Beeinträchtigt die zelltypspezifische Ausschaltung von MAO-B die Entwicklung einer Hypertrophie des rechten Ventrikels (RV) oder eines RV-Versagens bei pulmonaler Hypertonie?

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Paulin Brosinsky

aus Wettenberg

Gießen 2024

Aus dem Physiologischen Institut

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ivan Manzini

2. Gutachterin und Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Jacqueline Heger

Tag der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1
Abkürzungsverzeichnis 4
1. Einleitung 7
1.1 Pulmonale Hypertonie (PH) 7
1.2 Anatomie des Herzens - der rechte Ventrikel (RV) 9
1.3 Der RV und PAH 10
1.3.1 Pathophysiologie der Rechtsherzbelastung 11
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) 12
1.5 Mitochondrien und der myokardiale Energiestoffwechsel 14
1.6 Kardiale ROS-Produktion und Monoaminoxidasen (MAO) 16
1.7 Die Rolle von ROS bei Herzinsuffizienzen 19
1.7.1 ROS und Hypertrophie 20
1.8 MAOs und Hypertrophie 20
1.9 Zielsetzung 22
2. Material 25
2.1 Verbrauchsmaterial 25
2.2 Chemikalien 27
2.3 Injektionslösungen und Gase 28
2.4 Allgemeine Geräte 29
2.4.1 Kryoschnitte 30
2.4.2 Echokardiographie, PAB und Hämodynamik-Messungen 30
2.4.3 Hypertrophie-Nachweis 30
2.4.4 Isolierung von Mitochondrien 30
2.4.5 Mitochondrienfunktion 31
2.4.6 Proteinbestimmung 31
2.4.7 Kardiomyozyten-Isolierung und Kultivierung 32
2.4.8 Kontraktionsmessung von Kardiomyozyten 32
2.5 Computerprogramme 33
2.6 Puffer und Medien 34
2.6.1 Isolierung von Mitochondrien 34
2.6.2 ROS-Messung 34
2.6.3 Isolierung und Kultivierung von adulten Kardiomyozyten 35
2.6.4 Metabolom-Extraktion 36
2.6.5 Antikörper 36
2.7 Versuchstiere 36

3. Methoden 38
3.1 Pulmonalarterien *Banding* (PAB) Modell 38
3.2 Echokardiographie 40
3.3 Hämodynamische Messungen 42
3.4 Isolation von adulten rechtventrikulären Kardiomyozyten 43
3.4.1 Funktionsmessungen der isolierten RV-Kardiomyozyten 47
3.5 Isolierung von Mitochondrien aus rechten Ventrikeln 47
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Lowry: DC™ (detergent compatible) protein assay 48
3.5.2 Detektion von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies aus rechten Ventrikeln 49
3.6 Materialgewinnung für weitere Analysen 50
3.6.1 Nachweis von intrazellulärem ROS aus rechten Ventrikeln mittels DHE-Färbung 50
3.6.2 Metabolom-Analyse aus rechten Ventrikeln 51
3.6.2.1 Metabolom- Extraktion: 51
3.6.2.2 LC-MS/MS-Analyse: 51
3.6.3 Herstellung von Lysaten aus rechtsventrikulären Hälften der Septa 52
3.6.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay 53
3.6.4 Nachweis von Kinase-Aktivitäten aus den rechtsventrikulären Anteilen der Septa 53
3.6.5 Hypertrophie-Nachweis mittels Jess – Simple Western 54
3.7. Statistik 54
4. Ergebnisse 55
4.1 Hämodynamische Unterschiede zwischen SHAM und PAB 55
4.2 Effekte vom kardialen MAO-B Verlust auf die mitochondriale ROS-Produktion 56
4.3 Nachweis von intrazellulärem ROS nach PAB 58
4.4 Beurteilung der rechtsventrikulären Geometrie und Funktion als Reaktion auf Druckbelastung 59
4.5 Analyse des Schweregrads der Hypertrophie 62
4.7 Analyse der Metaboliten während PAB und die Rolle für MAO-B 63
4.8 Analyse der Kinase-Aktivitäten nach PAB 64
4.6 Auswirkung der Druckbelastung auf das kardiomyozytäre Kontraktionsverhalten 67
5. Diskussion 68
5.1 MAO und ROS 69
5.1.1 MAO und ihre Substrate 70
5.1.2 Intrazelluläres ROS 72
5.2 MAO und der RV 73
5.2.1 PAH-Induktion und MAO 73
5.3 MAO und Hypertrophie 76

5.4 MAO und Kardiomyozytenfunktion 79
6. Zusammenfassung 80
6.1 Summary 82
6.2 Ausblick 83
7. Abbildungsverzeichnis 88
8. Tabellenverzeichnis 93
9. Referenzen 94
Publikationen 113
Ehrenwörtliche Erklärung 114
Danksagung 115

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µ	Mikro
1N-Met	1-N-Methylhistamin
Bzw.	Beziehungsweise
ADP	Adenosindiphosphat
Ang II	Angiotensin II
AO	Aorta
ATP	Adenosintriphosphat
BMPR2	*Bone morphogenetic protein receptor 2*
BSA	Rinder-Serumalbumin
Ca^{2+}	Kalzium
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CI	*cardiac index*
CO	*cardiac output*
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Csk	C-terminale Src-Kinase
Da	Dalton
ddH_2O	doppelt-destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
e^-	Elektron
ECCPS	*Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System*
Echo	Echokardiographie
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
ESV	Endsystolisches Volumen
ETK	Elektronentransportkette
$FADH_2$	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FS	*fractional shortening*
g	Gramm

H^+	Proton
HI	Herzinsuffizienz
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
HR	*heart rate*
HRP	Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase)*
IVSd	*interventricular septum thickness in end diastole*
IVSs	*interventricular septum thickness in end systole*
JLU	Justus-Liebig-Universität
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kilo
KO	*knockout*
l	Liter
LA	Linkes Atrium
LHI	Linksherzinsuffizienz
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVIDd	*left ventricular internal diameter in end diastole*
LVIDs	*left ventricular internal diameter in end systole*
LVPWd	*left ventricular posterior wall thickness in end diastole*
LVPWs	*left ventricular posterior wall thickness in end systole*
LVV	LV-Versagen
m	Milli
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCT	Monocrotalin
Min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	pulmonalarterieller Druck
MPI	Max-Planck-Institut
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NE	Norepinephrin

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidasen
O_2	Sauerstoff
O_2-	Superoxid-Anionen
$OH^{\cdot}$	Hydroxylradikal
OP	Operation
PA	Pulmonalarterie
PAB	Pulmonalarterien *Banding*
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PH	Pulmonale Hypertonie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RA	Rechtes Atrium
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHI	Rechtsherzinsuffizienz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
RVEF	Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion
RVH	Rechtsventrikuläre Hypertrophie
RVID	*right ventricular inner diameter*
RVSP	*right ventricular systolic pressure*
RVV	RV-Versagen
RVWT	*right ventricular wall thickness*
SD	Standard deviation
SFK	*src-family protein tyrosine kinases*
STAT-3	*signal transducer and activator of transcription 3*
Su/Hx	Sugen/Hypoxie
SV	Schlagvolumen
TAC	Transversaler Aortenverengung (*transverse aortic construction*)
TAPSE	*tricuspid annular plane systolic excursion*
UCP	*Uncoupling protein*
VTI	*Velocity time integral*
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XO	Xanthinoxidase

1. Einleitung

Die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien nimmt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Herzerkrankungen ein. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH) und die Rechtsherzinfuffizienz (RHI) bei einer pulmonalen Hypertonie (PH) zählen zu diesen Erkrankungen. ROS Moleküle werden in verschiedenen Kompartimenten der Zelle gebildet, unter anderem in den Mitochondrien. Unter den ROS-bildenden mitochondrialen Proteinen sind, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Monoaminoxidasen (MAOs, Typ A oder B) in der Lage, Neurotransmitter abzubauen und dabei große Mengen an ROS zu produzieren. Bei Mäusen ist MAO-B die dominante Isoform, die in fast allen Zelltypen des Herzens vorkommt. Da es aktuell nur wenige Therapiemöglichkeiten für Patienten mit einer RVH und/oder RHI gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte eines induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen *Knockouts* (KO) von MAO-B (kmMAO-B KO) auf die Entwicklung von RVH und RHI in Mäusen untersucht.

