozyten waren im Vergleich ganz besonders interessant, denn nur bei einem signifikanten Unterschied galten diese als Bestätigung eines funktionierenden Messablaufs. So musste die inotrope Wirkung des Calcium-Sensitizers anhand einer systolischen Sarkomerlängenverkürzung erst gezeigt werden, um überhaupt eine experimentelle Aussage zulassen zu können. Im ersten Versuchsblock wurden ausschließlich Kardiomyozyten von transgenen mCAT-Mäusen gemessen, während dasselbe Stressprotokoll an gleichaltrigen WT-Mäusen kurze Zeit später durchgeführt wurde.

4.6.4 Kontraktilitätsmessungen

Während des gesamten Messprotokolls wurden jegliche Kontraktionen der im Fokus liegenden Kardiomyozyte mit einer Bildwechselfrequenz von 240 Hz von der MyoCam erfasst. Anhand dieser konnten kontinuierlich Sarkomerlängen über digitale Zellgeometrie in Echtzeit aufgezeichnet werden. Die Software IonWizard 6.4 benutzt komplexe mathematische Modelle, um über eine numerische Approximation Parameter der Kontraktilität und Kontraktionskinetik zu berechnen. Im Nachhinein konnten so Kontraktionen gemittelt und daraus die folgenden Parameter bestimmt werden: Diastolische Sarkomerlänge (engl. baseline), systolischer Scheitelpunkt (engl. peak), Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung (engl. time to peak, TTP), fraktionelle Sarkomerlängenverkürzung in Relation zur Baseline (engl. fractional shortening, FS) und Relaxationszeiten bis 50- und 90% der Baseline (engl. relaxation time; RT 50%, RT90%).

Bei den NAD(P)H/FAD-Messungen wurden zu vier und bei dem EMD-Protokoll zu fünf Zeitpunkten repräsentative Kontraktionen der Zellen einer Transientenanalyse zugeführt. So wurden für die NAD(P)H/FAD-Messungen jeweils 3-10 Kontraktionstransienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemittelt und ausgewertet:

- (a) „NT 0.5Hz“ 5-10 Transienten direkt vor Ablauf der ersten 120 s - unter NT
- (b) „Iso 0.5Hz“ die 3 letzten Transienten vor der 5 Hz Stimulation - unter Iso
- (c) „Iso 5Hz“ 5-10 Transienten am Ende der 5 Hz Stimulation - unter Iso
- (d) „Wash-out“ 5-10 Transienten direkt vor Beginn der Kalibration - unter NT

Bei der EMD-Versuchsreihe wurde zur direkten Überprüfung der Wirkung des Pharmakons eine zusätzliche Kontraktilitätsanalyse nach pharmakokinetischer Anschlagzeit durchgeführt. Dazu wurden direkt vor Ablauf der 300 s langen Inkubation mit EMD oder DMSO 5-10 Transienten analysiert [(e) „Wash-in“]. Abbildung 13 zeigt zur Veranschaulichung eine Transientenanalyse der NAD(P)H/FAD-Versuchsreihe.

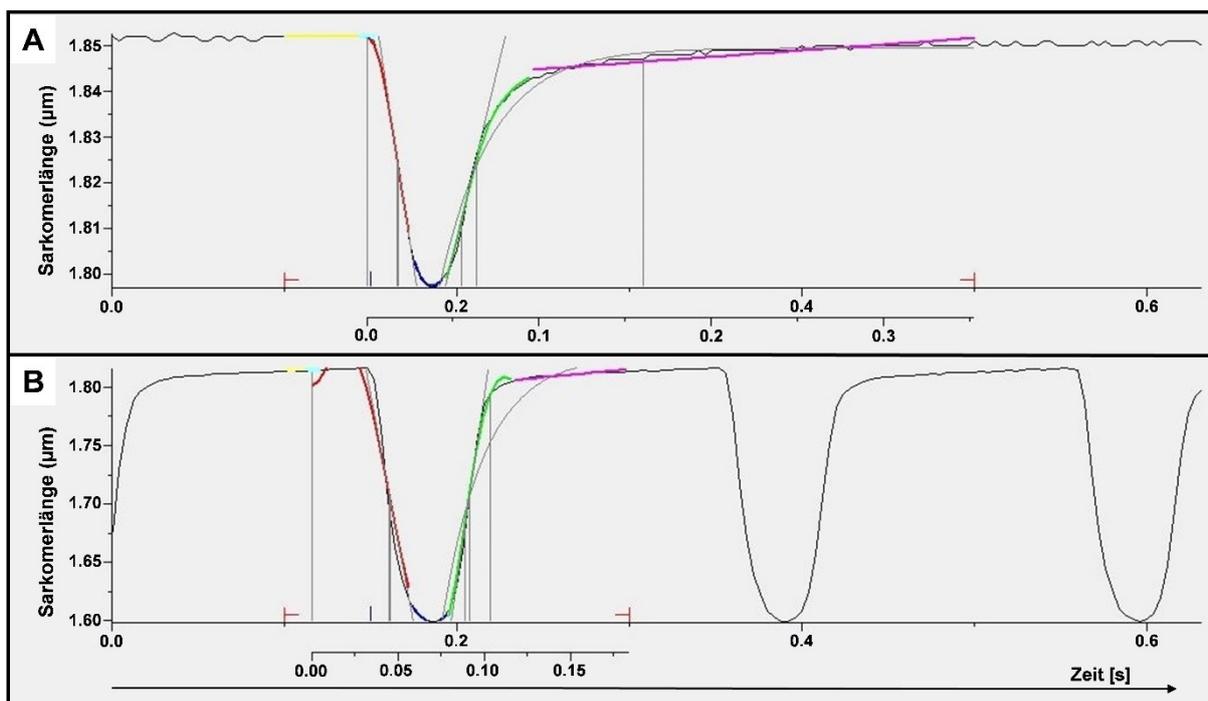


Abbildung 13: Analyse kardiomyozytärer Kontraktionstransienten

Exemplarische Darstellung der mit der Software IonWizard 6.4 durchgeführten Transientenanalysen. Mithilfe komplexer mathematischer Modelle werden Parameter der Kontraktilität und Kontraktionskinetik berechnet. Ein graphisches Feedback (Farben und Striche) ermöglicht eine visuelle Überprüfung der numerischen Approximation. Die hier dargestellten Kontraktionstransienten (**A**, NT 0,5 Hz; **B**, Iso 5 Hz) entstammen der sechsten experimentell gemessenen WT-Zelle (PyRAT-Maus-Identifikationsnummer: 34) des NAD(P)H/FAD-Versuchstags am 23.06.2016. Abkürzungen: µm, Mikrometer; s, Sekunde.

4.7 Graphische Darstellung und statistische Analyse

Die mitochondrialen und zellulären Daten wurden mit der jeweilig genannten Software erhoben und teilweise ausgewertet (Oxygraph Plus, Oxygraph Version 1.02; g_Me-deia; IonWizard 6.4, revision 1). Anschließend wurden alle Datensätze anhand von Microsoft Excel 2016 rechnerisch aufbereitet. Dazu wurden die einzelnen Messungen der zellulären Versuchsreihen durch standardisierte Analyseschemata ausgewertet, in denen beispielsweise eine prozentuale Relativierung der absoluten Messwerte, eine Hintergrundkorrektur und eine Nivellierung der Experimentdauer in Abhängigkeit des Beginns der 5 Hz Stimulation durchgeführt wurden.

Alle Daten wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 6 (Version 6.01) graphisch und statistisch aufbereitet. Die Ergebnisse gelten als signifikant, wenn sich zwei Gruppen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ unterscheiden. Mithilfe einer two-way-ANOVA-Analyse mit Bonferroni Multiple Comparison Posttest bzw. eines ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur konnte eine statistische Signifikanz überprüft werden. Die verschiedenen Datentafeln werden als arithmetischer Mittelwert (engl. mean) mit Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Atmungsmessung an kardialen mCAT-Mitochondrien

Die Funktion der mitochondrialen Elektronentransportkette von mCAT-Mäusen wurde über eine Sauerstoffverbrauchsmessung an einer Clark-Elektrode überprüft und mit der von WT-Mäuse verglichen (siehe 4.2.2). Oligomycin (State 4) konnte durch Hemmung der F_1F_0 -ATPase die ATP-Produktion und damit die State 3-Atmung egalisieren und liefert darüber hinaus Informationen über das Ausmaß einer entkoppelten Atmung via Protonenlecks (Brand & Nicholls, 2011^[21]; Lanza & Nair, 2009^[93]).

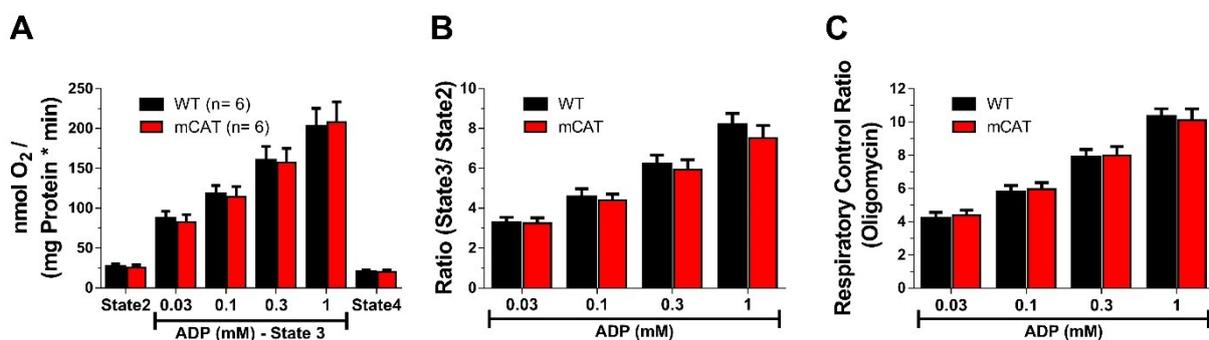


Abbildung 14: Atmungsmessung an kardialen mCAT-Mitochondrien

An isolierten Mitochondrien wurde nach photometrischer Proteinbestimmung der Sauerstoffverbrauch an einer Clark-Elektrode gemessen. **A**, Sauerstoffverbrauch (nmol O₂ / [mg Protein * min]) bei mehreren Bedingungen: 5 mM Pyruvat/Malat (State 2), zusätzlich verschiedene ADP-Konzentrationen (State 3), 1,2 μ M Oligomycin (State 4). **B**, Verhältnis von State 3/ State 2. **C**, Respiratory Control Ratio (Verhältnis von State 3/ State 4). Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; mg, Milligramm; min, Minute; mM, Millimolar; nmol, Nanomol; O₂, Sauerstoff; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der verwendeten Mäuseherzen an.

Wie in Abbildung 14A zu erkennen, ergaben sich weder bei isolierter Zugabe von PM (State 2) noch bei zusätzlichem ADP (State 3) und auch nicht beim F_1F_0 -ATPase-Inhibitor Oligomycin (State 4) (Lanza & Nair, 2009^[93]) signifikante Unterschiede zwischen dem Sauerstoffverbrauch beider Mäusepopulationen. In beiden Versuchsgruppen wurde am meisten Sauerstoff bei einer supraphysiologischen (Yamashita et al., 1994^[190]) ADP-Konzentration von 1 mM verbraucht (WT \approx 203,1; mCAT \approx 208,3 nmol O₂ / [mg Protein * min]). Das Verhältnis (engl. ratio) zwischen State 3/ State 2 verdeutlicht den Unterschied zwischen reiner Atmung auf der Grundlage von Substrat zu simultaner „Pull“-Aktivierung der Atmungskette durch ADP. Auf der anderen Seite stellt das (engl.) „Respiratory Control Ratio“ (Verhältnis von State3/ State4) ein Maß für die

Integrität der Mitochondrien dar (Lanza & Nair, 2009^[93]). Bei diesen Quotienten zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven.

5.2 Superoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien

Mit der Spinprobe CMH konnte die mitochondriale Superoxidproduktion von mCAT- und WT-Mäusen detektiert werden (siehe 4.2.3). Neben PM und ADP wurden auch zwei Zellgifte, 2,4-Dinitrophenol und Antimycin A, als Positivkontrolle verwendet. Während DNP die Atmungskette als H⁺-Ionophor entkoppelt (Chan et al., 2005^[27]), inhibiert AMA den Komplex III der ETC (Ma et al., 2011^[115]) und provoziert eine hohe Superoxidproduktion (Aon et al., 2003^[5]).

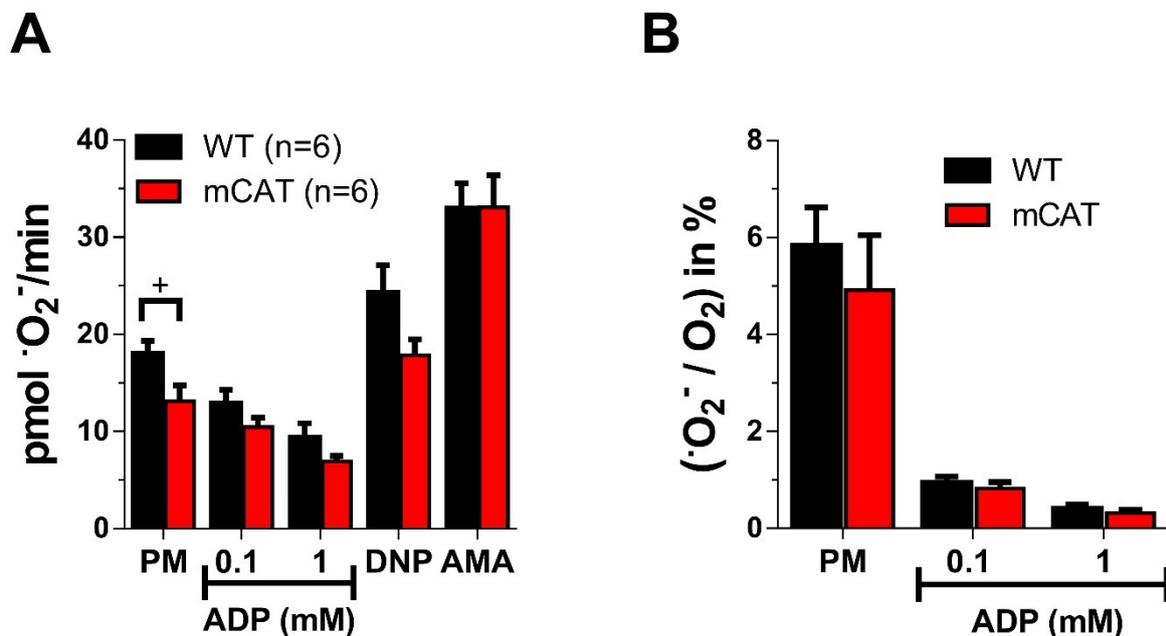


Abbildung 15: Superoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien

An isolierten Mitochondrien wurde nach photometrischer Proteinbestimmung die Generation von Superoxiden mit der Spinprobe CMH gemessen. **A**, Superoxidproduktion (pmol · O₂⁻/min) bei mehreren Bedingungen: 5 mM Pyruvat/Malat; 0,1; 1 mM ADP; 250 μM DNP; 15 μM AMA. **B**, Prozentualer Anfall von Superoxid pro respiratorisch verbrauchtem Sauerstoffmolekül. Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; AMA, Antimycin A; DNP, 2,4-Dinitrophenol; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; min, Minute; mM, Millimolar; ·O₂⁻, Superoxid; O₂, Sauerstoff; PM, Pyruvat/Malat; pmol, Picomol; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der verwendeten Mäuseherzen an; +p<0,05 (ungepaarter t-Test).

Tendenziell wurden bei den ADP- und der DNP-Bedingung weniger Superoxidradikale pro Minute ($\text{pmol} \cdot \text{O}_2^-/\text{min}$) von mCAT-Mitochondrien produziert (DNP: $p=0,075$; 0,1 mM ADP: $p=0,19$; 1 mM ADP: $p=0,151$ [ungepaarter t-Test]). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Superoxidproduktion beider Versuchsgruppen wurde allerdings nur bei der State 2-Bedingung festgestellt (Abbildung 15A; $p=0,042$). Abbildung 15B verdeutlicht, dass im Vergleich zu den State 3-Bedingungen prozentual mehr Superoxidradikale in Abwesenheit von ADP pro respiratorisch verbrauchtem molekularem Sauerstoff anfallen (z.B. bei 0,1 mM ADP: WT $\approx 0,9\%$, mCAT $\approx 0,8\%$; State-2: WT $\approx 5,8\%$, mCAT $\approx 5\%$). Hierbei unterschieden sich beide Mäusepopulationen aber nicht signifikant.

5.3 Wasserstoffperoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien

Die mitochondriale H_2O_2 -Produktion wurde mithilfe des H_2O_2 -sensitiven Farbstoffs Amplex® UltraRed an humane Katalase exprimierenden Mitochondrien (mCAT) in einem Assay (siehe 4.2.4) gemessen. Neben der Detektion von H_2O_2 bei einem substratfreien Versuchsansatz (State 1), wurde simultan die Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion bei alleiniger Anwesenheit von PM, additionalen ADP-Konzentrationen sowie den Substanzen DNP und AMA durchgeführt.

Bei drei der acht Versuchsbedingungen wurden in mCAT-Mitochondrien signifikant weniger H_2O_2 produziert (Abbildung 16A). Dies traf zu für Mitochondrien in der Abwesenheit von Substrat (State 1), der Gegenwart von PM in der Abwesenheit von ADP (State 2) sowie bei 30 μM ADP. Bei einigen anderen Bedingungen war die gleiche Tendenz zu erkennen (besonders bei 0,1 mM ADP: $p=0,066$; 1 mM ADP: $p=0,069$ [ungepaarter t-Test]). Die stärkste mitochondriale H_2O_2 -Produktion wurde innerhalb der Versuchsreihe bei Zugabe von AMA detektiert (WT $\approx 71,27$; mCAT $\approx 79,24$ $\text{pmol H}_2\text{O}_2/[\text{mg Protein} \cdot \text{min}]$). Der Quotient aus H_2O_2 -Produktion und mitochondrialer Atmung veranschaulicht ergänzend zu 5.2, dass im Vergleich zur artifiziellen State 2-Bedingung die mitochondriale ROS-Produktion in Gegenwart von ADP erniedrigt ist.