1.1 Pulmonale Hypertonie (PH)

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache. Schätzungsweise sterben jährlich etwa 17,9 Millionen Menschen an einer solchen Erkrankung, was ungefähr 32% aller Todesfälle weltweit entspricht. Demnach kann es für Betroffene überlebenswichtig sein, Herz-Kreislauf-Erkrankungen möglichst früh zu erkennen und zu behandeln (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2021).

Eine Hypertonie (Bluthochdruck) zählt zu diesen Erkrankungen. Hiervon spricht man, wenn der Druck in den Blutgefäßen zu hoch ist (140/90 mmHg oder höher). Die WHO schätzt, dass rund 1,28 Milliarden aller Erwachsener zwischen 30 und 79 Jahren weltweit an Bluthochdruck leiden. Davon wurden weniger als die Hälfte (42 %) der betroffenen Menschen diagnostiziert und behandelt (WHO, 2023).

Die Krankheit pulmonale Hypertonie (PH) beschreibt einen pathologischen, hämodynamischen Zustand. Sie ist definiert über einen Druckanstieg im Lungenkreislauf, dabei übersteigt der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) 20-25 mmHg. Patienten und Patientinnen mit PH haben oftmals eine schlechte Prognose (Douschan et al. 2018; Strange

et al. 2019). Die PH wird in fünf Hauptgruppen unterteilt: PH durch Erkrankungen der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH), PH durch Erkrankung des linken Herzens und der Lunge, die chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) und PH aufgrund unklarer multifaktorieller Ursachen, einschließlich Sichelzellanämie und Sarkoidose (Maron 2023) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gemäß der WHO klassifizierten Hauptgruppen der Pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach (Jone et al. 2023)).

Pulmonale Hypertonie				
Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Pulmonal arterielle Hypertonie	Folge einer Linksherz-erkrankung	Folge einer Lungenerkrankung und/oder Hypoxie	CTEPH	Unklare multifraktionelle Mechanismen

• Idiopathisch (IPAH)
• Hereditär (HPAH)
• Medikamentenassoziiert (DPAH)
• Assoziiert mit
  • Bindegewebs-erkrankung
  • Portale Hypertension
  • Angeborenen Herzfehlern
  • HIV-Infektion
  • Schistosomiasis
• Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD)
	• Linksventrikuläre systolische oder diastolische Dysfunktion
	• Klappenfehler
		• Chronische obstruktive Lungenerkrank-ung (COPD)
		• Interstitielle Lungenerkrank-ung (ILD)
		• Alveoläre Hypoventilations-syndrom
			• Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
			• Verlegung der Lungenstrombahn durch andere Ursachen (beispielsweise Tumore, Entzündungen, Parasiten)
				• Hämatologische Erkrankungen
				• Systemische Erkrankungen
				• Metabolische Störungen
				• andere

Die erste Hauptgruppe, PAH, ist gekennzeichnet durch einen schweren Umbau der distalen Lungenarterien, einen erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand und eine rechtsventrikuläre Dysfunktion, die eine Herzinsuffizienz (HI) begünstigt (Maron and Galiè 2016). Eine verzögerte und/oder unvollständige Diagnose einer solchen Erkrankung ist häufig und wird bei bis zu 85 % der Risikopatienten verzeichnet (Deaño et al. 2013). PAH kann demnach eine tödliche Erkrankung sein, für die es bisher nur wenige Vorhersagemöglichkeiten für das Überleben der Betroffenen gibt (Maron et al. 2021).

1.2 Anatomie des Herzens - der rechte Ventrikel (RV)

Das Herz besteht aus vier Binnenräumen, zwei Kammern (Rechter und linker Ventrikel, RV und LV), zwei Vorhöfen (Atrien) und vier Herzklappen.
LV und RV weisen jedoch unterschiedliche embryologische Ursprünge auf. Der LV entwickelt sich zuerst, ausgehend vom primären Herzfeld. Anschließend entwickelt sich der RV aus Vorläuferzellen im sekundären Herzfeld. Außerdem unterscheiden sich die transkriptionelle Regulationen der Myoblastendifferenzierung der beiden Ventrikel (Srivastava and Olson 2000). Beispielsweise wird die Entwicklung der rechtsventrikulären Kardiomyozyten durch kammerspezifische Transkriptionsfaktoren wie dHAND und MEF2C gesteuert (Dodou et al. 2004; Archer et al. 2012). Im Gegensatz dazu, spielen bei der Entwicklung von linksventrikulären Kardiomyozyten Nkx2.3 und eHAND essenzielle Rollen (Srivastava and Olson 2000). Auch geometrisch unterscheidet sich der dünnwandige, sichelförmige RV vom eher kegelförmigen LV: der RV ist an den systemischen venösen Rückfluss und dem Lungenkreislauf gekoppelt und besteht so aus Einflussregion (Sinus) und Ausflussregionen (Conus), welche durch einen Muskelkamm, die Crista supraventricularis, getrennt sind (Bronicki and Baden 2010). Da der Druck im Lungenkreislauf in der Regel viel geringer ist als im systemischen Kreislauf, wird weniger Muskelkraft des RVs benötigt (ein Viertel der LV-Schlagleistung). Die Kontraktion (bestehend aus einer rhythmischen Abfolge von Systole und Diastole) des RVs beginnt am Einflussabschnitt und verläuft sich Richtung Ausflussregion. Der RV ist zudem um 10-15 % größer im Volumen als der LV, weist aber aufgrund der deutlich geringeren Drücke eine dünnere freie Wand (3 bis 5 mm beim Erwachsenen) und eine um ein Drittel bis ein Sechstel kleinere Masse auf (Dell'Italia 1991).
Eine umschlossene, oberflächliche Schicht aus RV-Myokardfasern steht in Kontinuität mit den LV-Fasern und bestimmt die systolische Bewegung der RV-freien Wand in Richtung des interventrikulären Septums während der Kontraktion. Die systolische longitudinale Verkürzung des RV wird von einer tieferen Schicht aus vertikal angeordneten RV-Fasern vermittelt und wird zum Beispiel in der Echokardiographie verwendet, um die RV-Funktion mittels systolischer Auslenkung der Trikuspidalklappe (TAPSE) zu analysieren. Die Trikuspidalklappe trennt das rechte Atrium (RA) vom RV und der Parameter TAPSE ermöglicht somit beispielsweise die Aufstellung einer Prognose bei Patienten mit PAH (Ryan and Archer 2014) (Abbildung 1).
Aufgrund seines größeren Volumens weist der RV bei gleichem Schlagvolumen eine im Vergleich zum LV geringere Ejektionsfraktion (EF) auf (Bhattacharya and Ellison 2024).

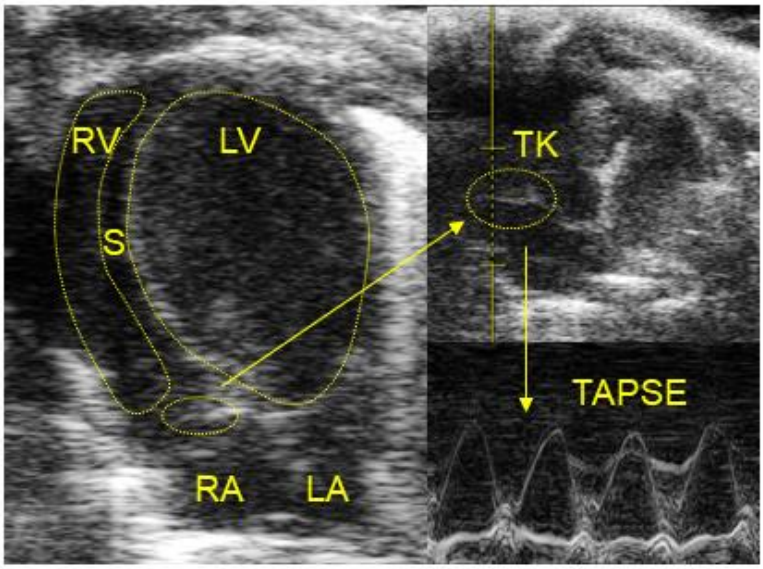


Abbildung 1: Anatomie des Herzens. Echokardiographische Aufnahme im Vierkammerblick. Mittels der systolischen Auslenkung der Trikuspidalklappe (TK), welche sich zwischen dem rechten Ventrikel (RV) und dem rechten Atrium (RA) befindet, wird die TAPSE ermittelt. Anhand dieser lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des RVs schließen (Höhe der Amplituden). Linker Ventrikel (LV), linkes Atrium (LA), Septum (S).

1.3 Der RV und PAH

Die Funktion des RVs spielt eine entscheidende Rolle bei der Prädiktion von Patienten mit Druckbelastung des rechten Herzens, wie bei der PAH (Sztrymf et al. 2010; Naeije and Manes 2014). Bei einer PAH unterscheidet sich das RV-Versagen (RVV) vom LV-Versagen (LVV) in der Ätiologie, der Prognose und den Therapiemöglichkeiten (Ryan and Archer 2014).
Die stationäre Mortalitätsrate bei PAH-Patienten liegt bei > 40 % aufgrund von RVV (Sztrymf et al. 2010; Campo et al. 2011) und nur bei 13-14 % aufgrund von LVV (Abraham et al. 2005). Trotz dieser Statistiken, stellt die Behandlung von RVV bis heute weiterhin eine große Herausforderung dar (Arrigo et al. 2019).
Verdeutlicht wird dies auch durch die unterschiedlichen Reaktionen der Ventrikel auf therapeutische Maßnahmen: während sowohl die LV-Funktion als auch die Prognose der Patienten mit linksventrikulärer Herzinsuffizienz durch ß-Blocker und Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) verbessert werden, haben beide therapeutischen Ansätze keine Verbesserung der RV-Funktion und Prädiktion bei Patienten mit Rechtsherzinsuffizienz gezeigt (Reddy and Bernstein 2015).
Im Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass Rattenventrikel unterschiedliche Mechanismen auf Stressreaktionen haben und daher die Notwendigkeit besteht, Ventrikel-spezifische Therapiestrategien zu untersuchen (Zungu-Edmondson and Suzuki 2016).

1.3.1 Pathophysiologie der Rechtsherzbelastung

Kommt es zu einer Veränderung des physiologischen Blutflusses durch die Lungenarterien, ist eine ausreichende Versorgung des Körpers mit Blut und Sauerstoff nicht mehr gewährleistet. Folglich entsteht ein Sauerstoffmangel (Hypoxie). Die Funktion des RVs spielt dabei eine entscheidende Rolle bei Patienten mit PAH. Herrscht ein Funktionsdefizit, steigt der Druck in den Lungenarterien, das Herz muss stärker arbeiten und es entsteht ein Rückstau des Blutes vor dem RV. Dadurch wird die Sauerstoffaufnahme in der Lunge vermindert. Um dem entgegen zu wirken, kommt es zu einer permanenten Zunahme der Wanddicke des Herzens (Hypertrophie), was wiederum dazu führt, dass die Herzleistung abnimmt. Um diese Wandspannung zu senken und die Herzfunktion zu bewahren, adaptiert der RV durch strukturelle Umbauprozesse (*Remodeling*). Dazu zählt die Verringerung des Durchmessers des Herzhohlraums oder dem Entgegenwirken der Dickenzunahme der Wand (Gesetz nach La-Place). Diese kompensatorische Hypertrophie sorgt also bei gesteigertem Druck für eine nahezu normale Wandspannung und damit für einen nahezu normalen Energiebedarf. Ein geringes Maß an Fibrosierung verhindert zudem die fortschreitende Dilatation des RV bei erhöhtem RV-Druck. Dieses Stadium der Erkrankung wird adaptive rechtsventrikuläre Hypertrophie (RVH) genannt und dient somit als Kompensation, um die Funktion des Herzens zu bewahren. Diese adaptive Herzhypertrophie wird über dehnungssensitive Ionenkanäle und Zelladhäsionsmolekülen in der Membran in Kardiomyozyten vermittelt und durch Botenstoffe verstärkt, die aus den betroffenen Zellen selbst (autokrin) oder benachbarten Zellen (parakrin) freigesetzt oder über die Blutbahn transportiert werden (neurohumuoral). Hält die Druckbelastung des RVs langfristig an, erschöpfen kompensatorische und gegenregulatorische Mechanismen. Die zunehmende myokardiale Fibrose, die rechtsventrikuläre Dilatation sowie strukturelle und metabolische Veränderungen der Kardiomyozyten tragen schließlich zum Rechtsherzversagen bei. Es entsteht eine so genannte Rechtsherzinsuffizienz (RHI), dem maladaptiven Stadium der RVH (Haddad et al. 2008; Bogaard et al. 2009; Piao, Marsboom, and Archer 2010; Ryan and Archer 2014; Lemay et al. 2021). Diese kann als Konsequenz einer PH zum Tod führen. Die RVH wird demnach über eine abnorme Vergrößerung oder pathologische Zunahme der Muskelmasse des RVs als Reaktion auf eine Druckbelastung charakterisiert (Bhattacharya and Ellison 2024) (Abbildung 2).

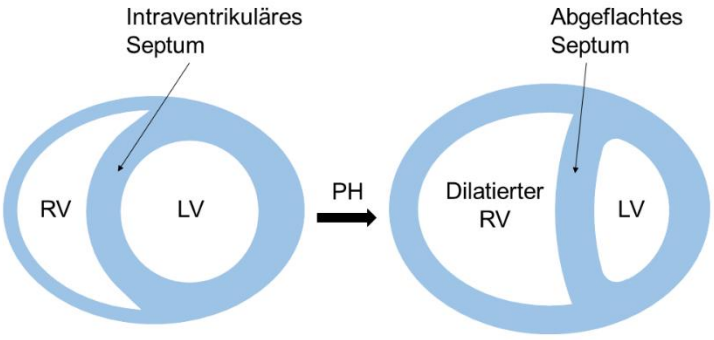


Abbildung 2: Schematische Abbildung der strukturellen Umbauprozesse nach pulmonaler Hypertension (PH). Die rechtsventrikuläre Hypertrophie spiegelt sich in einer Zunahme der rechtsventrikulären Wanddicke (der Dilatation) des rechten Ventrikels (RV) wider. LV (linker Ventrikel).

Obwohl für die Linksherzinsuffizienz (LHI) zahlreiche Therapiemöglichkeiten bestehen, gibt es aktuell nur wenige spezifische Interventionsmöglichkeiten für die RHI (Handoko et al. 2010; Arrigo et al. 2019).

Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird eine große Beteiligung an pathologischen Ereignissen im Herzen zugeschrieben, wodurch ihr Einfluss auch bei einer PH vermutet wurde. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen von ROS, insbesondere Superoxid, als Mediatoren für chronische Hypoxie-induzierte PH und rechtsventrikuläre Umbauprozesse gelten.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

In subzellulären Kompartimenten der Zelle, wie in den Mitochondrien, werden bei aeroben Stoffwechselprozessen hoch reaktive Sauerstoffderivate dauerhaft gebildet. Mitochondrien sind ovalförmige Zellorganelle und besitzen eine Doppelmembran. Zudem weisen sie eine Größe von ein bis fünf Mikrometer auf.
Auf der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die Elektronentransportkette (ETK). Innerhalb dieser findet die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung statt, wodurch die Mitochondrien ausschlaggebend für die Energiegewinnung innerhalb eukaryotischer Zellen sind. Während dieses Prozesses werden geringe Mengen an ROS als Nebenprodukt an den Atmungskomplexen I und III der ETK gebildet (Turrens 1997; H.-L. Lee et al. 2012).

Neben den Komplexen der ETK kann ROS noch von weiteren Enzymen gebildet werden. Beispielsweise den Monoaminoxidasen (MAOs), der Xanthinoxidase (XO), der entkoppelten Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (NOS), sowie der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (Balaban, Nemoto, and Finkel 2005; Murphy 2009).

Unter physiologischen Bedingungen wird ROS konstant, aber in kontrollierten Mengen freigesetzt. Demnach stehen Bildung und Abbau von ROS im Gleichgewicht, die Redox-Homöostase (Dröge 2002). Das Sauerstoffmolekül (O_2) verfügt über zwei ungepaarte Elektronen, die mit freien Elektronen reagieren und folglich zur ROS-Bildung führen können. Das Hydroxylradikal (OH·), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxid-Anionenradikal (O_2^-) und einige ihrer Stoffwechselprodukte zählen zu den ROS (Lambeth 2004).

Um die Zelle vor oxidativen Schäden zu schützen, müssen diese Radikale von antioxidativen Mechanismen der Zelle abgebaut werden. Darunter fallen enzymatische und nicht-enzymatische Systeme. Erstere bauen in zwei Reaktionen O_2^- zu H_2O_2 und anschließend zu H_2O und O_2 ab. Wichtige antioxidative Enzyme sind hierbei die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Nicht-enzymatische Systeme beinhalten neutralisierende Moleküle, welche direkt mit ROS reagieren, wie beispielsweise Vitamin E (alpha-Tocopherol), Betacarotin und Vitamin C (Ascorbinsäure) (Nordberg and Arnér 2001; Rodriguez et al. 2004) (Abbildung 3).

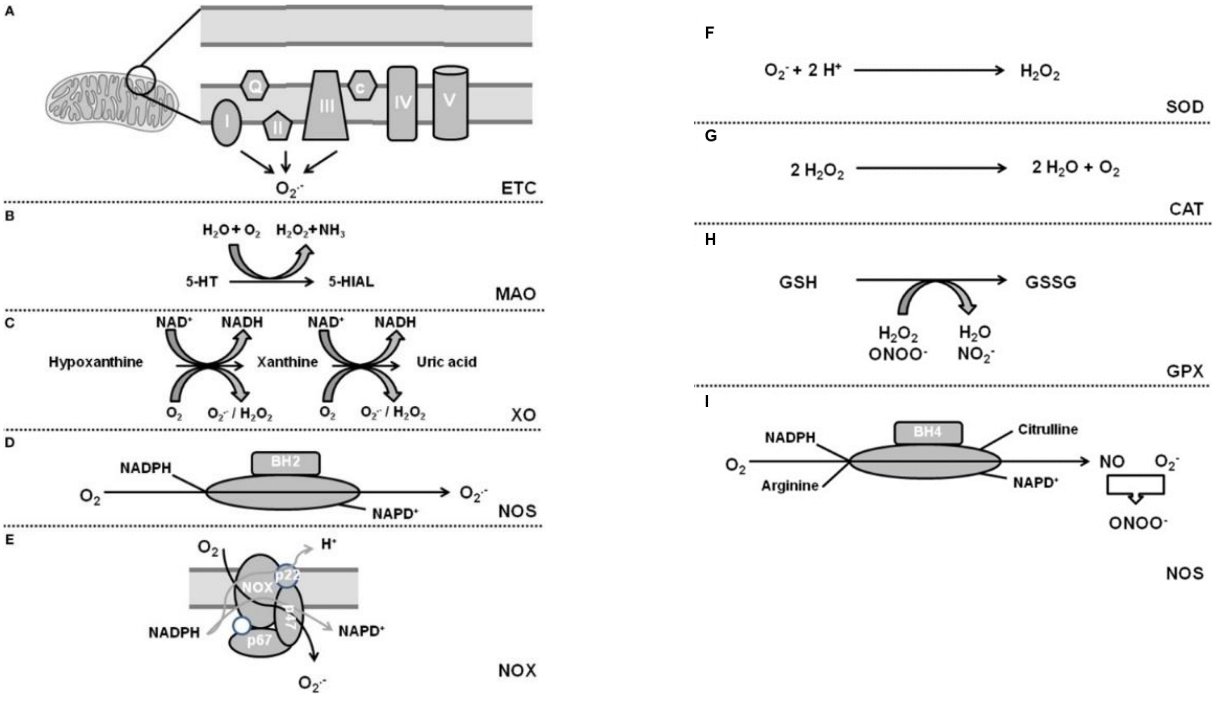


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Quellen und Abbausysteme von ROS modifiziert nach Schlüter et al., 2018. Die Komplexe I und III der mitochondrialen Elektronentransportkette produzieren kontinuierlich O_2^-, Komplex II kann durch NOX-abhängiges ROS aktiviert werden (**A**). Die Desaminierung von Monoaminen wie Serotonin (5-HT) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAL) wird von den Monoaminoxidasen (MAOs) katalysiert, was zur H_2O_2-Produktion führt (**B**). Die Xanthinoxidase (XO) katalysiert schrittweise die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure, welche H_2O_2 freisetzt (**C**). Durch das Entkoppeln der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) entsteht O_2^- als Nebenprodukt (**D**). Die NADPH-Oxidase (NOX) kann nach Aktivierung O_2^- generieren (**E**). Mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) wird die Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2 katalysiert (**F**), was wiederum von der Katalase (CAT) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgesetzt wird (**G**). Durch die Glutathion-Peroxidase (GPX) wird H_2O_2 reduziert und gleichzeitig Glutathion oxidiert (GSH zu GSSG) (**H**). Gekoppelte NOS generiert NO, welches O_2^- neutralisieren kann (**I**).

1.5 Mitochondrien und der myokardiale Energiestoffwechsel

Wie unter 1.4 bereits beschrieben, findet ein Großteil der zellulären Energiegewinnung in den Mitochondrien innerhalb der ETK durch die oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) statt. Für diesen Energiestoffwechsel werden in der Mitochondrienmatrix dauerhaft Reduktionsäquivalente, wie Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ($NADH+H^+$) und Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$), über den Citratzyklus gebildet und in die ETK geleitet.