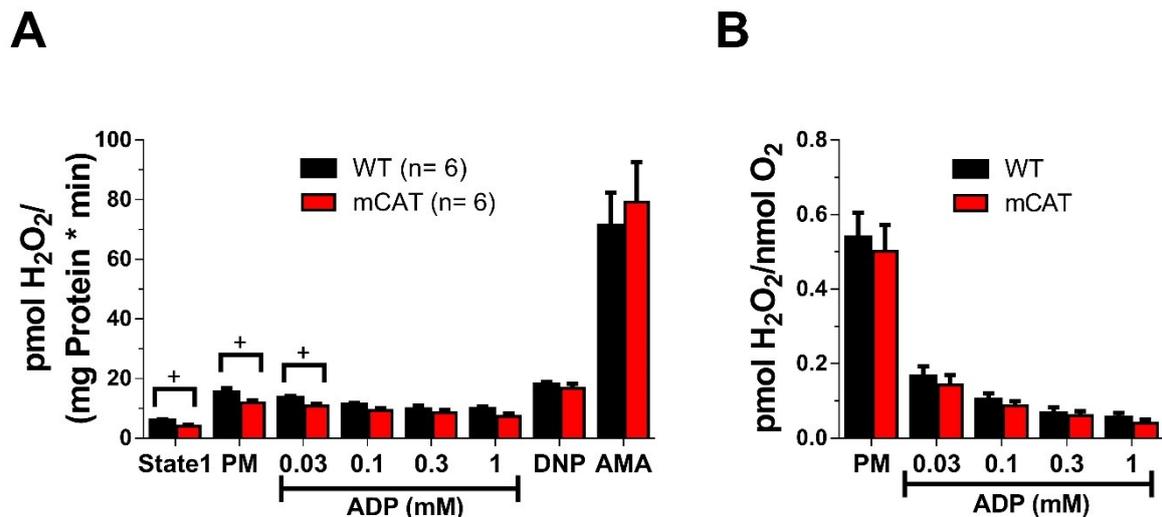


Abbildung 16: H₂O₂-Produktion von kardialen mCAT-Mitochondrien

An isolierten Mitochondrien wurde nach photometrischer Proteinbestimmung die Generation von Wasserstoffperoxid mit dem Farbstoff Amplex® UltraRed gemessen. **A**, Wasserstoffperoxidproduktion (pmol H₂O₂/ [mg Protein * min]) nativer Mitochondrien (State 1) und in Anwesenheit von 5 mM Pyruvat/Malat (PM; 0,03; 0,1; 0,3; 1 mM ADP; 250 µM DNP; 15 µM AMA). **B**, Quotient aus Wasserstoffperoxidproduktion (pmol H₂O₂) und respiratorischem Sauerstoffverbrauch (nmol O₂) für die jeweilig gleiche Bedingung. Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; AMA, Antimycin A; DNP, 2,4-Dinitrophenol; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; mg, Milligramm; min, Minute; mM, Millimolar; nmol, Nanomol; O₂, Sauerstoff; PM, Pyruvat/Malat; pmol, Picomol; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der verwendeten Mäuseherzen an; +p<0,05 (ungepaarter t-Test).

5.4 Calciumretentionskapazität von mCAT-Mitochondrien

In einem nach Chen et al. (Chen et al., 2013^[28]) modifizierten PTP-Assay (siehe 4.2.5) konnte die Calciumretentionskapazität von kardialen Mitochondrien im Kontext eines zusätzlich redox-aktiven Enzyms (Katalase - mCAT) bestimmt und somit die Widerstandsfähigkeit von mCAT-Mitochondrien überprüft werden.

In Analogie zu einem exponentiellen radioaktiven Zerfall konnte aus den entsprechenden Fluoreszenzsignalen eine Zeitkonstante Tau (τ) berechnet werden, welche eine Zeitspanne beschreibt, innerhalb derer ein Ausgangswert auf $e^{-1} \approx 37\%$ des ursprünglichen Wertes abfällt (Tipler & Mosca, 2015^[175], S. 1323-1324). Dabei spricht eine kürzere Zeitspanne (hier: [s]) für einen rapiden exponentiellen Zerfall und somit für eine schnelle mitochondriale Calciumaufnahme.

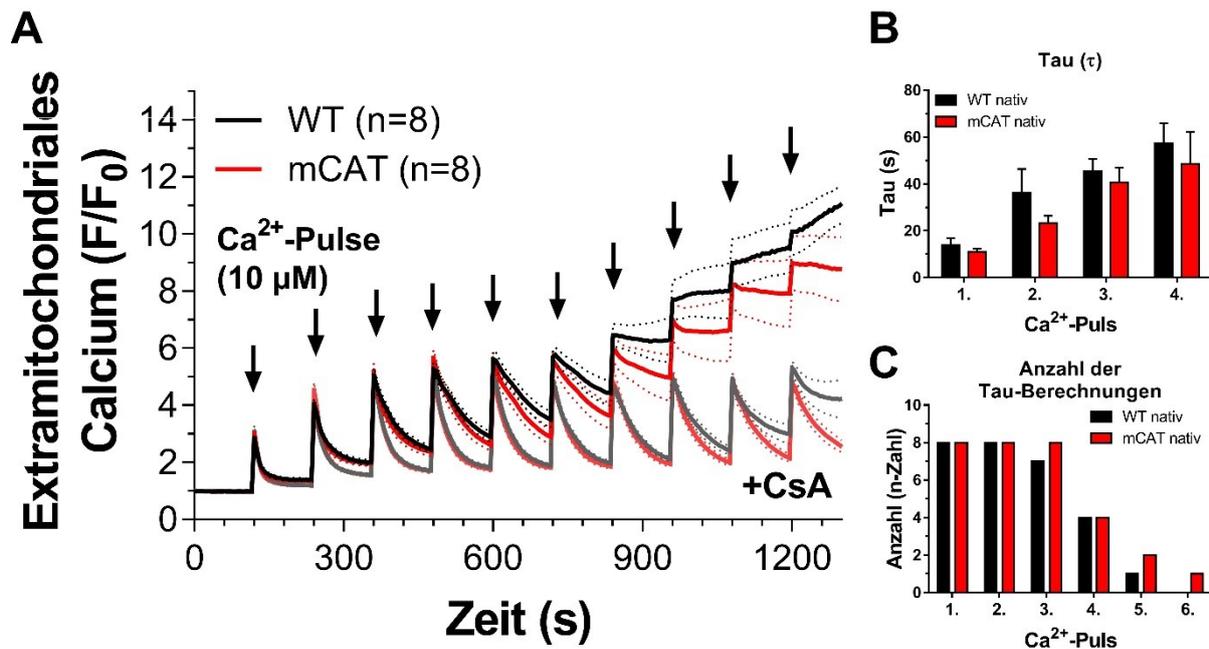


Abbildung 17: PTP-Assay an nativen und Cyclosporin A behandelten mCAT-Mitochondrien

An isolierten kardialen Mitochondrien wurde nach photometrischer Proteinbestimmung ein PTP-Assay mit dem Farbstoff Calcium Green-5N durchgeführt. Während des Messprotokolls wurden alle 120 s 10 μ M Calciumpulse (schwarze Pfeile) appliziert. **A**, Das relative Fluoreszenzsignal (F/F_0) des Farbstoffs stellt über die Zeit extramitochondriale Calciumkonzentrationen nativer und Cyclosporin A behandelter Mitochondrien dar. **B**, Zur Beschreibung der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme nativer Mitochondrien wurde für jeden einzelnen Calciumpuls eine Zeitkonstante, Tau (s), in Analogie zu einem exponentiellen Zerfall berechnet. **C**, Anzahl der nativen Mitochondrienproben (n-Zahl), bei denen für die entsprechenden Calciumpulse eine exakte mathematische Kalkulation von Tau durchgeführt werden konnte. Abkürzungen: μ M, Mikromolar; Ca^{2+} , ionisiertes Calcium; CsA, Cyclosporin A; F/F_0 , relatives Fluoreszenzsignal; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; s, Sekunde; WT, Wildtyp; τ , Tau. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der verwendeten Mäuseherzen an.

Bei zunehmender Zahl der Calciumpulse zeigte sich, dass Tau sukzessiv größer (Abbildung 17A und 17B) und damit die Calciumaufnahme der nativen mCAT- und WT-Mitochondrien langsamer wurde, ohne sich signifikant zu unterscheiden (1. Ca^{2+} -Puls: Tau WT \approx 13,99 s; Tau mCAT \approx 11,01 s; 4. Ca^{2+} -Puls: Tau WT \approx 57,46 s; Tau mCAT \approx 48,59 s). Gleichzeitig konnten für jede einzelne Mitochondrienprobe (n-Zahl) beider Versuchsgruppen immer weniger exakte mathematische Berechnungen von Tau im Verlauf des Experiments durchgeführt werden (1. Ca^{2+} -Puls: für alle mCAT- und WT-Datensätze; 4. Ca^{2+} -Puls: für die Hälfte aller mCAT- und WT-Datensätze [Abbildung 17C]). Denn bei vermehrter Zufuhr von Calcium konnte beobachtet werden, dass sich die anfänglich exponentiell verlaufende Kinetik der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme allmählich einem linearen Prozess annäherte und mit Erreichen der Calciumretentionskapazität die mitochondriale Akkumulation von Ca^{2+} stagnierte (Abbildung 17A). In

etwa zum gleichen Zeitpunkt wurde diese bei den nativen mCAT- und WT-Mitochondrien zwischen dem siebten und achten Calciumpuls überschritten. Dagegen verhinderte CsA als Positivkontrolle die Öffnung der PTP und begünstigte darüber hinaus eine rasch verlaufende Calciumaufnahme der Mitochondrien jenseits der physiologischen Retentionskapazität.

Unter exogener Zugabe von ROS konnte bei mit 100 μM H_2O_2 behandelten WT-Mitochondrien ein früheres Öffnen der PTP im Vergleich zur nativen Kontrolle beobachtet werden (etwa ein Calciumpuls früher [Abbildung 18A]). Der Unterschied zwischen H_2O_2 exponierter und nativer WT-Mitochondrien aggravierte sich unter der 200 μM H_2O_2 -Bedingung (etwa zwei Calciumpulse früher [Abbildung 18C]). Dagegen zeigten Mitochondrien von mCAT-Mäusen keinen deutlichen Unterschied zwischen den H_2O_2 -haltigen und nativen Versuchsansätzen (Abbildung 18B und 18D). Im direkten Vergleich beider Genotypen wurden bei der Tau-Berechnung tendenziell kleinere Zeitspannen (schnellere Ca^{2+} -Aufnahme) für die mit H_2O_2 behandelten mCAT-Mitochondrien kalkuliert (Abbildung 18E und 18G). Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings nur bei 200 μM H_2O_2 für den dritten applizierten Calciumpuls gezeigt werden (Tau WT $\approx 77,99$ s; Tau mCAT $\approx 39,00$ s). Des Weiteren konnten ebenfalls weniger Tau-Berechnungen an den einzelnen H_2O_2 -Messungen für die im Experiment später applizierten Calciumpulse durchgeführt werden (Abbildung 18F und 18H). Hierbei zeigte sich anhand der n-Zahlen der Tau-Berechnungen, dass bei beiden H_2O_2 -Bedingungen die mCAT-Mitochondrienproben tendenziell länger eine exponentielle Ca^{2+} -Aufnahme bei exzessiver Ca^{2+} -Zufuhr aufwiesen (z.B. 4. Ca^{2+} -Puls bei 200 μM H_2O_2 : WT n-Zahl = 1; mCAT n-Zahl = 5).

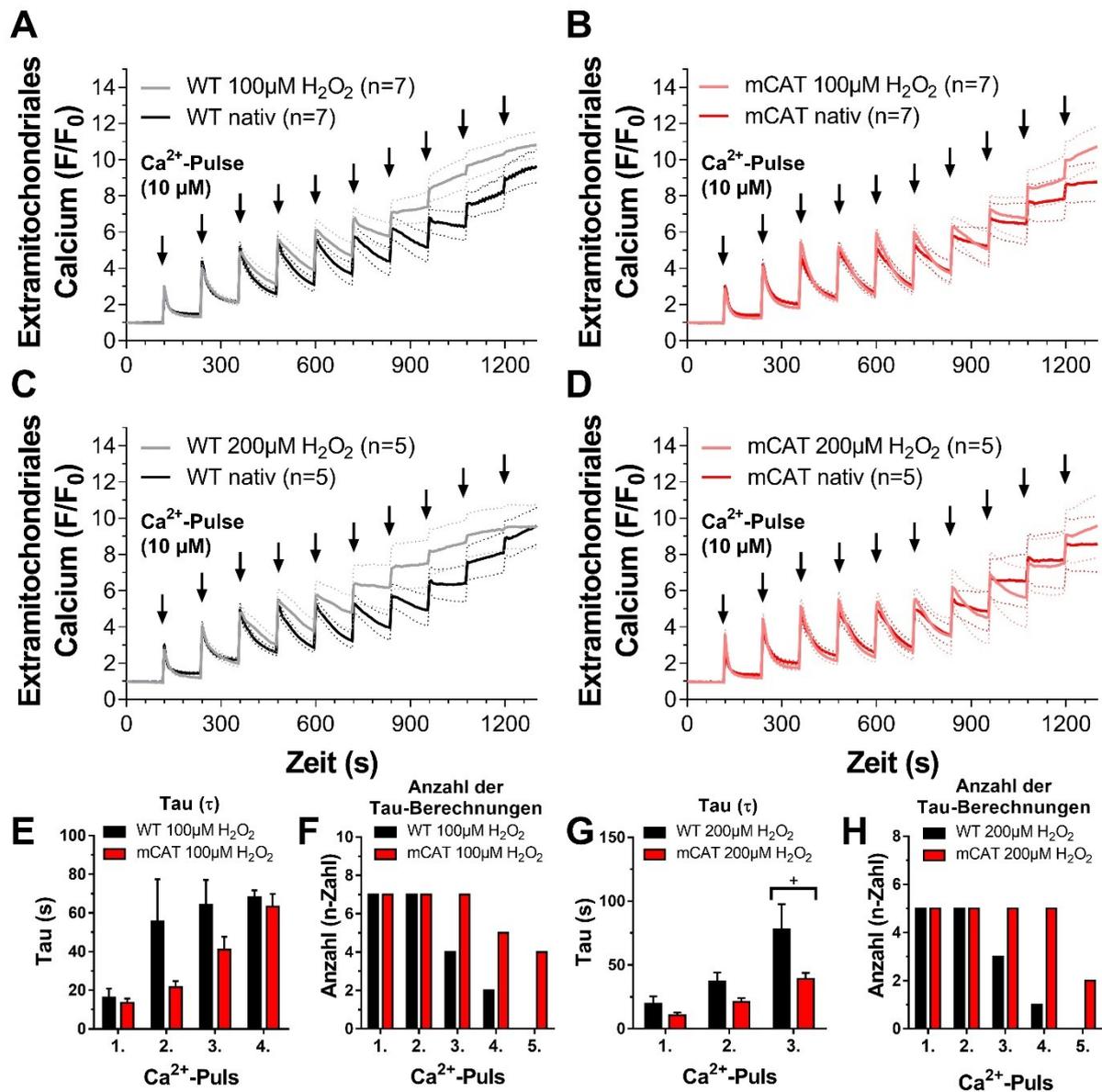


Abbildung 18: PTP-Assay an nativen und H₂O₂ behandelten Mitochondrien

An isolierten kardialen Mitochondrien wurde nach photometrischer Proteinbestimmung ein PTP-Assay mit dem Farbstoff Calcium Green-5N durchgeführt. Während des Messprotokolls wurden alle 120 s 10 µM Calciumpulse (schwarze Pfeile) appliziert. **A-D**, Das relative Fluoreszenzsignal (F/F₀) des Farbstoffs stellt über die Zeit extramitochondriale Calciumkonzentrationen nativer und H₂O₂ behandelter Mitochondrien dar. **A**, WT nativ & 100 µM H₂O₂. **B**, mCAT nativ & 100 µM H₂O₂. **C**, WT nativ & 200 µM H₂O₂. **D**, mCAT nativ & 200 µM H₂O₂. **E, G**, Zur Beschreibung der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme wurde für jeden einzelnen Calciumpuls eine Zeitkonstante, Tau (s), in Analogie zu einem exponentiellen Zerfall berechnet (**E**, 100 µM H₂O₂; **G**, 200 µM H₂O₂). **F, H**, Anzahl der nativen Mitochondrienproben (n-Zahl), bei denen für die entsprechenden Calciumpulse eine exakte mathematische Kalkulation von Tau durchgeführt werden konnte (**F**, 100 µM H₂O₂; **H**, 200 µM H₂O₂). Abkürzungen: µM, Mikromolar; Ca²⁺, ionisiertes Calcium; F/F₀, relatives Fluoreszenzsignal; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; s, Sekunde; WT, Wildtyp; τ, Tau. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der verwendeten Mäuseherzen an; +p<0,05 (ungepaarter t-Test).

5.5 Intrazellulärer Redoxstatus nativer mCAT-Kardiomyozyten

In einem Stressprotokoll (siehe 4.6.1) wurde der Einfluss des zusätzlich im Mitochondrium lokalisierten redox-aktiven Enzyms Katalase (mCAT) hinsichtlich des Redoxstatus untersucht. Anhand der Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD wurde die Oxidationslage der Reduktionsäquivalenten bestimmt.

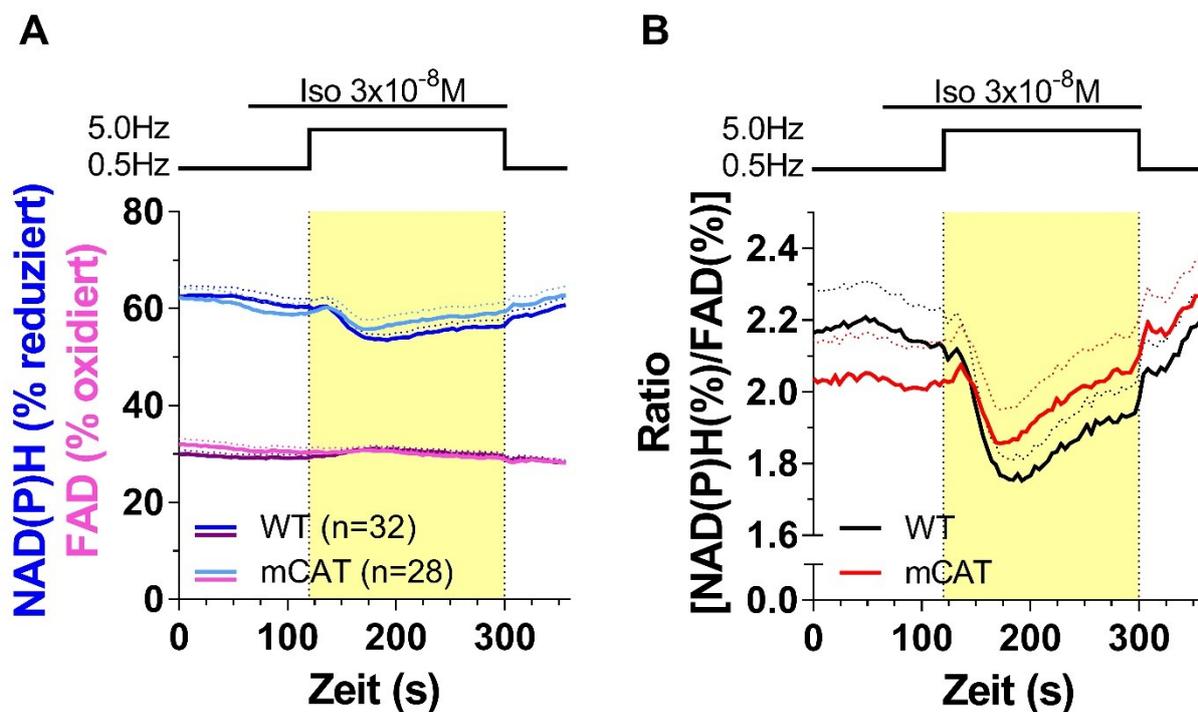


Abbildung 19: Redoxstatus isolierter mCAT-Kardiomyozyten

Anhand der Autofluoreszenzmoleküle NAD(P)H und FAD wurde der Redoxstatus von mCAT-Myozyten in einem Stressprotokoll mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach einer 0,5 Hz Stimulation dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin ausgesetzt und in einer 180 s langen Stressphase (gelbe Schattierung) bei 5 Hz elektrisch stimuliert. **A**, Prozentuale Angabe aller reduzierten NAD(P)H- und oxidierten FAD-Moleküle in der Zelle (Redoxstatus). **B**, Quotient aus NAD(P)H(%) und FAD(%) als Maß für die Reduktionslage der Zelle. Abkürzungen: FAD, oxidiertes Flavinadeninindinukleotid; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; M, Molar; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; NAD(P)H, reduziertes Nicotinamidadeninindinukleotid(phosphat); s, Sekunde; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an.