Durch die mitochondriale Oxidation von überwiegend freien Fettsäuren (60-70 %), Glukose (35 %) sowie einem geringen Anteil von Aminosäuren, Laktat und Ketonkörpern (5 %), wird das Substrat Acetyl-CoA generiert, welches darauffolgend den Citratzyklus aktiviert (Huppelsberg and Walter 2013; Brenner et al. 2019). In diesem wird Acetyl-CoA final zu Kohlendioxid (CO_2) oxidiert. Während diesem Prozess binden Elektronen an die Reduktionsäquivalente NAD^+ und FAD^+ und gelangen anschließend als $NADH+H^+$ über den Komplex I (Nikotinamid-Adenin-Dinukleorid-Dehydrogenase) und als $FADH_2$ über den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) in die ETK (Heinrich, Müller, and Graeve 2014). Anschließend werden die Reduktionsäquivalente auf ein lipidlösliches Molekül der inneren Mitochondrienmembran, das Ubichinon (Coenzym Q), übertragen. Von dort gelangen die Elektronen über den Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) auf Cytochrom c und letztlich zu Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase). Hier werden die Elektronen schließlich an der Sauerstoffbindungsstelle aufgenommen und zu Wasser (H_2O) reduziert (Schartl et al. 2009). Durch den Elektronentransport der verschiedenen Komplexe gelangen Protonen (H^+) aus der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien. Dieser Transport hat zur Folge, dass ein

elektrochemischer Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird. Am Komplex V strömen die Protonen über die F_0-Untereinheit der F_1F_0-ATP-Synthase zurück in die Mitochondrienmatrix. An der F_1-Untereinheit dieser Synthase wird gleichzeitig die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat katalysiert. Der Energiestoffwechsel steht unter der Regulation von ADP und Kalzium (Ca^{2+}) und kann je nach Bedarf angepasst werden (Abbildung 4).

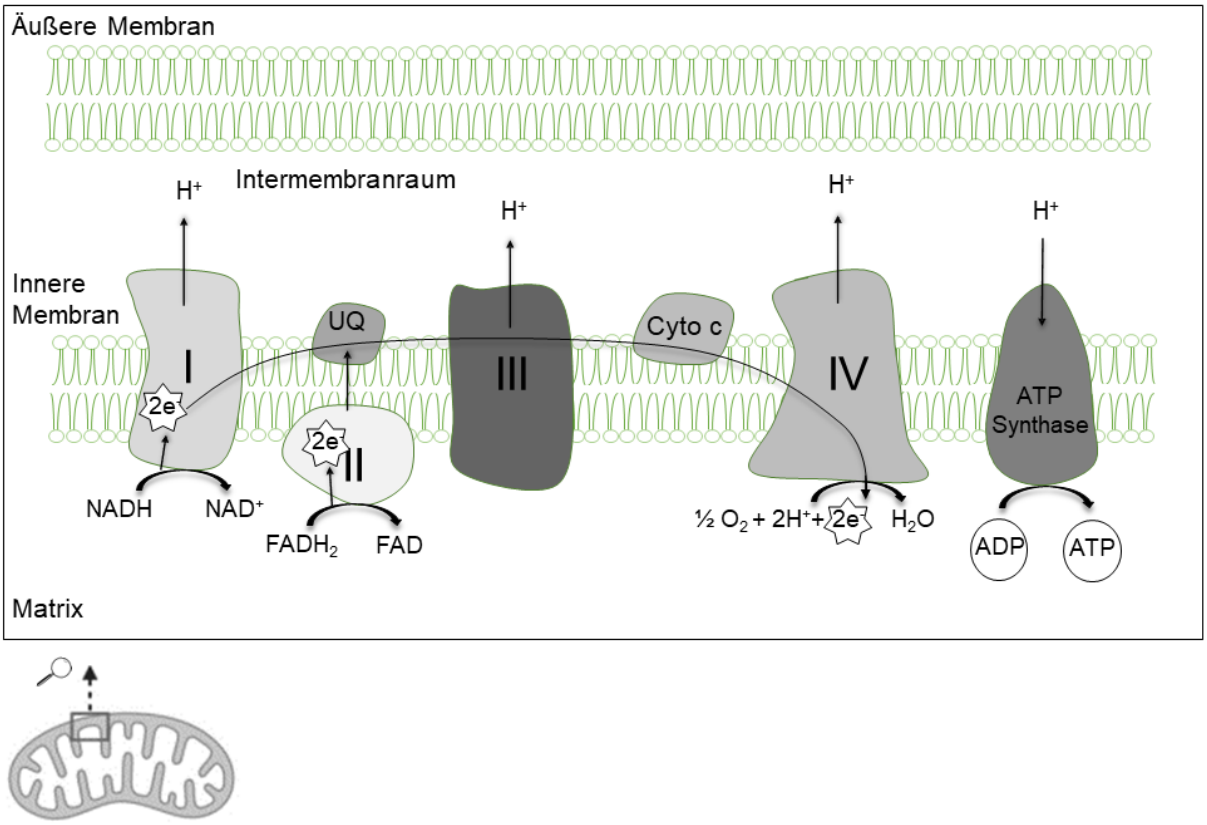


Abbildung 4: Mitochondriale Energiegewinnung. Elektronen ($2e^-$) werden über die Komplexe I-IV der Elektronentransportkette (ETK) geleitet und schließlich zu Wasser (H_2O) reduziert. Dadurch gelangen Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht. An der ATP-Synthase (Komplex V) strömen schließlich die Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix. Simultan dazu, wird an diesem Komplex Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) gewonnen. Komplex I (Nikotinamid-Adenin-Dinukleorid-Dehydrogenase), Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), Ubichinon (Coenzym Q), Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase), Sauerstoff (O_2), Cytochrom c (Cyto c), Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase), Komplex V (ATP-Synthase).

Das Herz ist das Organ mit dem höchsten Energiebedarf. Die hohe Stoffwechselaktivität des Herzmuskelgewebes (Myokard) bedingt dadurch den höchsten Mitochondrien-Anteil aller Organe im menschlichen Körper (Brown et al. 2017). Mit einem einzelnen Herzschlag werden ca. 2 % des zellulären ATPs verbraucht (Nickel, Löffler, and Maack 2013). Im Myokard eines gesunden Menschen entsprechen ca. 25 % des Zellvolumens den Mitochondrien (Schaper, Meiser, and Stämmler 1985) und etwa 80 % des gesamten Energiebedarfs ist auf den Querbrückenzyklus und die Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase zurückzuführen (Lang, Brandes, and Schmidt 2019).

1.6 Kardiale ROS-Produktion und Monoaminoxidasen (MAO)

Als Nebenprodukt des Energiestoffwechsels über die ETK werden ROS generiert, wodurch Mitochondrien ein starkes ROS-Signal innerhalb der Zelle produzieren (Turrens 1997; Murphy 2009; H.-L. Lee et al. 2012). Neben den Komplexen der ETK können weitere mitochondriale Proteine ROS freisetzen wie zum Beispiel p66shc und MAOs (Schulz and Schlüter 2023).

Obwohl p66shc, insbesondere in Stresssituationen zur Bildung von ROS beiträgt (J. Wu et al. 2014; Boengler et al. 2019), konnte eine Beteiligung von p66shc an der Entstehung der RHI durch Drucküberlastung ausgeschlossen werden (Hirschhäuser et al. 2020). Dies könnte zum Teil mit der geringen Expression dieses Proteins in Kardiomyozyten zusammenhängen (Obreztchikova et al. 2006).
Dennoch konnte gezeigt werden, dass das Abfangen von mitochondrialem ROS, durch den Einsatz des Antioxidans MitoQ, die Entstehung einer RHI durch Drucküberlastung reduzieren kann (Pak et al. 2018).
MAOs sind Proteine der äußeren Mitochondrienmembran und können ebenfalls erhebliche Mengen an ROS produzieren (Di Lisa et al. 2009). Diese Flavoenzyme sind für die oxidative Desaminierung von Neurotransmittern und Monoaminen verantwortlich. Sie nutzen den Redox-Cofaktor FAD zur Katalyse des oxidativen Abbaus von Katecholaminen zu H_2O_2, Aldehyden und Ammoniak (Aljanabi et al. 2021; Peoples et al. 2019). Neben ROS können demnach auch reaktive Aldehyde, wie z. B. 4-Hydroxynonenal, als Nebenprodukt des Katecholaminstoffwechsels durch Cardiolipin-Peroxidation in Mitochondrien der Kardiomyozyten gebildet werden (Abbildung 5).

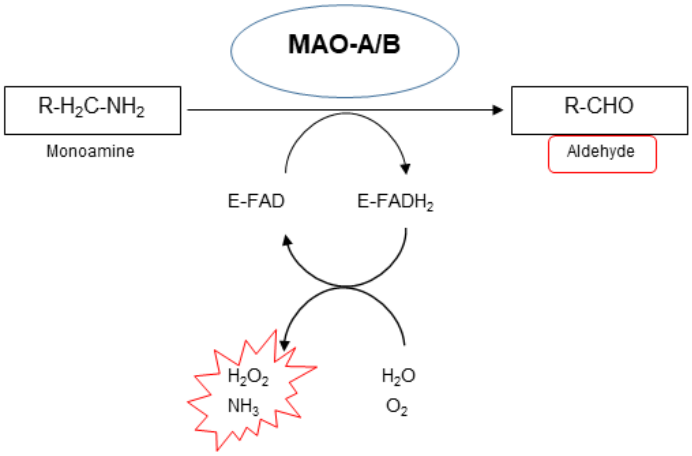


Abbildung 5: Reaktionsschema der oxidativen Desaminierung von Monoaminen, katalysiert durch MAOs. Die Bindung eines Monoamins an das Flavoenzym E-FAD führt zur Reduktion des Flavins-Adenin-Dinukleotid (FAD) zum Cofaktor $FADH_2$, wobei die entsprechenden Aldehyde, Ammoniak und ROS (H_2O_2) als Nebenprodukte entstehen.

Diese FAD-abhängigen Enzyme liegen in zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B vor, welche eine 92 %ige Sequenz-Übereinstimmung aufweisen (Bach et al. 1988; Edmondson et al. 2004). Beide Isoformen nutzen Katecholamine als Substrat wohingegen MAO-A bevorzugt Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin oxidiert und MAO-B Dopamin, Histamin bzw. ein Zwischenprodukt dessen, Ethanolamin (Edwards 1978) und β-Phenylethylamin (PEA). Während Histamin selbst nicht durch MAO-B metabolisiert wird (Costini et al., 2018), wird das Zwischenprodukt 1-N-Methylhistamin (1N-Met), gebildet durch das Enzym Histamin-N-Methyltransferase (HNMT), von MAO-B oxidativ zu N-Methyl-Imidazol-Acetaldehyd desaminiert (Maintz und Lovak, 2007). PEA hingegen ist ein biogenes Amin und ein spezifisches Substrat für MAO-B (Grimsby et al. 1997; Maggiorani et al. 2017). Außerdem weisen die MAOs unterschiedliche Inhibitor-Sensitivitäten auf, MAO-A wird durch Clorgylin gehemmt, MAO-B durch Selegilin (Grimsby et al. 1997; Maggiorani et al. 2017) und beide durch Pargylin (Kaludercic, Carpi, et al. 2014).

Beide Oxidasen werden vorrangig im Gehirn exprimiert. Der zügige Abbau von Monoaminen im Gehirn wie beispielsweise Serotonin, Noradrenalin oder Dopamin ist essenziell für die korrekte Funktion der synaptischen Neurotransmissionen. Monoaminerge Signalübertragung gilt als einer der Schlüsselmechanismen für die Modulation von Stimmung und Emotion sowie für die Steuerung motorischer, wahrnehmungsbezogener und kognitiver Funktionen. Somit hat sich die MAO-Hemmung als therapeutisches Mittel bei beispielsweise Depressionen und Parkinson-Erkrankungen erwiesen (Youdim and Bakhle 2006; Bortolato, Chen, and Shih 2008).

Zudem werden MAOs aber auch stark in Leber, Magen, Nieren und dem Herzen exprimiert (Saura et al. 1996; Rodríguez et al. 2001). Besonders MAO-B konnte in hohen Mengen im Myokard von Maus und Mensch nachgewiesen werden (Dorris 1982; Sivasubramaniam et al. 2003). Somit sind MAOs neben der ETK wichtige Akteure bei der kardialen ROS-Produktion (Abbildung 6).

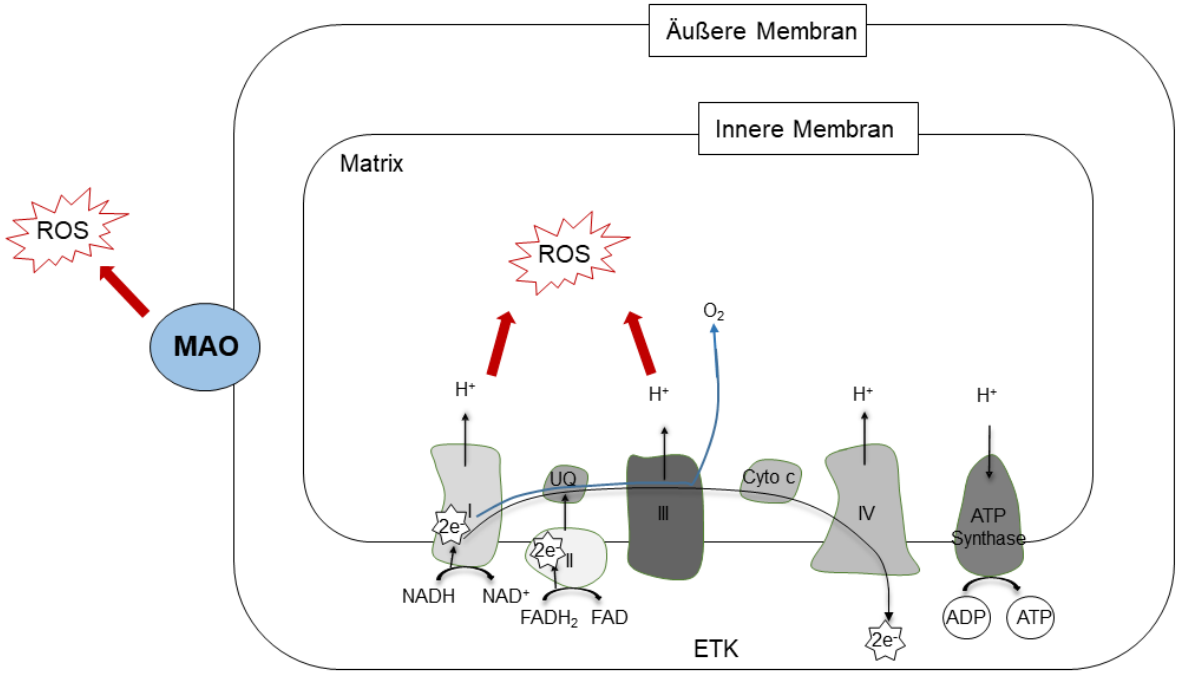


Abbildung 6: Schematische Darstellung der mitochondrialen ROS-Produktion. Die Monoaminoxidasen (MAOs) sind an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Durch den Abbau von MAOs zu Aldehyden entstehen ROS in Form von H_2O_2 als Nebenprodukt. Auf der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die Elektronentransportkette (ETK) bestehend aus den Komplexen I bis V. Elektronen werden über die Atmungskette übertragen, wodurch Protonen (H^+) an den Komplexen I, III und IV in den Intermembranraum gelangen, was wiederum ein Membranpotential erzeugt. Dieser Protonengradient wird von Komplex V, der ATP-Synthase, genutzt um ATP aus ADP und Phosphat zu katalysieren und Protonen zurück in den mitochondrialen Matrixraum zu leiten. Während des Elektronentransfers erzeugen die Komplexe I, II und III ROS in Form von Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