Weder bei der anfänglichen 0,5 Hz Stimulation noch bei der 5 Hz Stimulation unter Isoprenalin ergaben sich signifikante Unterschiede im Redoxstatus zwischen mCAT- und WT-Myozyten (Abbildung 19A). Zu Beginn lagen bei beiden Versuchsgruppen ca. 62% des Redoxpaars NAD(P)H/NAD(P)⁺ in der reduzierten Form vor, während der oxidierte Anteil des Redoxpaars FADH₂/FAD ca. 30% im WT und ca. 32% in der mCAT-Maus betrug. Nach Beginn der 5 Hz Stimulation fiel der prozentuale Anteil des

NAD(P)H ab (mCAT auf ca. 56%; WT auf ca. 54%), aber erreichte gegen Ende der 180 s langen Stimulation wieder den ungefähren Ausgangswert. Das oxidierte FAD verhielt sich gegensätzlich zu den Beobachtungen des reduzierten NAD(P)H. Auch im direkten Verhältnis von NAD(P)H zu FAD (Abbildung 19B) wurden im Verlauf des Stressprotokolls keine signifikanten Unterschiede zwischen mCAT- und WT-Kardiomyozyten gemessen.

5.5.1 Kontraktilität von nativen mCAT-Kardiomyozyten

Kontraktionsdaten von nativen mCAT- und WT-Myozyten wurden auf Unterschiede im Verlauf des NAD(P)H- und FAD-Stressprotokolls (siehe 4.6.1) untersucht. Neben der Kontraktilität wurden auch kontraktionskinetische Parameter (Time to peak, Relaxation time) zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Bedingungen verglichen (siehe 4.6.4) und in Abbildung 20 abgebildet.

Im Vergleich zur basalen Bedingung bei 0,5 Hz nahm in beiden Versuchsgruppen die Sarkomerlänge systolisch und diastolisch unter der 5 Hz Stimulation sowie Isoprenalin ab (Abbildung 20A). Die fraktionelle Sarkomerlängenverkürzung stieg in demselben Vergleich an (Abbildung 20B). Bei beiden Kontraktilitätsparametern ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mäusepopulationen.

Auch wurde kein signifikanter Unterschied bei den Relaxationszeiten (RT50% und RT90%) zwischen den zwei Versuchsgruppen beobachtet. Eine Stimulation bei 5 Hz sowie eine Exposition gegenüber Isoprenalin führte hier zu einer schnelleren diastolischen Relaxation der WT- und mCAT-Kardiomyozyten (Abbildung 20D). Nur der systolische Parameter „Time to peak“ wies in einer two-way-ANOVA einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und mCAT-Mäusen auf (Abbildung 20C).

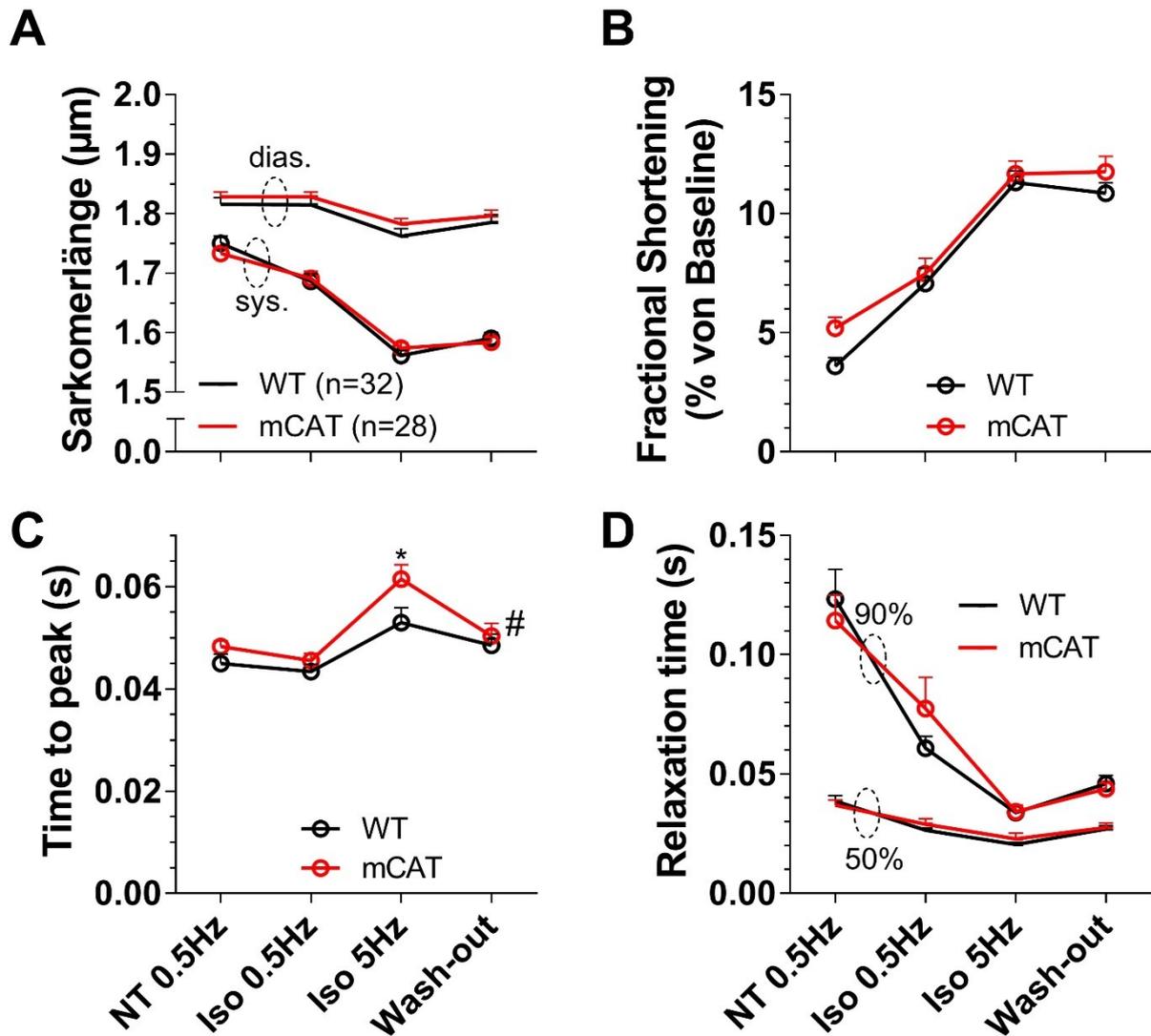


Abbildung 20: Kontraktilität von nativen mCAT-Kardiomyozyten

Kontraktionen von Kardiomyozyten wurden während der Fluoreszenzmessungen simultan über digitale Zellgeometrie analysiert. In Echtzeit konnte so die Sarkomerlänge der fokussierten Zelle kontinuierlich aufgezeichnet und anhand dieser Parameter der Kontraktilität (**A**, **B**) und Kontraktionskinetik (**C**, **D**) zu vier Messzeitpunkten (siehe 4.6.4) berechnet werden. **A**, diastolische und systolische Sarkomerlänge. **B**, Prozentuale systolische Sarkomerlängenverkürzung (Fractional Shortening) in Relation zur Diastole (Baseline). **C**, Zeitdifferenz bis zum Erreichen der maximalen Sarkomerverkürzung (Time to peak). **D**, Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% zur Baseline. Abkürzungen: µm, Mikrometer; dias., diastolisch; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; NT, Normaltyrode; s, Sekunde; sys., systolisch; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an; * $p < 0,05$ (Bonferroni Posttest) und # $p < 0,05$ (two-way ANOVA).

5.6 Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion in mCAT-Kardiomyozyten

Die in den Mitochondrien vorkommende Katalase der mCAT-Mäuse befindet sich direkt an der Hauptquelle der zellulären ROS-Produktion (Balaban et al., 2005^[10]; Murphy, 2009^[128]; Nickel et al., 2015^[132]). Der antioxidative Effekt dieses zusätzlichen Enzyms konnte mithilfe des generellen ROS-Indikators DCF (Dikalov et al., 2007^[44]) untersucht werden.

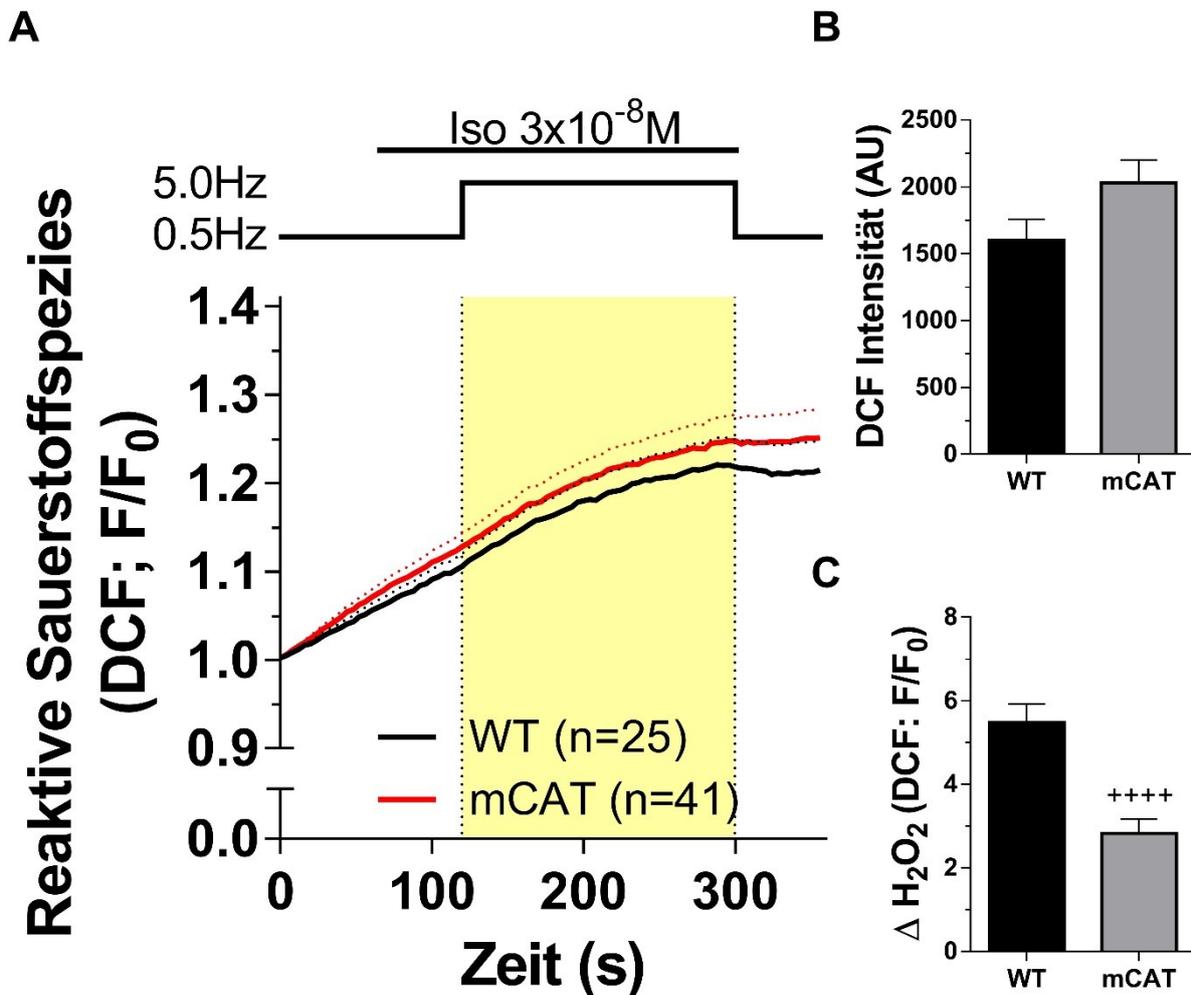


Abbildung 21: Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion in mCAT-Kardiomyozyten

Anhand des oxidationsempfindlichen Farbstoffs DCF wurden in einem Stressprotokoll mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops reaktive Sauerstoffspezies in Myozyten detektiert. Dazu wurden die Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit DCF bei 0,5 Hz stimuliert, dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin exponiert und in einer 180s langen Stressphase (gelbe Schattierung) bei 5 Hz elektrisch erregt. **A**, Das relative Fluoreszenzsignal (F/F_0) des Farbstoffs DCF stellt die anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies über die Zeit dar. **B**, DCF-Anfangsintensität. **C**, Steigung des H_2O_2 -getriggerten Anstiegs (ΔH_2O_2) des relativen Fluoreszenzsignals (F/F_0) bei exogener Zugabe von Wasserstoffperoxid am Ende des Messprotokolls. Abkürzungen: AU, (engl.) arbitrary unit; DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; F/F_0 , relatives Fluoreszenzsignal; H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; M, Molar; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; s, Sekunde; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an; ++++ $p < 0,0001$ (ungepaarter t-Test).

Bei beiden Versuchsgruppen stieg das intrazelluläre ROS-Signal im Verlauf des Stressprotokolls um etwa 20% an (Abbildung 21A). Ein signifikanter Unterschied zwischen F/F_0 beider Mäusepopulationen und damit der endogenen ROS-Produktion blieb aber aus. Bei gleicher Farbstoffbeladung (DCF Intensität) der Zellen wurde bei exogener Zugabe von H_2O_2 am Ende des Protokolls ein signifikanter Unterschied des H_2O_2 -getriggerten Anstiegs von F/F_0 beobachtet (Abbildung 21C). Dies weist auf eine vermehrte Katalase vermittelte Elimination von H_2O_2 hin, die die H_2O_2 -vermittelte Oxidation von DCF verhindern konnte.

5.7 Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion unter dem Ca^{2+} -Sensitizer EMD

Anhand des Farbstoffs DCF wurde der Einfluss des Ca^{2+} -Sensitizers EMD 57033 auf die zelluläre ROS-Produktion und damit auch verbunden auf die mitochondriale Bioenergetik an mCAT- und WT-Mäusen untersucht.

5.7.1 Kontraktilität von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten

Die Wirkung des Pharmakons konnte sowohl bei der WT- als auch bei der mCAT-Maus gezeigt werden. Nach Einwaschen des EMD nahmen die diastolische und systolische Sarkomerlänge im weiteren Verlauf des Messprotokolls in beiden Versuchsgruppen signifikant zur DMSO-Kontrollbedingung ab (Abbildung 22A und 22B). Der gleiche inotrope Effekt konnte auch in der prozentualen Sarkomerlängenverkürzung beobachtet werden (Abbildung 22C und 22D). Diese nahm nach Hinzugabe von EMD bei der WT- und mCAT-Maus im Vergleich zum „Fractional Shortening“ der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant zu.

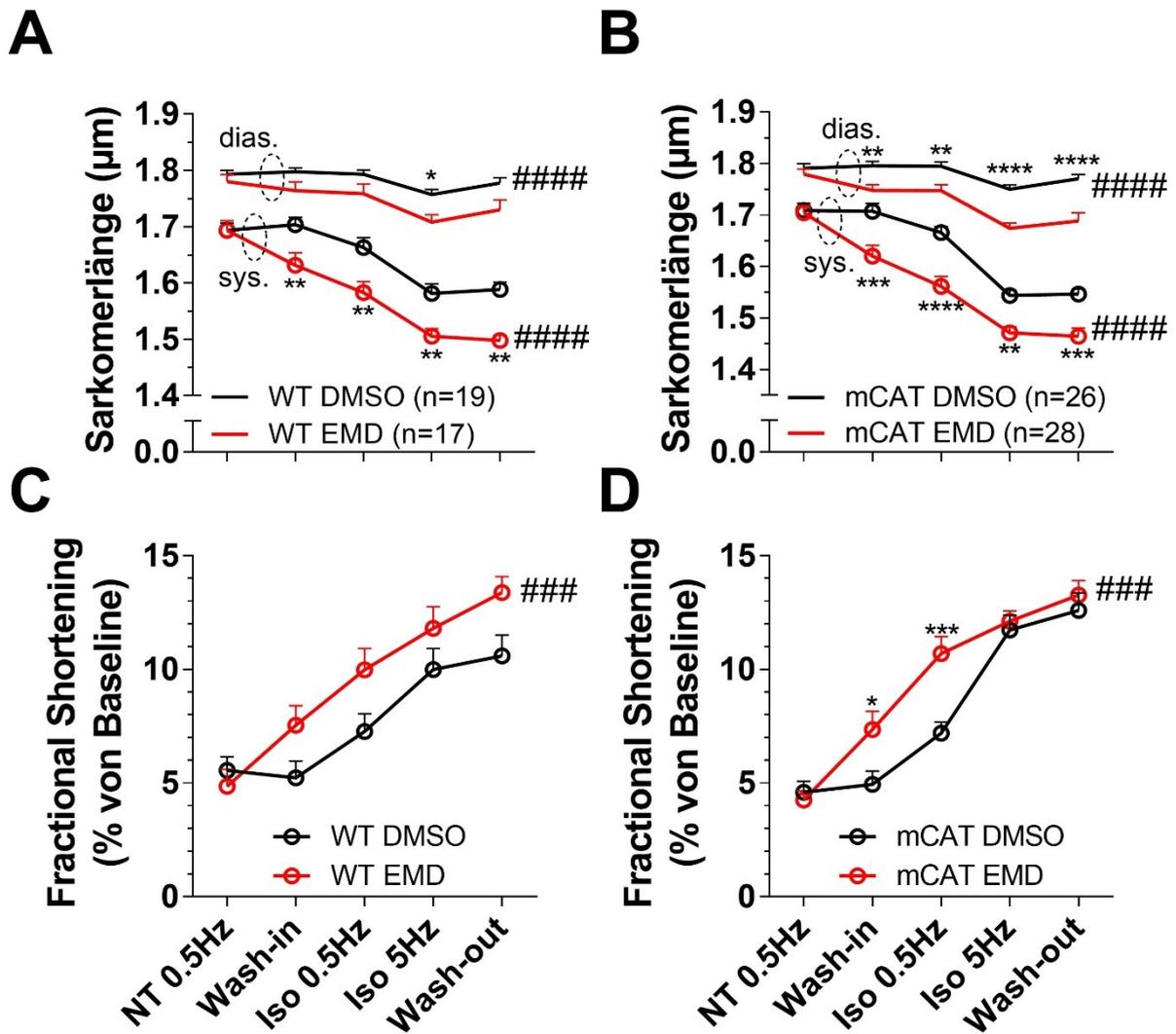


Abbildung 22: Kontraktilität von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten

Kontraktionen von Kardiomyozyten wurden während der Fluoreszenzmessungen simultan über digitale Zellgeometrie analysiert. In Echtzeit konnte so die Sarkomerlänge der fokussierten Zelle kontinuierlich aufgezeichnet und anhand dieser Kontraktilitätsparameter zu fünf Messzeitpunkten (siehe 4.6.4) berechnet werden. **A, B**, diastolische und systolische Sarkomerlänge des WT (**A**) und der mCAT-Maus (**B**). **C, D**, Prozentuale systolische Sarkomerlängenverkürzung (Fractional Shortening) in Relation zur Diastole (Baseline) [WT (**C**); mCAT (**D**)]. Abkürzungen: μm , Mikrometer; dias., diastolisch; DMSO, Dimethylsulfoxid; EMD, ein Calcium-Sensitizer; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; NT, Normaltyrode; sys., systolisch; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Bonferroni Posttest) und #### $p < 0.001$, ##### $p < 0.0001$ (two-way ANOVA).