1.7 Die Rolle von ROS bei Herzinsuffizienzen

ROS fungieren als wichtige kardiomyozytäre Signalmoleküle unter physiologischen Bedingungen. Sie sind beispielsweise an der Regulation von Entwicklung und Reifung der Kardiomyozyten beteiligt, sowie am Kalziumstoffwechsel (Peoples et al. 2019). Jedoch auch unter pathologischen Bedingungen spielen ROS eine entscheidende Rolle. Sind die Bildung und der Abbau von ROS im Ungleichgewicht, kann dies zu oxidativem Stress der Zellen führen (Giordano 2005) (Abbildung 7). Folglich kann die exzessive ROS-Freisetzung Proteine reversibel oder irreversibel schädigen. Dazu zählt die Modifikation der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten (Sharma und Kass, 2014), ventrikuläre Umbauprozesse, Induktion einer Fibrose (Qipshidze et al. 2012) oder die irreversible Zellschädigung (Zorov et al., 2000). Außerdem können ROS-Moleküle indirekt als sekundäre Botenstoffe hypertrophe Signalwege des Herzens aktivieren (Sabri, Hughie, and Lucchesi 2003; Bogaard et al. 2009).

Somit ist der ROS-bedingte oxidative Stress an einer Reihe von Herzkrankheiten wie der kardialen Hypertrophie (Sawyer et al. 2002; Maulik and Kumar 2012), der Entstehung einer Herzinsuffizienz (Tsutsui, Kinugawa, and Matsushima 2011), oder den durch Ischämie und Reperfusion induzierten Schädigungen (Misra et al. 2009) beteiligt.

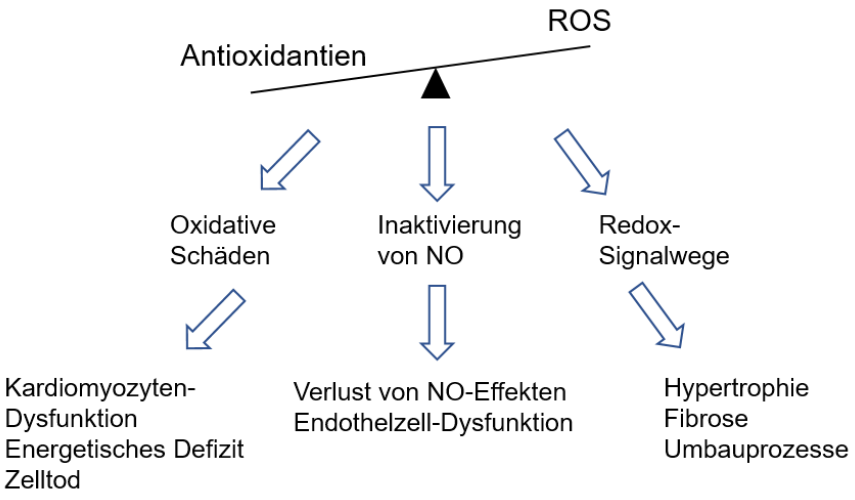


Abbildung 7: Schematische Darstellung vom Ungleichgewicht der Redox-Homöostase und die pathophysiologischen Effekte bei Herzinsuffizienz. Oxidativer Stress entsteht, wenn ROS (reaktive Sauerstoffspezies) mehr produziert als abgebaut werden. Als Resultat folgen eine Vielzahl von pathologischen Ereignissen, sowie der Verlust von NO (Stickstoffmonoxid), welches O_2^- neutralisieren kann.

1.7.1 ROS und Hypertrophie

Wie unter 1.7 erwähnt, kann ROS Hypertrophie-assoziierte Signalwege im Herzen beeinflussen (Seko et al. 1997; Clerk et al. 1998; Kulisz et al. 2002). Die pathologischen Auswirkungen von zellulärem Stress bestehen aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Akteure.
Die Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK - Signalwege stellen eine wichtige Signaltransduktionskaskade dar, die viele Signalwege regulieren können. Auch bei der kardialen Hypertrophie nimmt diese Kaskade bekannterweise eine entscheidende Rolle ein. Die Proteinkinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase* 1/2), JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) oder p38 werden durch MAPK 1/2 (*Mitogen-activated protein kinase*) phosphoryliert und aktiviert, die wiederum durch eine oder mehrere der RAF-Kinasen (RAF1, BRAF, ARAF) phosphoryliert werden (Yibin Wang 2007; Durrant and Morrison 2018). Viele der Kinasen gelten als Redox-sensitiv und stehen in Verbindung mit der Inflammation sowie der Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten (Moldogazieva et al. 2018; Wen et al. 2019; Aikawa et al. 2001; Tu, Bahl, and Chen 2003).

1.8 MAOs und Hypertrophie

Da die Aktivität von MAO mit oxidativem Stress in Verbindung steht, erscheinen sie als entscheidende Faktoren bei pathologischen Zuständen im Herzen. Neben der pharmakologischen Inhibition der MAO-Aktivitäten (Antonucci et al. 2021), wurde auch die Expression der MAO mittels Gen-*Targeting* reduziert. Mäuse, die eine MAO-A-Aktivität von nur 8 % der Norm aufwiesen, erreicht durch die Expression eines dominant-negativen MAO-A-Konstruktes (MAO-A^{neo}), zeigten eine geringere LVH nach transversaler Aortenverengung (TAC) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem konnte in MAO-A^{neo}-Mäusen schon vor der TAC-Operation eine Reduktion der LV-Funktion verzeichnet werden. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Noradrenalin-induzierte Hypertrophie durch MAO-A-generiertes ROS vermittelt wurde (Kaludercic et al. 2010). Mialet-Perez et al. konnte zudem die myokardiale Quelle von ROS durch MAO-A nachweisen: In Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit beeinflusst MAO-A die Zellproliferation, Hypertrophie und Apoptose (Mialet-Perez et al., 2007). MAO-abhängiger oxidativer Stress führte außerdem zur Mastzelldegranulation und kardialer

Fibrose in Streptozotocin-behandelten Mäusen, was letztlich zu einer diastolischen Dysfunktion in diesem Typ-1-Diabetes-Mausmodell führte (Deshwal et al., 2018).

Bei kürzlich erschienenen Arbeiten aus Ratten führte eine PH nach Monocrotalin-Injektion (MCT) (van Eif, Bogaards, and van der Laarse 2014), Sugen5416/Hypoxie (Su/Hx) oder Pulmonalarterien *Banding* (PAB) (Sun et al. 2021) zu einer Hochregulierung der MAO-A-Expression im Lungengefäßsystem und dem RVV. Eine Clorgylin-Behandlung zur Blockierung der MAO-A reduzierte die RV-Nachlast und den pulmonalvaskulären Umbau bei Sugen/Hypoxie-Ratten durch verringerte pulmonalvaskuläre Proliferation und oxidativen Stress. Dies führte zu einer verbesserten RV-Festigkeit und -Relaxation sowie einem Rückgang der RVH. Bei Ratten mit PAB hatte Clorgylin keine direkte Auswirkung auf den RV (Sun et al. 2021). Bei Mäusen mit einem dauerhaften Kardiomyozyten-spezifischem *Knockout* (KO) von MAO-A war das Auftreten von Katecholamin-induzierten Arrhythmien reduziert (Shi et al. 2024).