Eine ähnliche Beobachtung zeigte sich bei den kontraktionskinetischen Parametern. Zwischen den EMD- und DMSO-Bedingungen wurde in beiden Genotypen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des systolischen Parameters „Time to peak“ in einer two-way-ANOVA festgestellt (siehe Abbildung 23A und 23B). Hierbei war die Zeit-

spanne bis zur maximalen Kontraktion der Kardiomyozyten in beiden EMD-Versuchsgruppen (WT und mCAT) verlängert (z.B. „Wash-in“; TTP: WT DMSO \approx 0,045 s; WT EMD \approx 0,056 s).

Diastolisch konnte zwischen den EMD- und DMSO-Versuchsgruppen beider Mäusepopulationen ebenfalls ein signifikanter Unterschied bei der RT50% im gleichen statistischen Test beobachtet werden, während dieser bei der RT90% ausblieb.

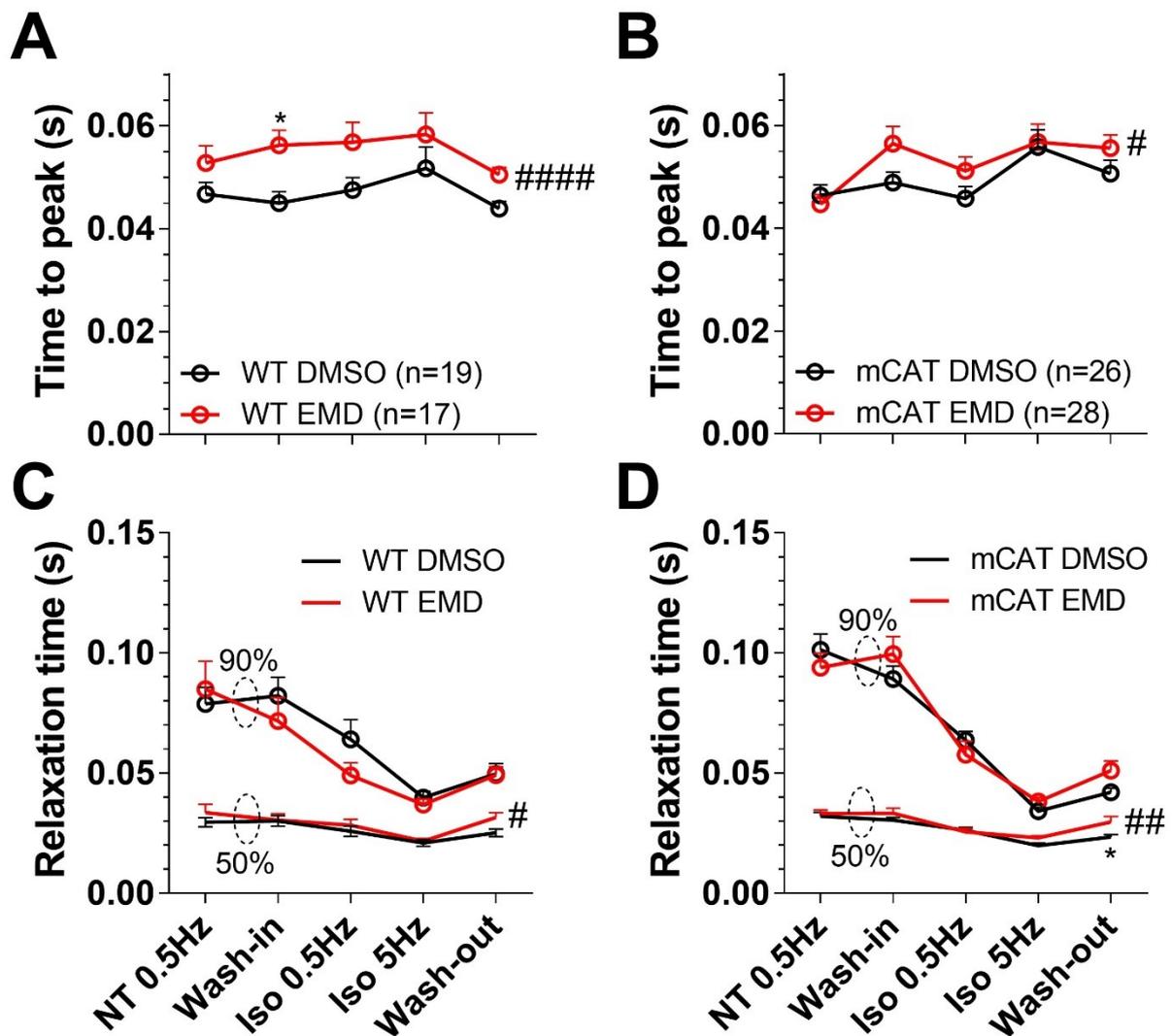


Abbildung 23: Kontraktionskinetik von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten

Kontraktionen von Kardiomyozyten wurden während der Fluoreszenzmessungen simultan über digitale Zellgeometrie analysiert. In Echtzeit konnte so die Sarkomerlänge der fokussierten Zelle kontinuierlich aufgezeichnet und anhand dieser Parameter der Kontraktionskinetik zu fünf Messzeitpunkten (siehe 4.6.4) berechnet werden. **A, B**, Zeitdifferenz bis zum Erreichen der maximalen Sarkomerverkürzung (Time to peak) des WT (**A**) und der mCAT-Maus (**B**). **C, D**, Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% zur Baseline [WT (**C**); mCAT (**D**)]. Abkürzungen: DMSO, Dimethylsulfoxid; EMD, ein Calcium-Sensitizer; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; NT, Normaltyrode; s, Sekunde; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an; * $p < 0.05$, (Bonferroni Posttest) und # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ##### $p < 0.0001$ (two-way ANOVA).

5.7.2 ROS-Produktion in Kardiomyozyten unter EMD

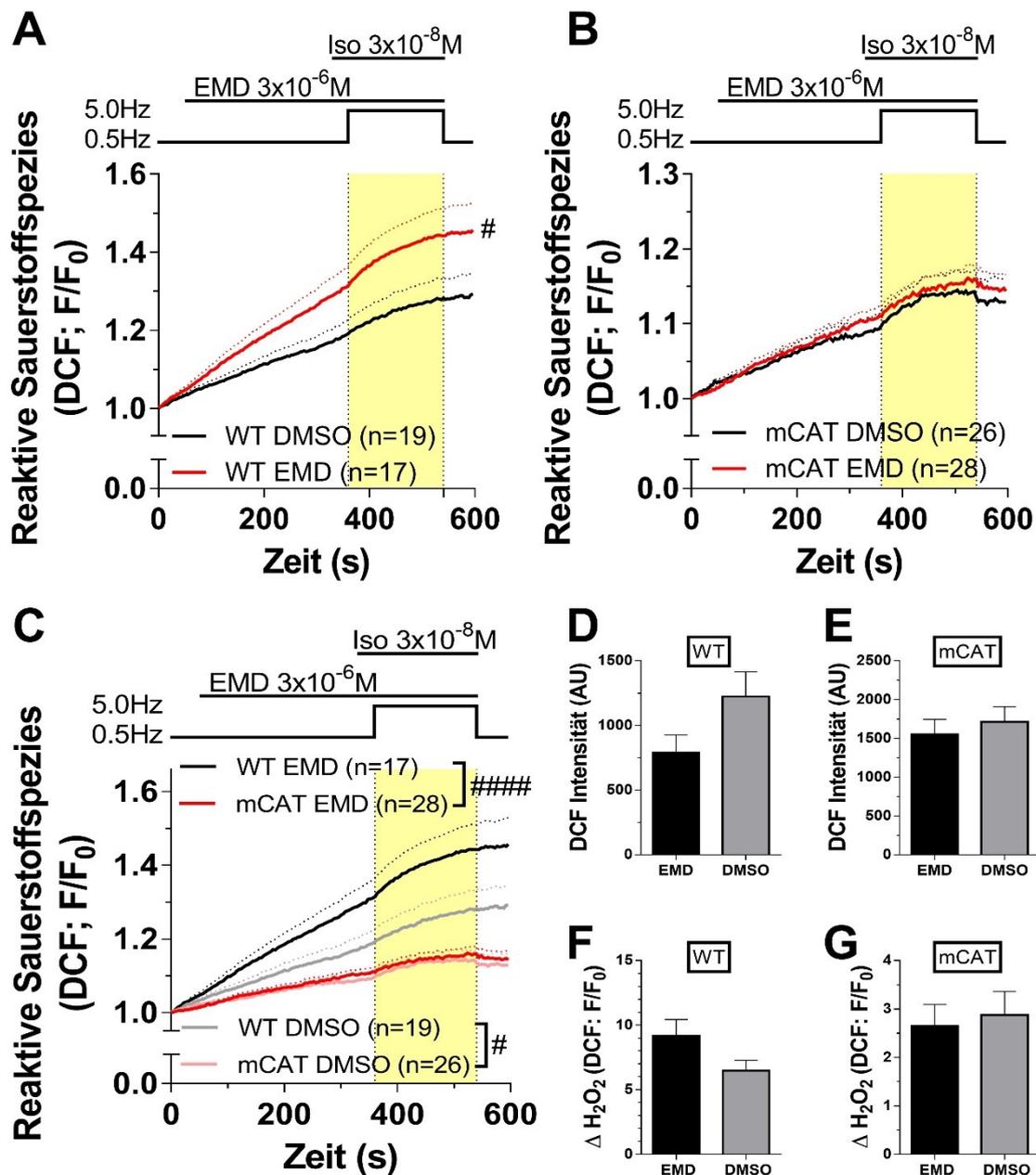


Abbildung 24: Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion unter dem Calcium-Sensitizer EMD

Anhand des oxidationsempfindlichen Farbstoffs DCF wurden in einem Stressprotokoll unter EMD-Inkubation ROS in mCAT- und WT-Kardiomyozyten detektiert. Dazu wurden die Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit DCF bei 0,5 Hz stimuliert, dem β -adrenergen Agonisten Isoprenalin exponiert und in einer 180s langen Stressphase (gelbe Schattierung) bei 5 Hz elektrisch erregt. Vor Applikation des Isoprenalins wurde mit EMD über 300s und während des restlichen Protokolls inkubiert (DMSO als Kontrolle). **A, B, C**, Das relative Fluoreszenzsignal (F/F_0) des Farbstoffs DCF stellt die anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies des WT (**A**) und der mCAT-Maus (**B**) dar. **D, E**, DCF-Anfangsintensität des WT (**D**) und der mCAT-Maus (**E**). **F, G**, Steigung des H_2O_2 -getriggerten Anstiegs (ΔH_2O_2) des relativen Fluoreszenzsignals (F/F_0) bei exogener Zugabe von Wasserstoffperoxid am Ende des Messprotokolls WT [**F**]; mCAT [**G**]. Abkürzungen: AU, (engl.) arbitrary unit; DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; DMSO, Dimethylsulfoxid; EMD, ein Calcium-Sensitizer; F/F_0 , relatives Fluoreszenzsignal; H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; Hz, Hertz; Iso, Isoprenalin; M, Molar; mCAT, (engl.) catalase located in mitochondria; s, Sekunde; WT, Wildtyp. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n-Zahlen geben die Anzahl der gemessenen Kardiomyozyten an; # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ (two-way ANOVA).

Beim Einwaschen des EMD stieg in der WT-Versuchsgruppe das relative Fluoreszenzsignal des Farbstoffs DCF gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant an (Abbildung 24A). Während hierbei F/F_0 bei den mit EMD behandelten WT-Kardiomyozyten um ca. 46% zunahm, stieg in der dazugehörigen Referenzgruppe das Signal im Verlauf des Stressprotokolls um ca. 29% an. Darüber hinaus wurde bei den WT-Mäusen die Diskrepanz zwischen der EMD-Versuchsgruppe und der DMSO-Kontrollbedingung innerhalb der 5 Hz Stimulationsphase kontinuierlich größer (Differenz beider Kurven: bei 360 s [zu Beginn der 5 Hz] \approx 12%; bei 540 s [am Ende der 5 Hz] \approx 16%). Im Gegensatz dazu war bei den mCAT-Kardiomyozyten kein signifikanter Unterschied in der ROS-Produktion zwischen der EMD- und DMSO-Bedingung zu erkennen (Abbildung 24B). Hier stieg das relative Fluoreszenzsignal im Verlauf des Protokolls um ca. 14% in der EMD-Versuchsgruppe und um ca. 13% in der DMSO-Kontrollgruppe an. Bei der Gegenüberstellung der Genotypen (Abbildung 24C) zeigte sich, dass die mit EMD behandelten mCAT-Kardiomyozyten im Vergleich zu den WT-Tieren signifikant weniger reaktive Sauerstoffspezies im Laufe des Stressprotokolls produzierten. Die beiden Kontrollgruppen, die dem organischen Lösungsmittel DMSO ausgesetzt waren, wiesen auch einen signifikanten Unterschied in einer two-way ANOVA auf, wobei die mCAT-Mäuse ebenfalls hier eine geringere zelluläre ROS-Produktion zeigten. Diese Beobachtungen wurden bei gleicher kardiomyozytärer Farbstoffbeladung (DCF Intensität) in beiden Genotypen zwischen den einzelnen EMD- und DMSO-Bedingungen angestellt. Auch bei dem durch exogenes H_2O_2 ausgelösten Anstieg des relativen Fluoreszenzsignals ergab sich weder im WT noch in der mCAT-Maus ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EMD oder DMSO behandelten Kardiomyozyten.

6 Diskussion

Im Jahr 2007 konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine ca. 50-fach erhöhte, Kompartiment-unspezifische Katalase-Überexpression im Herzen albinotischer FVB-Mäuse zu einer dreimonatigen Verlängerung der Lebensspanne führt (Wu et al., 2007^[189]). Bei vergleichbarer Lebenserwartung der FVB-, pCAT- und mCAT-Mäuse (Schriner et al., 2005^[156]; Wu et al., 2007^[189]) stimmt dieses Ergebnis vorrangig mit der von Schriner et al. beobachteten Verlängerung der mittleren Lebensspanne in pCAT-Mäusen überein (Schriner et al., 2005^[156]). Im Gegensatz dazu zeigte die von Rabinovitch et al. konzipierte mCAT-Mauslinie 4403, die spezifisch das antioxidative Enzym Katalase in Mitochondrien von Herz- und Skelettmuskelzellen überexprimiert, bei vergleichbarem Expressionsspiegel des H₂O₂-eliminierenden Enzyms (50-fach) einen Anstieg der mittleren Lebensspanne um 4,5 Monate (Schriner et al., 2005^[156]). Darüber hinaus führte eine zusätzlich mitochondriale Katalase-Expression im Gehirn der auch für diese Arbeit verwendeten mCAT-Mäuse der Linie 4033 zu einer Verlängerung der mittleren Lebensspanne um 5,5 Monate (Schriner et al., 2005^[156]). In der Zusammenschau der hier erwähnten Überlebenszeitstudien deutet all dies auf eine besonders vorteilhafte subzelluläre Lokalisation der Katalase im Mitochondrium hin und könnte somit für einen zusätzlichen Benefit in Bezug auf das Gesamtüberleben sprechen.

Da insbesondere im Alter eine progressive mitochondriale Dysfunktion zu vermehrtem oxidativen Stress führt (Gonzalez-Freire et al., 2015^[58]; López-Lluch et al., 2015^[102]) und dementsprechend Dai et al. bereits positive Effekte der mCAT im kardialen Alterungsprozess beobachten konnten (Dai et al., 2009^[34]), wurde in dieser Arbeit vor allem der Fokus auf die kardiomyozytäre Physiologie und Pathophysiologie junger, adulter mCAT-Mäuse gelegt.

Bei den funktionellen ROS-Messungen an isolierten Mitochondrien zeigten die mCAT-Mäuse gegenüber den WT-Kontrollen tendenziell eine geringere Superoxid- und Wasserstoffperoxidproduktion. Das an allen isolierten Mitochondrien eingesetzte Komplex I-Substrat Pyruvat/Malat (Chen et al., 2003^[29]) induziert wie andere Substrate der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase einen vorwärts verlaufenden Elektronentransport entlang der Atmungskette, welcher ebenfalls in vivo physiologisch vorkommt (Aon et al., 2010^[6]; Chen et al., 2003^[29]). Wie auch zuvor in der Literatur beschrieben (Aon et al., 2010^[6]; Chen et al., 2003^[29]; Zorov et al., 2014^[200]) konnte Antimycin A, das eine exzessive Formation an $\cdot\text{O}_2^-$ am Q_o-Zentrum des Komplex III induziert (Chen & Zweier,

2014^[31]; Murphy, 2009^[128]), zu einer deutlich vermehrten ROS-Produktion im Vergleich zu den übrigen Versuchsbedingungen führen und somit als Positivkontrolle die ROS-Experimente validieren (siehe Abbildung 15 und 16). Während ein mildes Entkoppeln der ETC an isolierten Mitochondrien eine Verringerung der ROS-Produktion verursachen kann (Aon et al., 2010^[6]; Murphy, 2009^[128]), äußerte sich die Behandlung mit 250 μM DNP in einer tendenziell erhöhten $\cdot\text{O}_2^-$ - und H_2O_2 -Generation. Dies spricht am ehesten dafür, dass die hier verwendete Konzentration des Entkopplers einen maximalen Elektronenfluss entlang der Atmungskette provozieren konnte (Brand & Nicholls, 2011^[21]) und aufgrund der damit verbundenen starken Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus vermehrt ROS anfielen.

Bei den State 3-Bedingungen wurde ein verminderter Anfall von ROS im Vergleich zur Produktionsleistung bei extremer Reduktion (State 2/PM) und extremer Oxidation (DNP) des Redoxmilieus beobachtet. Damit stehen jene Ergebnisse im Einklang mit der von Aon et al. postulierten Hypothese des „redox-optimierten ROS-Gleichgewichts“ (siehe Abbildung 25), die den komplexen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen ROS-Produktion und dem intrazellulären bzw. mitochondrialen Redoxmilieu sowie Redoxstatus mithilfe einer U-förmigen Funktion beschreibt (Aon et al., 2010^[6]; Cortassa et al., 2014^[33]; Nickel et al., 2014^[131]). In diesem Kontext unterstreichen ebenfalls die Quotienten aus ROS-Produktion und respiratorischem Sauerstoffverbrauch, dass sich im Zuge der Evolution Mitochondrien darauf spezialisiert haben, bei maximalem Energie-Output minimale Mengen an ROS zu generieren (Aon et al., 2010^[6]; Cortassa et al., 2014^[33]). So verdeutlicht Abbildung 15B beispielsweise in Übereinstimmung mit der bekannten Größenordnung aus der Literatur (Kembro et al., 2013^[77]; Münzel et al., 2015^[126]), dass physiologisch nur ein geringer Prozentsatz an Elektronen an der Atmungskette aberrant auf O_2 überspringt und demnach nur 0,2-2% $\cdot\text{O}_2^-$ pro O_2 -Molekül unter State 3- Bedingungen entsteht.

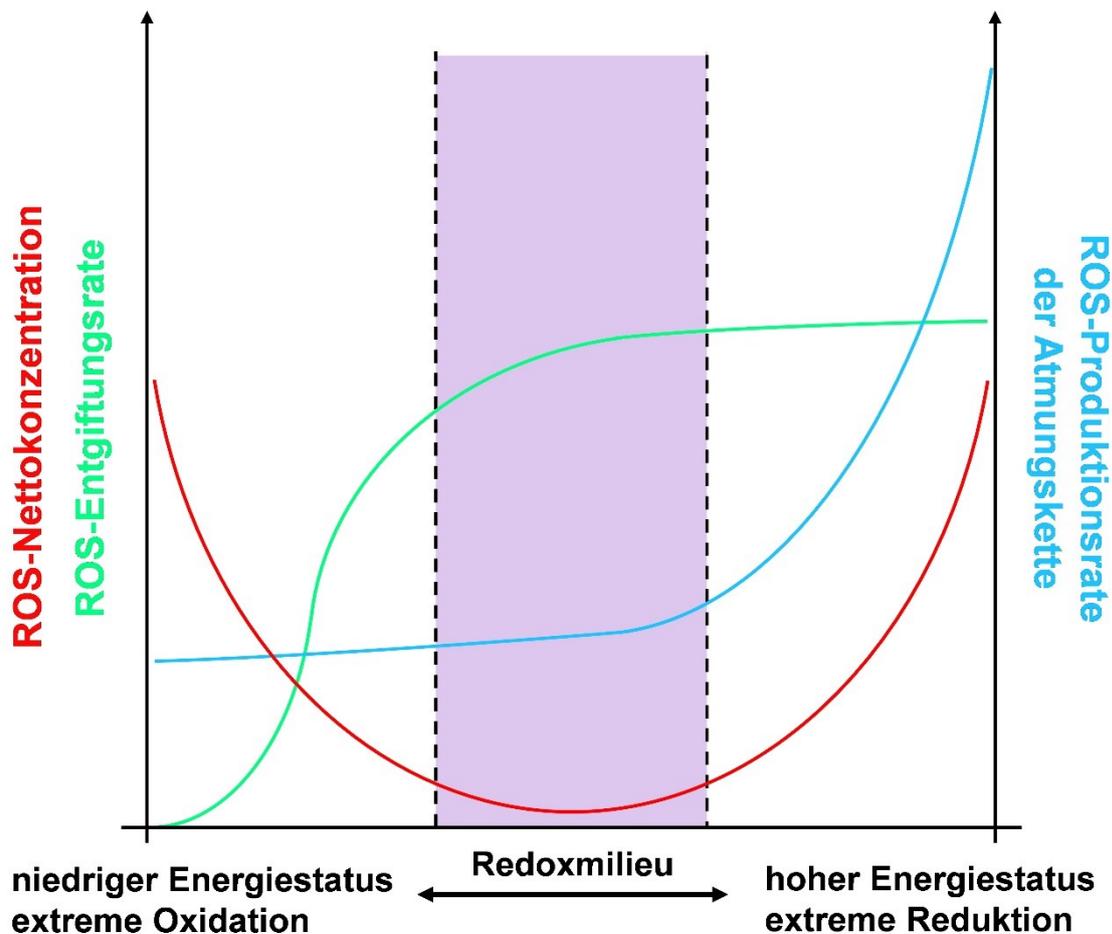


Abbildung 25: Das redox-optimierte ROS-Gleichgewicht

Die Hypothese des „redox-optimierten ROS-Gleichgewichts“ von Aon et al. führt zelluläre ROS-Disbalancen auf Schwankungen des intrazellulären Energiestatus und Redoxmilieus zurück. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die Mitochondrien hierbei in einer intermediären Redoxlage (lila gekennzeichnetes Areal), bei der ROS lediglich in minimalen Mengen anfallen und auch nur dann physiologische Signalfunktionen übernehmen. Beim Verlassen des intermediären Redoxstatus kommt es sowohl bei extremer Reduktion als auch bei extremer Oxidation zu einem vermehrten Anfall von ROS. Abkürzungen: ROS, reaktive Sauerstoffspezies; (Abbildung modifiziert nach Aon et al., 2010^[6]).

Allerdings scheinen die beobachteten Differenzen zwischen den jungen mCAT- und WT-Mäusen bei den hier isoliert betrachteten ROS ($\cdot\text{O}_2^-$ und H_2O_2) physiologisch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Denn unter diesen Bedingungen verfügen die endogenen mitochondrialen Entgiftungssysteme wahrscheinlich über eine ausreichende Kapazität, um die entstehenden ROS effektiv zu eliminieren und den oxidativen Stress zu egalisieren. Des Weiteren zeigten sich bei der mitochondrialen Atmungsmessung, dem wichtigsten Maß der mitochondrialen Funktion (Brand & Nicholls, 2011^[21]), keine Diskrepanzen zwischen dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch beider Mäusepopulationen (siehe Abbildung 14). Das bei dieser Versuchsreihe beobachtete hohe „Respiratory Control Ratio“ (bei 1 mM ADP > 10) (Lanza & Nair,

2009^[93]) spricht für eine gut erhaltene mitochondriale Integrität (Lanza & Nair, 2009^[93]) sowie mitochondriale Funktion (Brand & Nicholls, 2011^[21]) und verleiht somit den hier durchgeführten Atmungsmessungen eine hohe Aussagekraft. Die hierbei verwendeten ADP-Konzentrationen korrelieren teilweise mit den in vivo gefundenen myokardialen ADP-Konzentrationen, die physiologisch in einem Bereich von 10-50 μM liegen und unter pathologischen Bedingungen erhöht (\sim 40-140 μM) zu sein scheinen (Balaban et al., 1986^[8]; He et al., 2007^[69]; Sequeira et al., 2015^[158]). Bei einer supraphysiologischen ADP-Konzentration von 1 mM konnte bei beiden Genotypen eine nahe am Maximum gelegene mitochondriale Atmung beobachtet werden. Einen Anhaltspunkt dafür liefert der etwa halb so hoch gemessene Sauerstoffverbrauch bei 30 μM ADP. Denn diese ADP-Konzentration liegt in der Nähe der für die oxidative Phosphorylierung bekannten Michaelis-Konstanten (\sim 10-30 μM) (Balaban et al., 1986^[8]; Chance & Williams, 1955^[25]) und stellt somit laut Definition diejenige Substratkonzentration dar, bei der eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Atmung erreicht wird (Kriegel & Schellenberger, 2007^[91], S. 122).

Im Unterschied zu den bei den mitochondrialen Atmungsmessungen üblicherweise verwendeten hohen Substratmengen (Brand & Nicholls, 2011^[21]) wird die freie ADP-Konzentration in intakten Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen vorrangig über das Kreatinkinase-Phosphokreatin-System auf einem niedrigen Niveau gehalten (Tian et al., 1997^[174]). Im Sinne eines Energie-Shuttles verbinden dabei das mitochondriale und das cytosolische Isoenzym der CK die unterschiedlichen subzellulären Orte der Energieproduktion und des Energiekonsums (Cortassa et al., 2006^[32]; Schlattner et al., 2006^[153]). Darüber hinaus sorgen sie auch neben einem hohen räumlich begrenzten ATP/ADP-Verhältnis in der näheren Umgebung von zellulären ATP-asen für eine hohe lokale ADP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix und können so die mitochondriale Energieproduktion an der F_1F_0 -ATPase stimulieren (Bottomley et al., 2013^[20]; Schlattner et al., 2006^[153]). Während bei einer erhöhten Arbeitslast der ATP-Umsatz der myofilamentären Myosin-ATPase um ein Vielfaches ansteigen kann und dementsprechend der ADP-Influx ins Mitochondrium parallel dazu gesteigert werden muss (Cortassa et al., 2006^[32]), kann das Herz all dies ohne großartige Schwankungen der ADP-, ATP- und PCr-Konzentrationen bewerkstelligen (Balaban, 2002^[9]). Auch dies gelingt den Kardiomyozyten mithilfe desselben Phosphorylierungssystems, welches im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung eine um

mindestens eine Größenordnung schnellere Reaktionskinetik besitzt und somit über eine gewisse CK-Reservekapazität verfügt (Tian et al., 1997^[174]; Weiss et al., 2005^[186]).

Aus beispielsweise diesem Grund besitzen alle an isolierten Mitochondrien durchgeführten Experimente gewisse Limitationen, denn definitionsgemäß fehlt den einzeln betrachteten Mitochondrien der Anschluss an das gesamtzelluläre Gefüge und damit die Möglichkeit an der intrazellulären Ionenhomöostase und dem intrazellulären Stoffwechsel teilzunehmen (Brand & Nicholls, 2011^[21]). Trotzdem eignen sich isolierte Mitochondrien aufgrund z.B. ihrer einfachen Zugänglichkeit, ihrer relativen Simplizität und ihrer fehlenden cytosolischen Störfaktoren hervorragend, um insbesondere mechanistische Fragestellungen zu klären (Brand & Nicholls, 2011^[21]). So konnten nämlich hier keine großen Unterschiede zwischen den mCAT- und WT-Mäusen beobachtet und damit ausgeschlossen werden, dass die Expression der mCAT in jungen Jahren dem mitochondrialen Gefüge weder besonders schadet noch einen Nutzen bringt. Dennoch besitzen In-vivo-Experimente eine größere physiologische Relevanz, da intakte Zellen angesichts ihrer subzellulären Integrität ihren intrazellulären Metabolismus aufrechterhalten können und somit ein eher störungsfreies zelluläres Milieu aufweisen (Brand & Nicholls, 2011^[21]).

Analog zu dem Ergebnis der Atmungsmessungen lieferten die in vivo durchgeführten NAD(P)H/FAD- und DCF-Messungen weitere Indizien dafür, dass unter physiologischen Bedingungen eine Steigerung der mitochondrialen antioxidativen Kapazität in Form der mCAT keine zusätzlichen Vorteile birgt. So wurden nämlich in dem NAD(P)H/FAD-Protokoll, sprich unter einer physiologischen Belastung sowie einer physiologischen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (ca. 1 mM freies Ca^{2+} (Lang & Murer, 2010^[92], S. 684)), keine Unterschiede zwischen dem Redoxstatus von WT- und mCAT-Kardiomyozyten beobachtet (siehe Abbildung 19). Hierbei kam es in Anwesenheit von Isoprenalin zu Beginn der 5 Hz-Stimulationsphase, also infolge einer abrupten Arbeitslasterrhöhung, zu einer initialen Oxidation der zellulären Reduktionsäquivalente (im Folgenden für NADH erklärt). Der damit verbundene als (engl.) „undershoot“ bezeichnete NADH-Konzentrationsabfall beruht auf einer beschleunigten mitochondrialen ATP-Synthese, die zum einen durch den plötzlich erhöhten Anfall von ADP aus der gesteigerten myofilamentären ATP-Hydrolyse ausgelöst wird und zum anderen aufgrund eines akzelerierten Elektronenflusses entlang der Atmungskette einen erhöhten NADH-Verbrauch zur Folge hat (Maack et al., 2006^[107]). Die hierzu gering verzögert

einsetzende Akkumulation von Ca^{2+} im Mitochondrium (Cortassa et al., 2006^[32]), die aus den bei der β -adrenergen 5 Hz-Stimulation vermehrt und hochamplitudig auftretenden cytosolischen Ca^{2+} -Transienten resultiert, führt in der anschließenden NADH-Erholungsphase (engl. recovery phase) zu einer Aktivierung des Citratzyklus und letztendlich zur Regeneration des NADH (Maack et al., 2006^[107]). Der nach plötzlichem Abfall der Arbeitslast (Verringerung der Stimulationsfrequenz) normalerweise beobachtbare überproportionale Anstieg der NADH-Konzentration (Maack et al., 2006^[107]) war bei den mCAT-Myozyten eher diskret zu erkennen, während er sich bei den WT-Kardiomyozyten nicht abzeichnete. Dieser sogenannte (engl.) „overshoot“ beruht ebenfalls auf einer durch die Arbeitslastreduzierung auftretenden transienten Imbalance des Energiemetabolismus (Cortassa et al., 2006^[32]; Maack et al., 2006^[107]). Sie wird durch eine plötzlich verminderte ADP-Verfügbarkeit im Mitochondrium, damit verbunden einer niedrigeren oxidativen Phosphorylierungsrate, also einer geringeren NADH-Oxidation, und einer gleichzeitig weiterhin erhöhten Ca^{2+} -abhängigen NADH-Regeneration (Krebs-Zyklus) ausgelöst (Cortassa et al., 2006^[32]; Maack et al., 2006^[107]).

Anhaltspunkte für eine durch die mCAT-Überexpression hervorgerufene zelluläre energetische Belastung wurden bei der hier verwendeten Mauslinie 4033 auch nicht gefunden. Eine solche tritt generell im Rahmen einer zusätzlichen Genexpression auf (Wagner, 2005^[180]) und wird durch den Strukturerhalt, die Transkription sowie die Translation transgener Nukleotidsequenzen bedingt (Lynch & Marinov, 2015^[106]). Basisty et al. lieferten in diesem Kontext erste Hinweise dafür, dass eine mCAT-Expression in jungen Jahren nicht unbedingt vorteilhaft sein muss, denn in 4 Monate alten mCAT-Mäusen konnte die Forscher eine gewisse Seneszenz des globalen kardialen sowie hepatischen Proteoms beobachten (siehe 2.8). Dennoch scheint die „transgene Mehrbelastung“ hier auf physiologisch funktioneller Ebene keine Rolle zu spielen, da beispielsweise neben dem zellulären Redoxstatus die simultan erhobenen Daten zur Kontraktilität und Kontraktionskinetik (siehe Abbildung 20) ebenfalls keine Diskrepanzen zwischen WT- und mCAT-Kardiomyozyten zeigten.

Andererseits konnte bereits an Mitofusin 2 defizienten Mäusen belegt werden, dass sowohl positive als auch negative Effekte der mCAT-Überexpression konzentrationsabhängig vermittelt werden (Song et al., 2014^[162]). Denn eine zu dem Mfn2-Knockout hinzukommende hohe mCAT-Expressionsrate konnte im Unterschied zu einer zehnfach niedrigeren nicht vor einer mitochondrialen Dysfunktion schützen, sondern führte

im Gegenteil zu einer Behinderung mitochondrialer Qualitätskontrollmechanismen (Mitophagie) (Song et al., 2014^[162]). Des Weiteren wurde schon im Jahr 1996 in einem Kompartiment-unspezifischen Katalase-Modell (FVB-Mäuse) beobachtet, dass ab einem 200-fach gesteigerten Aktivitätslevel eine herzspezifische Überexpression vor Doxorubicin induziertem oxidativen Stress nicht mehr schützen konnte, während sich bei moderat erhöhten Katalasespiegeln (z.B. 60-fach) die Überexpression als protektiv erwies (Kang et al., 1996^[73]). Auch laut Literatur (Basisty et al., 2016^[11]; Song et al., 2014^[162]) lässt sich aus alledem im Einklang mit der Theorie der „Mitohormesis“ schlussfolgern, dass Zellen auf eine gewisse Menge an reaktiven Sauerstoffspezies angewiesen sind, demzufolge eine mitochondriale ROS-Suppression ein therapeutisches Fenster besitzt und daher genauer Regulation bedarf.

Bei der Detektion von intrazellulären ROS in Kardiomyozyten (DCF-Versuchsreihe) zeigte sich in Kongruenz mit den Beobachtungen von Nickel et al. (Nickel et al., 2015^[132]) ein kontinuierlicher Anstieg des DCF-Signals und somit ein gesteigerter Anfall von ROS (siehe Abbildung 21), der sich im Verlauf des auch für die NAD(P)H/FAD-Messungen verwendeten Stressprotokolls und daher am ehesten infolge einer physiologischen Arbeitslasterhöhung manifestierte. Trotz zusätzlicher antioxidativer Enzymausstattung der mCAT-Kardiomyozyten blieb bei identischem Belastungsprofil zur WT-Kontrollgruppe ein Unterschied in der endogenen ROS-Produktion zwischen beiden Mäusepopulationen aus. Somit scheint die normale antioxidative Kapazität von Zelle und Mitochondrium ausreichend zu sein, um unter diesen Bedingungen die anfallenden ROS zu entgiften.

Da die Elimination von H_2O_2 im Mitochondrium vornehmlich durch die Enzyme Peroxiredoxin und Glutathion-Peroxidase gewährleistet wird und diese letztendlich NADPH-abhängig ist, liegt die Vermutung nahe, dass transiente Oszillationen des NAD(P)H/NAD(P)⁺-Verhältnisses, ergo des Redoxstatus, sich wie z.B. bei der hier beschriebenen Arbeitslaststeigerung in einer Beeinträchtigung der antioxidativen Kapazität der Matrix äußern können und folglich zu einer erhöhten H_2O_2 -Formation führen (Kohlhaas & Maack, 2010^[82]). Demnach korreliert faktisch die Konzentration des reduzierten NAD(P)H invers mit der ROS-Produktion im Mitochondrium (Kohlhaas & Maack, 2010^[82]). Hiermit stellt sich die Frage, ob dieser dargestellte Zusammenhang bei verschiedenen Spezies eine unterschiedliche Relevanz besitzt und womöglich die Feinadjustierung des mitochondrialen Redoxstatus bei Belastung in menschlichen Kardiomyozyten eine größere Bedeutung im Vergleich zu der von Mäusen hat. Denn

während die basale Herzfrequenz von Mäusen bei ca. 600 Schlägen pro Minute (engl. beats per minute/bpm) liegt und die Herzfrequenz unter Anstrengung maximal nur um das ca. 1,3- bis 1,5-fache gesteigert werden kann, schlägt das menschliche Herz basal mit einer Frequenz von ca. 70 bpm und kann neben einem 2- bis 3-fachen Frequenzanstieg eine 4- bis 6-fache Steigerung des HZV bewältigen (Kass et al., 1998^[75]; Kohlhaas et al., 2017^[86]). Damit weist dies auf ein größeres und variables Arbeitsspektrum des menschlichen Herzens hin und erfordert mutmaßlich daher im Vergleich zu Mäuseherzen eine höhere Genauigkeit der zellulären/mitochondrialen energetischen Adaptation (Kohlhaas et al., 2017^[86]). Des Weiteren erlangt vermutlich eine zusätzliche antioxidative Schutzvorrichtung im Alter einen höheren Stellenwert, da sich hier die physiologischen Funktionen und somit auch die ROS-Entgiftungsmechanismen der Zelle im Allgemeinen progressiv verschlechtern (Kirkwood, 2005^[79]; López-Lluch et al., 2015^[102]) und Kardiomyozyten infolgedessen eher von einer mCAT-Expression profitieren (Dai et al., 2009^[34]).

Bei Applikation von exogenem H₂O₂ (9,8 mM) zeigte sich allerdings ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen WT- und mCAT-Mäusen bezüglich des H₂O₂-getriggerten DCF-Fluoreszenzsignalanstiegs (Abbildung 21C: WT > mCAT). Dies deutet darauf hin, dass das Kollektiv der mCAT-Kardiomyozyten den exzessiven oxidativen Stress im Vergleich zu den WT-Myozyten erfolgreicher bewältigen konnte und folglich mCAT-Kardiomyozyten eine erhöhte antioxidative Kapazität besitzen. Diese gesteigerte H₂O₂-Eliminationsfähigkeit lässt sich trotz mosaikartigem kardialen mCAT-Expressionmuster vermutlich im Kontext einer Population von Zellen erklären, bei der eine gewisse Subpopulation durch Katalase-Überexpression exzessives membranpermeables H₂O₂ des Zellverbands entgiftet und sozusagen auch für ein konstantes ROS-Milieu in den nicht mCAT-exprimierenden Zellen sorgen kann (Schriner & Linford, 2006^[157]). Gerade aus diesem Grund unterstreicht das hier beschriebene Ergebnis insbesondere aufgrund der so hohen statistischen Signifikanz, dass zum einen ein großer Anteil der hier einzeln gemessenen Versuchszellen und/oder ihrer unmittelbar benachbarten Myozyten über die transgene humane Katalase verfügt haben muss und zum anderen die mCAT vor allem bei pathologischem oxidativen Stress vorteilhafte Effekte zeigt. Denn im Vergleich zu der hier verwendeten Wasserstoffperoxidkonzentration (9,8 mM) liegt die normalerweise in tierischen Zellen vorherrschende H₂O₂-Konzentration in einer Größenordnung von ca. 10⁻⁹ - 10⁻⁷ M (Chance et al., 1979^[26]; Oshino

et al., 1973^[137]). Dagegen entsprechen beispielsweise 100 μM H_2O_2 einem pathologischen oxidativen Stress, der innerhalb einer sechswöchiger Nachlasterhöhung durch eine TAC-Operation (engl. transverse aortic constriction) im Herzen einer C57BL/6N-Maus entsteht (Nickel et al., 2015^[132]).

Eine ähnliche Beobachtung zeichnete sich bereits bei den mitochondrialen PTP-Messungen ab, in denen sich ein Unterschied zwischen WT- und mCAT-Mitochondrien nur bei Applikation von exzessivem oxidativen Stress in Form von 100 μM und 200 μM H_2O_2 zeigte (siehe Abbildung 18), während im Gegensatz dazu die Calciumretentionskapazität beider Versuchsgruppen unter nativen Bedingungen nicht differierte (siehe Abbildung 17). Die durch das exogene H_2O_2 ausgelöste verfrühte PTP-Öffnung der WT-Mitochondrien bestätigt im Zusammenhang mit den aus den anderen Versuchsgruppen gewonnenen Daten die schon bekannte Suszeptibilität der PTP für ROS, die neben dem hauptsächlichen Stimulationsmechanismus, einer Ca^{2+} -Überladung des mitochondrialen Matrixraums, ebenso eine Rolle in der komplexen Regulation der Pore spielt (Feissner et al., 2009^[52]; Kowaltowski et al., 2001^[89]). Im Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen lässt sich auch aus dieser Versuchsreihe letztendlich schlussfolgern, dass unter physiologischen Bedingungen (in jungen Mäusen) das mitochondriale System für eine effiziente Energiegewinnung, Homöostase und Vermeidung von ROS ausgelegt ist und die erhöhte antioxidative Kapazität der mCAT hier deshalb nicht beanspruchen muss. Demgegenüber wirkt sich die mCAT am ehesten unter pathologischen Bedingungen positiv aus und kann unter diesen Gegebenheiten deletäre Folgen von ROS über eine zusätzliche ROS-Reduktion abmildern oder bis zu einem gewissen Grad verhindern.

Bei der pharmakologischen Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente mittels EMD 57033 äußerte sich die Wirkung des Inotropikums an den isolierten Kardiomyozyten in einer Steigerung der Kontraktilität (siehe 5.7.1). Hierbei konnte die bereits in der Literatur beschriebene (Kass & Solaro, 2006^[76]; Nagy et al., 2014^[129]; Perrone & Kaplinsky, 2005^[141]) Beeinträchtigung der diastolischen Relaxation, die sich nach Einwaschen des EMD in einer Abnahme der diastolischen Sarkomerlänge zeigte (siehe Abbildung 22A und 22B), verifiziert werden. Darüber hinaus zeichnete sich eine weitere vermutete Kehrseite einiger Calcium-Sensitizer, die Prolongation der Systole (Pollesello et al., 2016^[143]), an den mit EMD behandelten Myozyten in einer Verlängerung der „Time to peak“ ab (siehe Abbildung 23A und 23B). Interessanterweise wies die WT-Versuchsgruppe bei simultaner DCF-Fluoreszenzmessung unter EMD einen

signifikant höheren Anfall von ROS im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe auf (siehe Abbildung 24A). Im Gegensatz dazu konnte die mCAT-Maus unter EMD einen Anstieg des ROS-Signals im Verlauf des prolongierten Messprotokolls verhindern und zeigte demnach keinen Unterschied zur ROS-Produktion ihrer DMSO-Kontrollgruppe (siehe Abbildung 24B). Beim direkten Vergleich beider Genotypen konnte eine jeweils signifikant niedrigere ROS-Produktionsleistung in den mCAT-Kardiomyozyten im Vergleich zu den WT-Kardiomyozyten sowohl unter EMD als auch unter reinem DMSO festgestellt werden (siehe Abbildung 24C). Das unterschiedliche Ergebnis der Kontrollgruppen lässt sich am ehesten auf eine ebenfalls vermehrte ROS-Produktion unter dem organischen Lösungsmittel DMSO zurückführen, die möglicherweise durch die verlängerte Dauer des Experiments (zusätzliche 300 s lange Einwaschphase) und/oder den auf die Lipiddoppelschichten wirkenden destabilisierenden Effekt des DMSO (Gurtovenko & Anwar, 2007^[61]) ausgelöst wurde. Diese Hypothese wird von einer Studie untermauert, bei der bei einer Inkubation mit DMSO eine mitochondriale Schwellung, ein reduziertes mitochondriales Membranpotential sowie eine erhöhte Formation an mitochondrialen ROS an kultivierten Astrozyten bereits beobachtet werden konnte (Yuan et al., 2014^[191]).

Aus all diesem lässt sich ableiten, dass die mCAT-Myozyten das während des Versuchsprotokolls anfallende H_2O_2 effizienter entgiften konnten und folglich weniger oxidativem Stress ausgesetzt waren. Auf der anderen Seite bedeutet diese Schlussfolgerung aber auch, dass EMD 57033 erstens in den Kardiomyozyten zu einer vermehrten Formation von ROS geführt hat, zweitens die normale antioxidative Kapazität überfordert, drittens die Generation von H_2O_2 in der Herzmuskelzelle triggert und viertens hier als Induktor einer pathophysiologischen Situation fungiert. Denn entgegen der allgemeinen Annahme, dass Calcium-Sensitizer ohne erhöhten Sauerstoffverbrauch eine inotrope Wirkung entfalten können (Kass & Solaro, 2006^[76]; Nagy et al., 2014^[129]; Perrone & Kaplinsky, 2005^[141]; Pollesello et al., 2016^[143]), zeugt der hier in Abbildung 24 dargestellte vermehrte ROS-Anfall des WT von einer zellulären energetischen Disbalance, die sich am ehesten anhand der pharmakologisch induzierten diastolischen Dysfunktion der Kardiomyozyten erklären lässt. Während nämlich im Myokard die diastolische und systolische Kraftentwicklung unter identischem energetischem Aufwand und damit auch unter gleichem ATP- und O_2 -Verbrauch stattfindet (Kohlhaas & Maack, 2010^[82]), fordert gemäß dieses Umstandes die durch EMD evozierte erhöhte diastoli-

sche Vorspannung einen erhöhten Umsatz von ATP, der auf Kosten der mitochondrialen NADPH-abhängigen antioxidativen Kapazität realisiert werden muss und demnach zu einer vermehrten mitochondrialen ROS-Emission führt.

Als sekundäre Folge können die vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies beim Einsatz von Ca^{2+} -Sensitizern beispielsweise dann aufgrund der hohen ROS-Suszeptibilität beider CK-Isoenzyme eine größtenteils irreversible Inaktivierung der Kreatinkinase bedingen (Schlattner et al., 2006^[153]). Infolgedessen kann dies - wie bereits bei verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen bekannt - eine Kompromittierung des zur Energiehomöostase benötigten Kreatinkinase-Phosphokreatin-Systems hervorrufen (Bottomley et al., 2013^[20]; Tian et al., 1997^[174]; Weiss et al., 2005^[186]). Der damit verbundene cytosolische ADP-Anstieg soll hierbei auch neben einer erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Konzentration direkt zu einer gestörten Relaxation in der Diastole beitragen (Sequeira et al., 2015^[158]; Tian et al., 1997^[174]). Auf der anderen Seite können ROS zusätzlich die beiden Hauptfaktoren der passiven myokardiale Steifigkeit, die extrazelluläre Matrix und das elastische sarkomerische Protein Titin modifizieren und zu einer diastolischen Dysfunktion bzw. erhöhten myokardialen Steifigkeit führen (Borlaug & Redfield, 2011^[19]; Grützner et al., 2009^[59]). So kann z.B. das riesige Strukturprotein Titin, das sich zwischen der Z-Scheibe und der M-Bande des Sarkomers aufspannt und die Funktion einer bidirektionalen molekularen Feder besitzt (Hamdani & Paulus, 2013^[62]; van Heerebeek et al., 2012^[68]), oxidativ via Disulfidbrücken an einer spezifischen Stelle innerhalb seiner elastischen Region (I-Bande), der (engl.) „N2-B unique sequence“, verändert und damit eher mechanisch stabilisiert/gesteift werden (Borlaug & Redfield, 2011^[19]; Grützner et al., 2009^[59]). Darüber hinaus können ein anormales Expressionsverhältnis der Titin-Isoformen (N2B und N2BA) und ein veränderter Phosphorylierungszustand eine erhöhte Steifigkeit des Titins zur Folge haben (Borbély et al., 2009^[18]; Borlaug & Redfield, 2011^[19]; van Heerebeek et al., 2012^[68]). In gewisser Hinsicht können ROS hier auch an einer Hypophosphorylierung beispielsweise der N2B-Titin-Isoform, die sich in einer Erhöhung der kardiomyozytären mechanischen Ruhespannung äußert, beteiligt sein (Borbély et al., 2009^[18]; van Heerebeek et al., 2012^[68]). Denn Superoxide verringern die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, indem sie z.B. direkt mit $\cdot\text{NO}$ reagieren und Peroxinitrit-Anionen bilden (van Heerebeek et al., 2012^[68]). Diese oxidieren wiederum den essentiellen Cofaktor Tetrahydrobiopterin der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) und verstärken durch die Entkopplung der NOS letztendlich die ROS-Produktion (van Heerebeek et al., 2012^[68]). Eine

Verarmung an $\cdot\text{NO}$, eine damit verbundene niedrigere Syntheseleistung löslicher Guanylatcyclasen sowie ein daraus folgender Mangel an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) können die auch bei der HFpEF auftretende kompromittierte Aktivität der Proteinkinase G (cGMP aktiviert) und eine hieraus resultierende Hypophosphorylierung des Titins erklären (Hamdani & Paulus, 2013^[62]; van Heerebeek et al., 2012^[68]). So führt nämlich eine Proteinkinase G-abhängige Phosphorylierung des Titins, genau wie eine PKA-vermittelte Phosphatgruppenübertragung, zu einer Reduzierung der myofibrillären Steifigkeit und kann demnach eine diastolische Dysfunktion verbessern (Grützner et al., 2009^[59]; Hamdani & Paulus, 2013^[62]; van Heerebeek et al., 2012^[68]).

ROS sollen auch weitere Bestandteile der Myofilamente posttranslational durch oxidative Prozesse modifizieren und dadurch deren Ca^{2+} -Sensitivität sogar direkt modulieren (Lovelock et al., 2012^[103]). In einem HFpEF-Mausmodell ging dieser Umstand mit einer diastolischen Dysfunktion einher (Lovelock et al., 2012^[103]), die in mancher Hinsicht der bei einer Ca^{2+} -Sensibilisierung gefundenen pathologisch gesteigerten diastolischen Vorspannung gleicht. Nach unseren Erkenntnissen sind das Zusammenspiel und die Verknüpfung von mehreren unvorteilhaften Gegebenheiten bei der HCM, beim Einsatz von Calcium-Sensitizern und möglicherweise auch bei der HFpEF einer der womöglich wesentlichsten Pathomechanismen: Während bei gleichbleibenden intrazellulären Ca^{2+} -Transienten eine reine Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente durch vermehrte Querbrückenbildungen mehr Energie in Form von ATP verbraucht, findet im Mitochondrium die Regeneration des ATP ohne äquivalente Ca^{2+} -getriggerte Aktivierung des Citratzyklus statt. Als Folge der hieraus entstehenden Oxidation/Depletion des NADH-Pools begünstigt die Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase auf Kosten der NADPH-abhängigen antioxidativen Kapazität über ihren (engl.) „reverse-mode“ die Bereitstellung von NADH und evoziert so ein mitochondriales Redox-Ungleichgewicht (Nickel et al., 2015^[132]). ROS, im Speziellen membranpermeable H_2O_2 -Moleküle, können so vermehrt im Mitochondrium entstehen und zelluläre Biomoleküle wiederum oxidieren. So kann beispielsweise die ROS-induzierte Aktivierung von Na^+ -Kanälen zu einem vermehrten späten Na^+ -Einstrom (late I_{Na}) führen, das Aktionspotenzial verlängern, frühe Nachdepolarisationen fördern und letztendlich lebensbedrohliche Arrhythmien provozieren (Despa & Bers, 2013^[41]; Song et al., 2006^[163]; Wagner et al., 2013^[181]). Abbildung 26 visualisiert die im Herzen auftretende Pathophysiologie unter Ca^{2+} -Sensibilisierung und erläutert die hier beschriebene Hypothese schematisch.

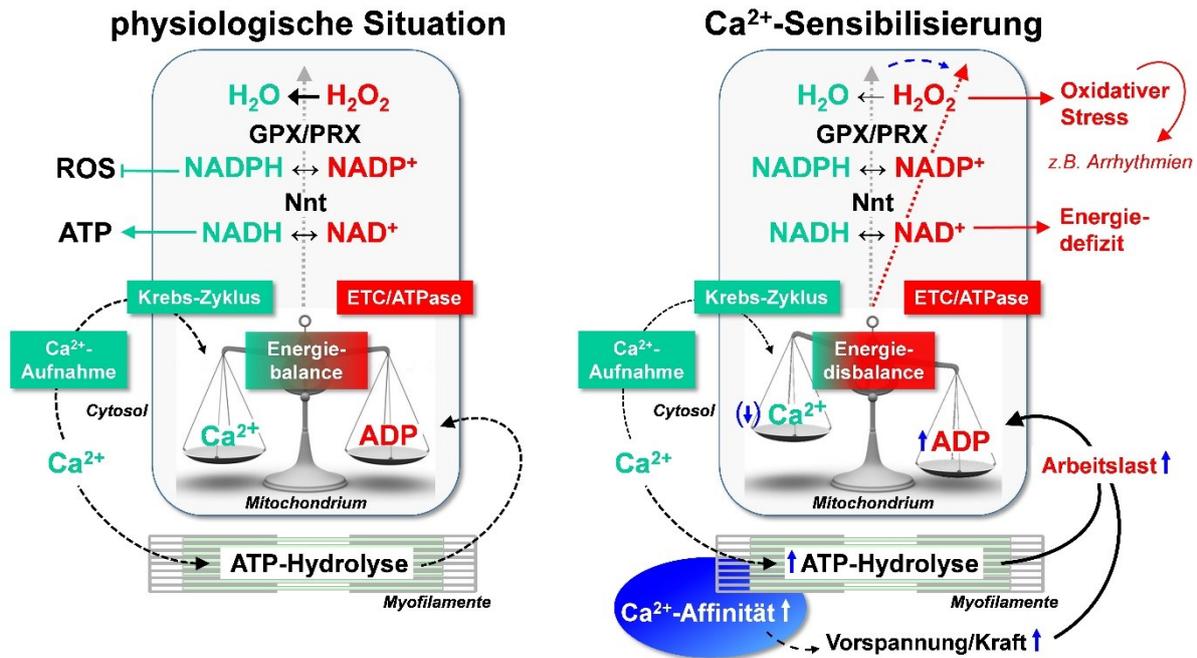


Abbildung 26: Metabolische Folgen einer Ca²⁺-Sensibilisierung

Eine Steigerung der myofilamentären Ca²⁺-Affinität provoziert innerhalb der Herzmuskelzelle metabolische Defizite, die im Mitochondrium zu einer vermehrten H₂O₂-Produktion führen. Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; Ca²⁺, ionisiertes Calcium; ETC, Elektronentransportkette; GPX, Glutathion-Peroxidase; H₂O, Wasser; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; NAD(P)H/NAD(P)⁺, reduziertes/oxidiertes Nicotinamadeninindinukleotid(phosphat); Nnt, Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase; PRX, Peroxiredoxin; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; (Abbildung modifiziert nach Otto, 2018^[138]).

Schlussendlich erscheint das Konzept eines Calcium-Sensitizers besonders im Hinblick auf seine hier angedeuteten Energie beanspruchenden Eigenschaften und im Kontext der zellulären molekularen Homöostasemechanismen und der äußerst komplexen und fein abgestimmten intrazellulären Kommunikationspfade zwischen Mitochondrien und Myofibrillen paradox. Während beispielsweise das Mitochondrium sogar bei einer pathologischen Steigerung der Arbeitslast das entstehende Energiedefizit bis zu einem gewissen Ausmaß kompensieren kann, muss es dies im Zuge seiner hochspezialisierten Adaptationsmechanismen auf Kosten der antioxidativen Kapazität realisieren. Daher würde sich eine langfristige pharmakologische Ca²⁺-Sensibilisierung advers auf die mitochondriale Energetik sowie reaktive Sauerstoffspeziesproduktion auswirken und am ehesten deletäre pathologische Umstände imitieren, die sowohl bei einer HFpEF als auch bei einer genetischen Ca²⁺-Sensibilisierung, nämlich dem Krankheitsbild der hypertrophen Kardiomyopathie, zu beobachten sind (Dietl et al., 2017^[42]; Kohlhaas et al., 2017^[85]).

7 Ausblick

Da unter anderem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass einerseits Calcium-Sensitizer nachteilige Auswirkungen auf die zelluläre Funktion haben und andererseits eine effiziente H_2O_2 -Reduktion unter pathologischen zellulären Gegebenheiten positive Effekte aufweist, wäre es wünschenswert, den Fokus zukünftiger Forschungsarbeiten auf andere pharmakologische Substanzklassen zu legen. Für eine Therapie der chronischen Herzinsuffizienz scheint die Reglementierung des ROS-Anfalls in Kardiomyozyten und insbesondere auf subzellulärer Ebene im Mitochondrium ein Erfolg versprechender medikamentöser Ansatzpunkt zu sein (Maack & Böhm, 2011^[109]; Münzel et al., 2015^[126]). Während hierbei allerdings unspezifische Antioxidantien wie z.B. Vitamin C, Vitamin E und N-Acetylcystein keine oder auch teilweise unvorteilhafte Effekte demonstrierten (Dai et al., 2011^[37]; Lonn et al., 2005^[101]; Ristow et al., 2009^[148]; Yusuf et al., 2000^[193]), konnte im Speziellen eine der Substanzen, die das Mitochondrium als molekulares Target besitzt, nämlich das synthetische Szeto-Schiller-Peptid 31 (SS-31) (Elamipretide; Bendavia©), in präklinischen Studien positiv überzeugen (Dai et al., 2011^[37]; Dai et al., 2013^[39]; Nickel et al., 2015^[132]; Szeto & Birk, 2014^[167]). Dieses Peptid wirkt besonders vielversprechend, weil es selektiv sich an das IMM-spezifische Cardiolipin bindet, das Phospholipid auf diese Weise vor oxidativen Schäden schützt und demnach die primären Funktionen des Cardiolipins, die vor allem die Aufrechterhaltung der Organisation der Atmungskette in Superkomplexen sowie eine damit verbundene Vermeidung von übermäßigen aberranten Elektronenübersprüngen auf O_2 beinhalten, wahren kann (von Hardenberg & Maack, 2017^[64]; Szeto, 2014^[166]). Deswegen entfaltet SS-31 seine antioxidative Wirkung innerhalb des Mitochondriums nicht über primäre Mechanismen, sondern am ehesten über sekundäre (von Hardenberg & Maack, 2017^[64]), die es ihm wahrscheinlich ermöglichen, einer exzessiven Formation an reaktiven Sauerstoffspezies seitens der Atmungskette vorzubeugen und gleichzeitig zellphysiologisch essentielle ROS-Konzentrationen (Mito-hormesis) zuzulassen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abel ED, Doenst T (2011). Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 90(2):234–242.
2. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B (2005). The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *The Journal of Clinical Investigation* 115(12):3527–3535.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition. New York: Garland Science.
4. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(17):7915–7922.
5. Aon MA, Cortassa S, Marbán E, O'Rourke B (2003). Synchronized Whole Cell Oscillations in Mitochondrial Metabolism Triggered by a Local Release of Reactive Oxygen Species in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278(45):44735–44744.
6. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(6-7):865–877.
7. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 106(1):62–69.
8. Balaban RS, Kantor HL, Katz LA, Briggs RW (1986). Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science* 232(4754):1121–1123.
9. Balaban RS (2002). Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34(10):1259–1271.
10. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120(4):483–495.
11. Basisty N, Dai D-F, Gagnidze A, Gitari L, Fredrickson J, Maina Y, Beyer RP, Emond MJ, Hsieh EJ, MacCoss MJ, Martin GM, Rabinovitch PS (2016). Mitochondrial-targeted catalase is good for the old mouse proteome, but not for the young: 'reverse' antagonistic pleiotropy? *Aging Cell* 15(4):634–645.
12. Bay J, Kohlhaas M, Maack C (2013). Intracellular Na⁺ and cardiac metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 61:20–27.

13. Belletti A, Castro ML, Silveti S, Greco T, Biondi-Zoccai G, Pasin L, Zangrillo A, Landoni G (2015). The Effect of inotropes and vasopressors on mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *British Journal of Anaesthesia* 115(5):656–675.
14. Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868):198–205.
15. Bers DM (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda, Md.)* 21(6):380–387.
16. Bers DM (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology* 70(1):23–49.
17. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992). Intracellular Calcium Handling in Isolated Ventricular Myocytes From Patients With Terminal Heart Failure. *Circulation* 85(3):1046–1055.
18. Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Édes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JGF, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJM, Paulus WJ (2009). Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium. *Circulation Research* 104(6):780–786.
19. Borlaug BA, Redfield MM (2011). Diastolic and Systolic Heart Failure are Distinct Phenotypes of the Heart Failure Syndrome. *Circulation* 123(18):2006-2014.
20. Bottomley PA, Panjrath GS, Lai S, Hirsch GA, Wu K, Najjar SS, Steinberg A, Gerstenblith G, Weiss RG (2013). Metabolic Rates of ATP Transfer Through Creatine Kinase (CK Flux) Predict Clinical Heart Failure Events and Death. *Science Translational Medicine* 5(215):215re3.
21. Brand MD, Nicholls DG (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* 435(Pt 2):297–312.
22. Brandt U (2007). Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Hrsg. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
23. Bruker BioSpin Corporation (2019). Biological ROS and RNS: Part II. EPR Spin Probes. Online verfügbar unter https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/EPR_brochures/ROS-2_print.pdf, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
24. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012). Redox Signaling in Cardiac Physiology and Pathology. *Circulation Research* 111(8):1091–1106.
25. Chance B, Williams GR (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. *Journal of Biological Chemistry* 217(1):383–393.

26. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological Reviews* 59(3):527–605.
27. Chan K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ (2005). Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1(4):655–669.
28. Chen M, Sat PY, Chuprun JK, Peroutka RJ, Otis NJ, Ibetti J, Pan S, Sheu S-S, Gao E, Koch WJ (2013). Pro-Death Signaling of GRK2 in Cardiac Myocytes after Ischemic Stress Occurs via ERK-Dependent, Hsp90-Mediated Mitochondrial Targeting. *Circulation Research* 112(8):1121–1134.
29. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III. *Journal of Biological Chemistry* 278(38):36027–36031.
30. Chen Y, Csordás G, Jowdy C, Schneider TG, Csordás N, Wang W, Liu Y, Kohlhaas M, Meiser M, Bergem S, Nerbonne JM, Dorn II GW, Maack C (2012). Mitofusin 2-containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses via Inter-Organellar Ca²⁺ Crosstalk. *Circulation Research* 111(7):863–875.
31. Chen Y-R, Zweier JL (2014). Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation. *Circulation Research* 114(3):524–537.
32. Cortassa S, Aon MA, O'Rourke B, Jacques R, Tseng H-J, Marbán E, Winslow RL (2006). A Computational Model Integrating Electrophysiology, Contraction, and Mitochondrial Bioenergetics in the Ventricular Myocyte. *Biophysical Journal* 91(4):1564–1589.
33. Cortassa S, O'Rourke B, Aon MA (2014). Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837(2):287–295.
34. Dai D-F, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, Gollahon K, Martin GM, Loeb LA, Ladiges WC, Rabinovitch PS (2009). Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria Attenuates Murine Cardiac Aging. *Circulation* 119(21):2789–2797.
35. Dai D-F, Chen T, Wanagat J, Laflamme M, Marcinek DJ, Emond MJ, Ngo CP, Prolla TA, Rabinovitch PS (2010). Age-Dependent Cardiomyopathy in Mitochondrial Mutator Mice is Attenuated by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Aging Cell* 9(4):536–544.
36. Dai D-F, Johnson SC, Villarín JJ, Chin MT, Nieves-Cintrón M, Chen T, Marcinek DJ, Dorn II GW, Kang YJ, Prolla TA, Santana LF, Rabinovitch PS (2011). Mitochondrial Oxidative Stress Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Gαq Overexpression-Induced Heart Failure. *Circulation Research* 108(7):837–846.

37. Dai D-F, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kuttyavin V, Santana LF, Rabinovitch PS (2011). Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 58(1):73–82.
38. Dai D-F, Hsieh EJ, Liu Y, Chen T, Beyer RP, Chin MT, MacCoss MJ, Rabinovitch PS (2012). Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress. *Cardiovascular Research* 93(1):79–88.
39. Dai D-F, Hsieh EJ, Chen T, Menendez LG, Basisty NB, Tsai L, Beyer RP, Crispin DA, Shulman NJ, Szeto HH, Tian R, MacCoss MJ, Rabinovitch PS (2013). Global Proteomics and Pathway Analysis of Pressure-overload-Induced Heart Failure and Its Attenuation by Mitochondrial-Targeted Peptides. *Circulation: Heart Failure* 6(5):1067–1076.
40. Daut J (2010). Herzmechanik. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Hrsg. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
41. Despa S, Bers DM (2013). Na⁺ transport in the normal and failing heart - Remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 61:2–10.
42. Dietl A, Kohlhaas M, Puetz D, Nickel AG, Maack C (2017). Bioenergetic properties of inotropic drugs. *European Journal of Heart Failure* 19(Suppl. S1):597 [Abstract: P2307].
43. Dietl A, Maack C (2017). Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure. *Current Heart Failure Reports* 14(4):338–349.
44. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* 49(4):717–727.
45. Doane MG (1967). Fluorometric Measurement of Pyridine Nucleotide Reduction in the Giant Axon of the Squid. *The Journal of General Physiology* 50(11):2603–2632.
46. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED (2013). Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production. *Circulation Research* 113(6):709–724.
47. Ehmke H (2014). Das Kreislaufsystem. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S; Hrsg. Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
48. Elkayam U, Tasissa G, Binanay C, Stevenson LW, Gheorghide M, Warnica JW, Young JB, Rayburn BK, Rogers JG, DeMarco T, Leier CV (2007). Use and impact of inotropes and vasodilator therapy in hospitalized patients with severe heart failure. *American Heart Journal* 153(1):98–104.

49. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, Hagege AA, Lafont A, Limongelli G, Mahrholdt H, McKenna WJ, Mogensen J, Niho-yannopoulos P, Nistri S, Pieper PG, Pieske B, Rapezzi C, Rutten FH, Tillmanns C, Watkins H (2014). 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 35(39):2733–2779.
50. Eng J, Lynch RM, Balaban RS (1989). Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophysical Journal* 55(4):621–630.
51. Fabiato A (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 245(1):C1-C14.
52. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu S-S (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Frontiers in Bioscience* 14:1197–1218.
53. Frey N, Luedde M, Katus HA (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology* 9(2):91–100.
54. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW (1995). Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 270(22):13399–13405.
55. Ghashghaei R, Arbit B, Maisel AS (2016). Current and novel biomarkers in heart failure: bench to bedside. *Current Opinion in Cardiology* 31(2):191–195.
56. Gladden JD, Linke WA, Redfield MM (2014). Heart failure with preserved ejection fraction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 466(6):1037–1053.
57. Glancy B, Balaban RS (2012). Role of Mitochondrial Ca^{2+} in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry* 51(14):2959–2973.
58. Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Bernier M, Sollott SJ, Fabbri E, Navas P, Ferrucci L (2015). Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging. *The Journals of Gerontology: Series A* 70(11):1334–1342.
59. Grützner A, Garcia-Manyes S, Kötter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA (2009). Modulation of Titin-Based Stiffness by Disulfide Bonding in the Cardiac Titin N2-B Unique Sequence. *Biophysical Journal* 97(3):825–834.
60. Gulbins E, Lang F (2010). Signaltransduktion. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Hrsg. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
61. Gurtovenko AA, Anwar J (2007). Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(35):10453–10460.

62. Hamdani N, Paulus WJ (2013). Myocardial Titin and Collagen in Cardiac Diastolic Dysfunction: Partners in Crime. *Circulation* 128(1):5–8.
63. Hansatech Instruments Ltd (2019). Oxygen Measurements: Oxygen Electrode Measurement Principles. Online verfügbar unter <http://www.hansatech-instruments.com/oxygen-measurements/>, zuletzt geprüft am 13.01.2019.
64. von Hardenberg A, Maack C (2017). Mitochondrial Therapies in Heart Failure. *Handbook of Experimental Pharmacology* 243:491–514.
65. Harman D (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* 11(3):298–300.
66. Hasilik A (2007). Zelluläre Organellen, Strukturen und Transportvorgänge. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Hrsg. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
67. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM (2010). Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1203(1):120–125.
68. van Heerebeek L, Franssen CPM, Hamdani N, Verheugt FWA, Somsen GA, Paulus WJ (2012). Molecular and Cellular Basis for Diastolic Dysfunction. *Current Heart Failure Reports* 9(4):293–302.
69. He H, Javadpour MM, Latif F, Tardiff JC, Ingwall JS (2007). R-92L and R-92W Mutations in Cardiac Troponin T Lead to Distinct Energetic Phenotypes in Intact Mouse Hearts. *Biophysical Journal* 93(5):1834–1844.
70. IonOptix LLC (2019). Myocyte Calcium & Contractility Recording System (μ Step Configuration): Complete real-time, turnkey system for calcium and contractility recording. Online verfügbar unter http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont_MUS_digital.pdf, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
71. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GYH (2000). ABC of heart failure: Pathophysiology. *BMJ* 320(7228):167–170.
72. Jelkmann W (2010). Blut. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Hrsg. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
73. Kang YJ, Chen Y, Epstein PN (1996). Suppression of Doxorubicin Cardiotoxicity by Overexpression of Catalase in the Heart of Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 271(21):12610–12616.
74. Kao Y-T, Saxena C, He T-F, Guo L, Wang L, Sancar A, Zhong D (2008). Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *Journal of the American Chemical Society* 130(39):13132–13139.

75. Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998). Murine Cardiac Function: A Cautionary Tail. *Circulation Research* 82(4):519–522.
76. Kass DA, Solaro RJ (2006). Mechanisms and Use of Calcium-Sensitizing Agents in the Failing Heart. *Circulation* 113(2):305–315.
77. Kembro JM, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B, Cortassa S (2013). Integrating Mitochondrial Energetics, Redox and ROS Metabolic Networks: A Two-Compartment Model. *Biophysical Journal* 104(2):332–343.
78. Kimura S, Zhang G-X, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan Y-Y, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y (2005). Role of NAD(P)H Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Cardioprotection of Ischemic Reperfusion Injury by Angiotensin II. *Hypertension* 45(5):860–866.
79. Kirkwood TBL (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell* 120(4):437–447.
80. Knight WE, Yan C (2012). Cardiac Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Function, Regulation, and Therapeutic Prospects. *Hormone and Metabolic Research* 44(10):766–775.
81. Kohler JJ, Cucoranu I, Fields E, Green E, He S, Hoying A, Russ R, Abuin A, Johnson D, Hosseini SH, Raper CM, Lewis W (2009). Transgenic mitochondrial superoxide dismutase and mitochondrially targeted catalase prevent antiretroviral-induced oxidative stress and cardiomyopathy. *Laboratory Investigation* 89(7):782–790.
82. Kohlhaas M, Maack C (2010). Adverse Bioenergetic Consequences of Na⁺-Ca²⁺ Exchanger-Mediated Ca²⁺ Influx in Cardiac Myocytes. *Circulation* 122(22):2273–2280.
83. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Böhm M, O'Rourke B, Maack C (2010). Elevated Cytosolic Na⁺ Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. *Circulation* 121(14):1606–1613.
84. Kohlhaas M, Maack C (2013). Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular Research* 98(2):259–268.
85. Kohlhaas M, Dietl A, Friedrich FW, Flenner F, Otto O, Sequeira V, Venkataraman R, Bay J, Nickel A, Kästner L, Tian Q, Lipp P, Knollmann B, Baudenbacher F, Carrier L, Eschenhagen T, Maack C (2017). Energetic mismatch and mitochondrial reactive oxygen species cause arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology* 106(Suppl. 1):1 [Abstract: P1873].
86. Kohlhaas M, Nickel AG, Maack C (2017). Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of Physiology* 595(12):3753–3763.

87. Komamura K (2013). Similarities and Differences between the Pathogenesis and Pathophysiology of Diastolic and Systolic Heart Failure. *Cardiology Research and Practice* 2013:824135.
88. Koudelka M (1986). Performance characteristics of a planar 'clark-type' oxygen sensor. *Sensors and Actuators* 9(3):249–258.
89. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495(1-2):12–15.
90. Kraft T, Brenner B (2014). Muskulatur. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S; Hrsg. Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
91. Kriegel T, Schellenberger W (2007). Bioenergetik und Enzymologie. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Hrsg. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
92. Lang F, Murer H (2010). Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Hrsg. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
93. Lanza IR, Nair KS (2009). Functional Assessment of Isolated Mitochondria In Vitro. *Methods in Enzymology* 457:349–372.
94. Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, Lablanche S, Leverve X, Bernardi P, Ovize M, Fontaine E (2012). Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(9):1628–1634.
95. Li D, Lai Y, Yue Y, Rabinovitch PS, Hakim C, Duan D (2009). Ectopic Catalase Expression in Mitochondria by Adeno-Associated Virus Enhances Exercise Performance in Mice. *PloS ONE* 4(8):e6673.
96. Lijnen P, Petrov V, van Pelt J, Fagard R (2008). Inhibition of Superoxide Dismutase Induces Collagen Production in Cardiac Fibroblasts. *American Journal of Hypertension* 21(10):1129–1136.
97. Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000). Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 278(3):H769-H779.
98. Ljubuncic P, Reznick AZ (2009). The Evolutionary Theories of Aging Revisited – A Mini-Review. *Gerontology* 55(2):205–216.
99. Löffler G, Brandt U (2007). Der Citratzyklus. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Hrsg. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

100. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003). What Is the Role of β -Adrenergic Signaling in Heart Failure? *Circulation Research* 93(10):896–906.
101. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JMO, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR, The HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators (2005). Effects of Long-term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 293(11):1338–1347.
102. López-Lluch G, Santos-Ocaña C, Sánchez-Alcázar JA, Fernández-Ayala DJM, Asencio-Salcedo C, Rodríguez-Aguilera JC, Navas P (2015). Mitochondrial responsibility in ageing process: innocent, suspect or guilty. *Biogerontology* 16(5):599–620.
103. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong E-M, Lardin HA, Liu H, Patel BG, Taglieri DM, Gu L, Kumar P, Pokhrel N, Zeng D, Belardinelli L, Sorescu D, Solaro RJ, Dudley Jr. SC (2012). Ranolazine Improves Cardiac Diastolic Dysfunction Through Modulation of Myofilament Calcium Sensitivity. *Circulation Research* 110(6):841–850.
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265–275.
105. Ludovico P, Burhans WC (2014). Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast Research* 14(1):33–39.
106. Lynch M, Marinov GK (2015). The bioenergetic costs of a gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(51):15690–15695.
107. Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B (2006). Elevated Cytosolic Na^+ Decreases Mitochondrial Ca^{2+} Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 99(2):172–182.
108. Maack C, O'Rourke B (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Research in Cardiology* 102(5):369–392.
109. Maack C, Böhm M (2011). Targeting Mitochondrial Oxidative Stress in Heart Failure: Throttling the Afterburner. *Journal of the American College of Cardiology* 58(1):83–86.
110. Maack C (2016). Orphaned mitochondria in heart failure. *Cardiovascular Research* 109(1):6–8.

111. Maack C, Eschenhagen T, Hamdani N, Heinzl FR, Lyon AR, Manstein DJ, Metzger J, Papp Z, Tocchetti CG, Yilmaz MB, Anker SD, Balligand J-L, Bauersachs J, Brutsaert D, Carrier L, Chlopicki S, Cleland JG, Boer RA de, Dietl A, Fischmeister R, Harjola V-P, Heymans S, Hilfiker-Kleiner D, Holzmeister J, Keulenaer G de, Limongelli G, Linke WA, Lund LH, Masip J, Metra M, Mueller C, Pieske B, Ponikowski P, Ristić A, Ruschitzka F, Seferović PM, Skouri H, Zimmermann WH, Mebazaa A (2018). Treatments targeting inotropy. *European Heart Journal* ehy600.
112. Marian AJ, Roberts R (2001). The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33(4):655–670.
113. Maron BJ (2003). Sudden Death in Young Athletes. *The New England Journal of Medicine* 349(11):1064–1075.
114. Maron BJ, Maron MS (2013). Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet* 381(9862):242–255.
115. Ma X, Jin M, Cai Y, Xia H, Long K, Liu J, Yu Q, Yuan J (2011). Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy. *Chemistry & Biology* 18(11):1474–1481.
116. McMurray JJ, Stewart S (2000). Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83(5):596–602.
117. McMurray JJV, Pfeffer MA (2005). Heart failure. *The Lancet* 365(9474):1877–1889.
118. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A (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 Heart Journal* 33(14):1787–1847.
119. Meiser MG (2015). Die Rolle von Mitofusin 2 für die Calcium-Transmission zwischen dem sarkoplastischen Retikulum und Mitochondrien sowie die bioenergetische Adaption in Kardiomyozyten [Dissertation]. Homburg: Universität des Saarlandes.
120. Mela L, Seitz S (1979). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods in Enzymology* 55:39–46.
121. Merck KGaA/Sigma Aldrich Corporation (2019). Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone. Online verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2920?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 06.01.19.

122. 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):1750–1757.
123. Mosterd A, Hoes AW (2007). Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93(9):1137–1146.
124. Mulisch M, Welsch U; Hrsg. (2010). Romeis Mikroskopische Technik. 18. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
125. Müller-Werdan U, Werdan K (2016). Chronische Herzinsuffizienz: Die Zahl der Patienten steigt, aber auch die differenzierter Therapien. *Deutsches Ärzteblatt* 113(25):A1207-A1214.
126. Münzel T, Gori T, Keaney JF, Maack C, Daiber A (2015). Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *European Heart Journal* 36(38):2555–2564.
127. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC (2017). Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology* 70(2):212–229.
128. Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417(1):1–13.
129. Nagy L, Pollesello P, Papp Z (2014). Inotropes and Inodilators for Acute Heart Failure: Sarcomere Active Drugs in Focus. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 64(3):199–208.
130. Nickel A, Löffler J, Maack C (2013). Myocardial energetics in heart failure. *Basic Research in Cardiology* 108(4):358.
131. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73:26–33.
132. Nickel AG, von Hardenberg A, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J, Reil J-C, Kazakov A, Bonnekoh J, Stadelmaier M, Puhl S-L, Wagner M, Bogeski I, Cortassa S, Kappl R, Pasiaka B, Lafontaine M, Lancaster CRD, Blacker TS, Hall AR, Duchon MR, Kästner L, Lipp P, Zeller T, Müller C, Knopp A, Laufs U, Böhm M, Hoth M, Maack C (2015). Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metabolism* 22(3):472–484.
133. Nohl H, Hegner D (1978). Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria. *FEBS Letters* 89(1):126–130.
134. Nulton-Persson AC, Szweda LI (2001). Modulation of Mitochondrial Function by Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 276(26):23357–23361.

135. O'Connell TD, Ni YG, Lin K-M, Han H, Yan Z (2003). Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiac Myocytes for Signaling Studies. *AfCS Research Reports* 1(5):1–9.
136. O'Rourke B (2004). Evidence for Mitochondrial K⁺ Channels and Their Role in Cardioprotection. *Circulation Research* 94(4):420–432.
137. Oshino N, Chance B, Sies H, Bücher T (1973). The Role of H₂O₂ Generation in Perfused Rat Liver and the Reaction of Catalase Compound I and Hydrogen Donors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 154(1):117–131.
138. Otto O (2018). Erhöhte Ca²⁺-Affinität der Myofilamente bei hypertropher Kardiomyopathie bewirkt energetisches Defizit, oxidativen Stress und Arrhythmien [Dissertation]. Homburg: Universität des Saarlandes.
139. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM (2006). Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *The New England Journal of Medicine* 355(3):251–259.
140. Pathak A, Lebrin M, Vaccaro A, Senard JM, Despas F (2013). Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 38(5):341–349.
141. Perrone SV, Kaplinsky EJ (2005). Calcium sensitizer agents: A new class of inotropic agents in the treatment of decompensated heart failure. *International Journal of Cardiology* 103(3):248–255.
142. Piper HM (2010). Herzerregung. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Hrsg. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
143. Pollesello P, Papp Z, Papp JG (2016). Calcium sensitizers: What have we learned over the last 25 years? *International Journal of Cardiology* 203:543–548.
144. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 37(27):2129–2200.
145. Rabinovitch Laboratory [University of Washington] (2019). RABINOVITCH PROTOCOL MANUAL: U:/PUBLIC/Lab Manual/Rabinovitch Manual 2005. Online verfügbar unter <http://www.pathology.washington.edu/research/labs/rabinovitch/flowroom/protocols/RabLabManual.html>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.

146. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 266(32):22028–22034.
147. Rich PR, Maréchal A (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry* 47:1–23.
148. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (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):8665–8670.
149. Ristow M, Zarse K (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology* 45(6):410–418.
150. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P (2009). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(11):1342–1351.
151. Rover Jr. L, Fernandes JCB, de Oliveira Neto G, Kubota LT, Katekawa E, Serrano SHP (1998). Study of NADH Stability Using Ultraviolet–Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design. *Analytical Biochemistry* 260(1):50–55.
152. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A (2007). Catalase Takes Part in Rat Liver Mitochondria Oxidative Stress Defense. *Journal of Biological Chemistry* 282(33):24407–24415.
153. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762(2):164–180.
154. Schlecht W, Li K-L, Hu D, Dong W (2016). Fluorescence Based Characterization of Calcium Sensitizer Action on the Troponin Complex. *Chemical Biology & Drug Design* 87(2):171–181.
155. Schrader J, Gödecke A, Kelm M (2014). Das Herz. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S; Hrsg. Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
156. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005). Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science* 308(5730):1909–1911.
157. Schriener SE, Linford NJ (2006). Extension of mouse lifespan by overexpression of catalase. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 28(2):209–218.

158. Sequeira V, Najafi A, McConnell M, Fowler ED, Bollen IAE, Wüst RCI, dos Remedios C, Helmes M, White E, Stienen GJM, Tardiff J, Kuster DWD, van der Velden J (2015). Synergistic role of ADP and Ca²⁺ in diastolic myocardial stiffness. *The Journal of Physiology* 593(17):3899–3916.
159. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass DA, Paulus WJ (2016). Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation* 134(1):73–90.
160. Silbernagl S (2014). Die Funktion der Nieren. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S; Hrsg. Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
161. Song L-S, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H (2006). Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(11):4305–4310.
162. Song M, Chen Y, Gong G, Murphy E, Rabinovitch PS, Dorn II GW (2014). Super-Suppression of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Signaling Impairs Compensatory Autophagy in Primary Mitophagic Cardiomyopathy. *Circulation Research* 115(3):348–353.
163. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L (2006). Blocking Late Sodium Current Reduces Hydrogen Peroxide-Induced Arrhythmogenic Activity and Contractile Dysfunction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318(1):214–222.
164. Statistisches Bundesamt [Destatis] (2019). Krankenhauspatienten: Vollstationär behandelte Patientinnen und Patienten (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) in Krankenhäusern nach der ICD-10 im Jahr 2017. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/20DiagnosenInsgesamt.html>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
165. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJV (2001). More ‘malignant’ than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *European Journal of Heart Failure* 3(3):315–322.
166. Szeto HH (2014). First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British Journal of Pharmacology* 171(8):2029–2050.
167. Szeto HH, Birk AV (2014). Serendipity and the Discovery of Novel Compounds That Restore Mitochondrial Plasticity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 96(6):672–683.

168. Tapia PC (2006). Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Medical Hypotheses* 66(4):832–843.
169. The Jackson Laboratory (2019). MOUSE STRAIN DATASHEET-016197: B6.Cg-Tg(CAG-OTC/CAT)4033Prab/J. Online verfügbar unter <https://www.jax.org/strain/016197>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
170. Thermo Fisher Scientific Inc. (2019). Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit. Online verfügbar unter <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A22188>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
171. Thermo Fisher Scientific Inc. (2019). Amplex™ UltraRed Reagent. Online verfügbar unter <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A36006>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
172. Thermo Fisher Scientific Inc. (2019). CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator). Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827?SID=srch-srp-C6827>, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
173. Thermo Fisher Scientific Inc. (2019). Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with Visible Light—Section 19.3. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-visible-light.html#head3>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
174. Tian R, Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH (1997). Failure to Maintain a Low ADP Concentration Impairs Diastolic Function in Hypertrophied Rat Hearts. *Circulation* 96(4):1313–1319.
175. Tipler PA, Mosca G (2015). Physik: für Wissenschaftler und Ingenieure. 7. Auflage; herausgegeben von Wagner J. Heidelberg: Springer Spektrum.
176. Vakrou S, Abraham MR (2014). Hypertrophic cardiomyopathy: a heart in need of an energy bar? *Frontiers in Physiology* 5:309.
177. Viatchenko-Karpinski S, Korniyeyev D, El-Bizri N, Budas G, Fan P, Jiang Z, Yang J, Anderson ME, Shryock JC, Chang C-P, Belardinelli L, Yao L (2014). Intracellular Na⁺ Overload Causes Oxidation of CaMKII and leads to Ca²⁺ Mishandling in Isolated Ventricular Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 76:247–256.
178. Vollert JO, Möckel M (2016). Herzinsuffizienz: Pathophysiologie und Diagnostik. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M; Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage, Band 2. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.

179. Vornanen M (1992). Maximum heart rate of soricine shrews: correlation with contractile properties and myosin composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 262(5):R842-R851.
180. Wagner A (2005). Energy Constraints on the Evolution of Gene Expression. *Molecular Biology and Evolution* 22(6):1365–1374.
181. Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS (2013). Redox Regulation of Sodium and Calcium Handling. *Antioxidants & Redox Signaling* 18(9):1063–1077.
182. Warner Instruments LLC (2019). Oxygen Sensor (Model 1302). Online verfügbar unter <https://www.warneronline.com/oxygen-sensor-model-1302>, zuletzt geprüft am 06.01.2019.
183. Watkins H, Ashrafian H, Redwood C (2011). Inherited Cardiomyopathies. *The New England Journal of Medicine* 364(17):1643–1656.
184. Weber CR, Piacentino V, Houser SR, Bers DM (2003). Dynamic Regulation of Sodium/Calcium Exchange Function in Human Heart Failure. *Circulation* 108(18):2224–2229.
185. Weisser-Thomas J, Piacentino III V, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR (2003). Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 57(4):974–985.
186. Weiss RG, Gerstenblith G, Bottomley PA (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):808–813.
187. Wende AR, Abel ED (2010). Lipotoxicity in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801(3):311–319.
188. Williams GC (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11(4):398–411.
189. Wu S, Li Q, Du M, Li S-Y, Ren J (2007). Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 34(1-2):81–87.
190. Yamashita H, Sata M, Sugiura S, Momomura S, Serizawa T, Iizuka M (1994). ADP inhibits the sliding velocity of fluorescent actin filaments on cardiac and skeletal myosins. *Circulation Research* 74(6):1027–1033.
191. Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, Wang L, Xiao M (2014). Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PloS ONE* 9(9):e107447.

192. Yun J, Finkel T (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism* 19(5):757–766.
193. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P, The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (2000). Vitamin E Supplementation and Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *The New England Journal of Medicine* 342(3):154–160.
194. Zaha VG, Qi D, Su KN, Palmeri M, Lee H-Y, Hu X, Wu X, Shulman GI, Rabinovitch PS, Russell RR, Young LH (2016). AMPK is critical for mitochondrial function during reperfusion after myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91:104–113.
195. de Zeeuw S, Trines SAIP, Krams R, Verdouw PD, Duncker DJ (2000). Cardiovascular profile of the calcium sensitizer EMD 57033 in open-chest anaesthetized pigs with regionally stunned myocardium. *British Journal of Pharmacology* 129(7):1413–1422.
196. Zhang DX, Chen Y-F, Campbell WB, Zou A-P, Gross GJ, Li P-L (2001). Characteristics and Superoxide-Induced Activation of Reconstituted Myocardial Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels. *Circulation Research* 89(12):1177–1183.
197. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH (2004). Diastolic Heart Failure — Abnormalities in Active Relaxation and Passive Stiffness of the Left Ventricle. *The New England Journal of Medicine* 350(19):1953–1959.
198. Zoratti M, Szabò I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1241(2):139–176.
199. Zorov DB, Filburn CR, Klotz L-O, Zweier JL, Sollott SJ (2000). Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS Release: A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes. *Journal of Experimental Medicine* 192(7):1001–1014.
200. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews* 94(3):909–950.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Prozesse der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten	11
Abbildung 2: Mitochondriale Energetik	15
Abbildung 3: Reaktive Sauerstoffspezies und deren Metabolismus	19
Abbildung 4: Metabolische Veränderungen und deren Auswirkungen bei Herzinsuffizienz	25
Abbildung 5: Die grundlegende zelluläre Pathophysiologie bei Herzinsuffizienz	27
Abbildung 6: Gelelektrophorese zur Genotypisierung der Versuchstiere	45
Abbildung 7: Mitochondriale Atmungsmessung an einer Clark-Elektrode	49
Abbildung 8: Aufbau der modifizierten Langendorff Perfusionsanlage	54
Abbildung 9: Aufbau eines der laboreigenen IonOptix-Systeme.....	55
Abbildung 10: Setup der IonOptix-Systeme zur Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessung	56
Abbildung 11: Messprotokolle zur zellulären Kontraktilitäts- und Fluoreszenzmessung.....	60
Abbildung 12: Zelluläre Kontraktilitäts- und Autofluoreszenzmessung [NAD(P)H und FAD]	62
Abbildung 13: Analyse kardiomyozytärer Kontraktionstransienten	65
Abbildung 14: Atmungsmessung an kardialen mCAT-Mitochondrien.....	67
Abbildung 15: Superoxidproduktion von kardialen mCAT-Mitochondrien.....	68
Abbildung 16: H ₂ O ₂ -Produktion von kardialen mCAT-Mitochondrien	70
Abbildung 17: PTP-Assay an nativen und Cyclosporin A behandelten mCAT-Mitochondrien.....	71
Abbildung 18: PTP-Assay an nativen und H ₂ O ₂ behandelten Mitochondrien	73
Abbildung 19: Redoxstatus isolierter mCAT-Kardiomyozyten	74
Abbildung 20: Kontraktilität von nativen mCAT-Kardiomyozyten.....	76
Abbildung 21: Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion in mCAT-Kardiomyozyten	77
Abbildung 22: Kontraktilität von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten	79
Abbildung 23: Kontraktionskinetik von EMD behandelten mCAT- und WT-Kardiomyozyten.....	80

Abbildung 24: Reaktive Sauerstoffspeziesproduktion unter dem Calcium-Sensitizer EMD	81
Abbildung 25: Das redox-optimierte ROS-Gleichgewicht	85
Abbildung 26: Metabolische Folgen einer Ca^{2+} -Sensibilisierung	95

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien und Pipettierschema zur Proteinbestimmung	47
Tabelle 2: Verwendete Lichtfilter und Strahlenteiler des Epifluoreszenz- mikroskops	58

11 Publikationen

Eigene Vorträge:

Alscher F, Nickel A, Werner C, Kohlhaas M, Atighetchi S, Münker K, Bertero E, Rabinovitch P, Böhm M, Laufs U, Maack C. (2018). Aged mice overexpressing mitochondrial catalase (MCAT-tg) are protected from telomere-associated cellular senescence. *Clinical Research in Cardiology* 107(Suppl. 1):1 [Abstract: V1157].

12 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christoph Maack, der mir ermöglicht hat im Themenfeld der Herzinsuffizienz wissenschaftlich tätig zu werden. Vielen Dank für die immer zeitnahe und ausgezeichnete Beratung, Betreuung, Förderung und Hilfestellung während des gesamten Projektes.

Des Weiteren möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Durchführbarkeit von Experimenten im kardiologischen Forschungslabor in Homburg danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Alexander G. Nickel und Herrn Dr. Michael Kohlhaas, die mir immer mit ihrer großen Hilfsbereitschaft und exzellenten Betreuung zur Seite standen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Reinhard Kappl für die Umsetzbarkeit der Superoxid-Messungen in den Forschungsräumen der Biophysik danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe sowie dem gesamten Team des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere bei Michelle Gulentz und Nina Schnellbach, für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben und mir in allen Lebenslagen den Rücken freihalten.

13 Lebenslauf

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