Bei Herzen, in denen mittels TAC-Operation eine LVH induziert wurde, verhinderte das globale Fehlen von MAO-B eine linksventrikuläre Dilatation sowie eine kardiale funktionelle Dekompensation im Vergleich zu Kontrollmäusen. Außerdem waren bei MAO-B-KO Tieren die Druckverhältnisse basal reduziert, die Herzfunktion verändert und eine β-adrenerge Desensibilisierung konnte beobachtet werden. Wie Kaludercic zeigte, führt die globale Hemmung von MAO-B auch zu einer verringerten H_2O_2-Produktion (Kaludercic, Carpi, et al. 2014). Ein Mangel an Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B resultierte in einer reduzierten linksventrikulären Infarktgröße *in vitro* (Heger et al. 2021) und *in vivo* (Heger et al. 2023). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die MAO-B-Aktivität in Kardiomyozyten zur akuten Schädigung des Herzens infolge von Ischämie und Reperfusion beiträgt. Informationen über die Bedeutung von Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B bei RV-Erkrankungen sind derzeit nicht vorhanden.

Während die Bedeutung von MAOs für die Pathophysiologie linksventrikulärer Erkrankungen gut belegt ist (Deshwal et al. 2017; 2018; Antonucci et al. 2021; Kaludercic, Arusei, and Di Lisa 2023), liegen kaum Daten zu ihrer Bedeutung für RV-Erkrankungen vor. Jedoch gibt es Andeutungen für die Beteiligung von MAOs an einer PH (Sommer and Schulz 2021).

In den vorangegangenen Arbeiten zu MAOs und der kardialen Hypertrophie wurden bisher nur Tiermodelle mit einem globalen *Knockout* der MAO-Isoformen untersucht. Daher existieren nur Daten zur Rolle von globalen MAO-A (Kaludercic et al. 2010) als auch von MAO-B (Kaludercic, Carpi, et al. 2014) im Zusammenhang mit einer LVH. Wie oben beschrieben, wurden in beiden Tiermodellen allerdings schon unter basalen Bedingungen strukturelle und

funktionelle Auswirkungen auf das Herz beobachtet. Durch das globale Fehlen einer der Isoformen fand keine oxidative Desaminierung der jeweiligen Substrate seit Geburt der Tiere statt, was zu einem Anstieg der Katecholamin-Konzentration führte. Daher wäre die Untersuchung der kardialen Hypertrophie anhand eines Tiermodells mit einem induzierbaren, Kardiomyozyten-spezifischen *Knockout* geeigneter (Kaludercic, Mialet-Perez, et al. 2014).

Aktuellere Arbeiten verdeutlichten erstmals die Effekte vom Kardiomyozyten-spezifischen Fehlen einer der Enzyme. Wie bereits oben erwähnt, wurde der Kardiomyozyten-spezifische KO von MAO-A in Bezug auf Arrhythmien beschrieben (Shi et al. 2024). Darüber hinaus liegen Daten zum Kardiomyozyten-spezifischen KO von MAO-B und dem Myokardinfarkt vor (Heger et al. 2021; 2023). Untersuchungen einer RVH sind generell selten und die Beteiligung von MAOs aus Kardiomyozyten ist unerforscht.

Um die Rolle von MAO-B in Kardiomyozyten bei einer RVH zu analysieren, wurde in dieser Arbeit erstmalig der Kardiomyozyten-spezifische KO von MAO-B im PAH-Modell verwendet.

1.9 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B KO die Ausprägung einer RVH reduzieren kann.

Das Enzym MAO-B wird neben dem Gehirn vorrangig im Myokard von Maus und Mensch exprimiert (Dorris 1982; Sivasubramaniam et al. 2003) und ist bekannterweise an der Entstehung von oxidativem Stress beteiligt (Mialet-Perez et al. 2007; Di Lisa et al. 2009; Kaludercic et al. 2010).

Die Hemmung von MAO-B reduzierte die ROS-Bildung im Herzen und verringerte die linksventrikuläre Dilatation und das Ausmaß der Dekompensation nach einer LVH (Kaludercic, Carpi, et al. 2014). Außerdem reduzierte das Kardiomyozyten-spezifische Fehlen von MAO-B die Infarktgröße (Heger et al. 2021; 2023).

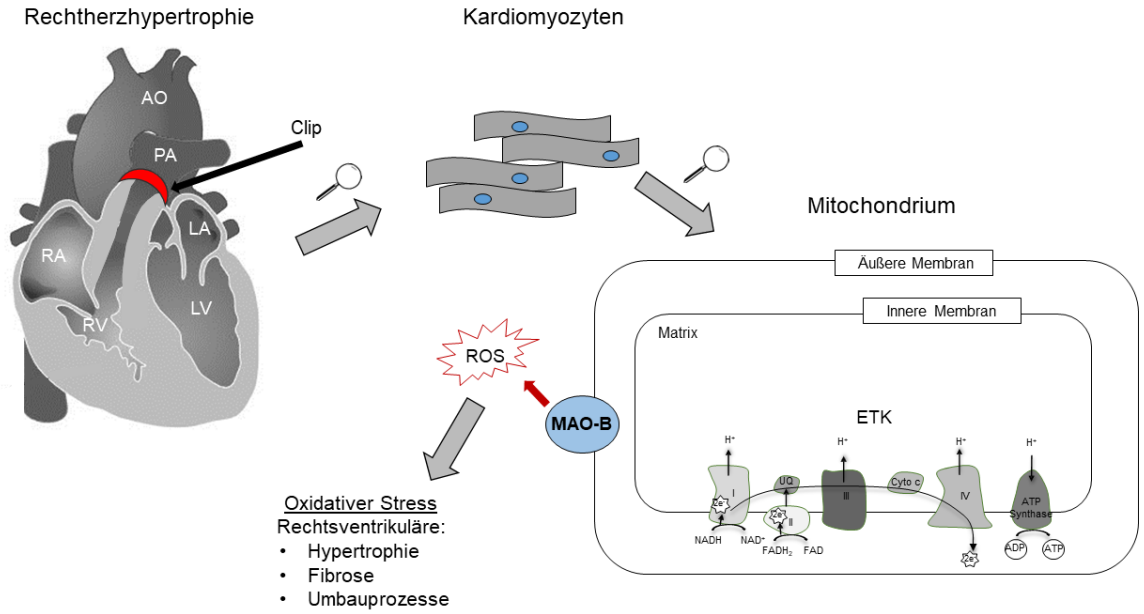
Basierend auf den obigen Arbeiten wurde daher innerhalb dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass ein Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B KO positiven Einfluss auf die Entstehung einer RVH hat (Abbildung 8).

Um dies zu untersuchen, wurde die zuvor etablierte Mauslinie des Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B KOs verwendet (Heger et al. 2021; 2023). Um die Pathophysiologie einer RVH zu untersuchen, wurde das Pulmonalarterien *Banding* (PAB) Verfahren durchgeführt.

Dabei wird mittels eines Clips die Pulmonalarterie verengt, was eine Druckbelastung des RVs zufolge hat und somit die pathologischen Abläufe einer RVH simuliert.

Zur Analyse wurden *in vivo* (Echokardiographie, Operationen und rechtsventrikuläre Katheterisierung) und *ex vivo* Versuche (Kontraktionsanalysen von isolierten Kardiomyozyten) durchgeführt. Zudem wurde intrazelluläres ROS detektiert, sowie Metabolom-Analysen und ein Kinase-Assay durchgeführt.

(A)



(B)

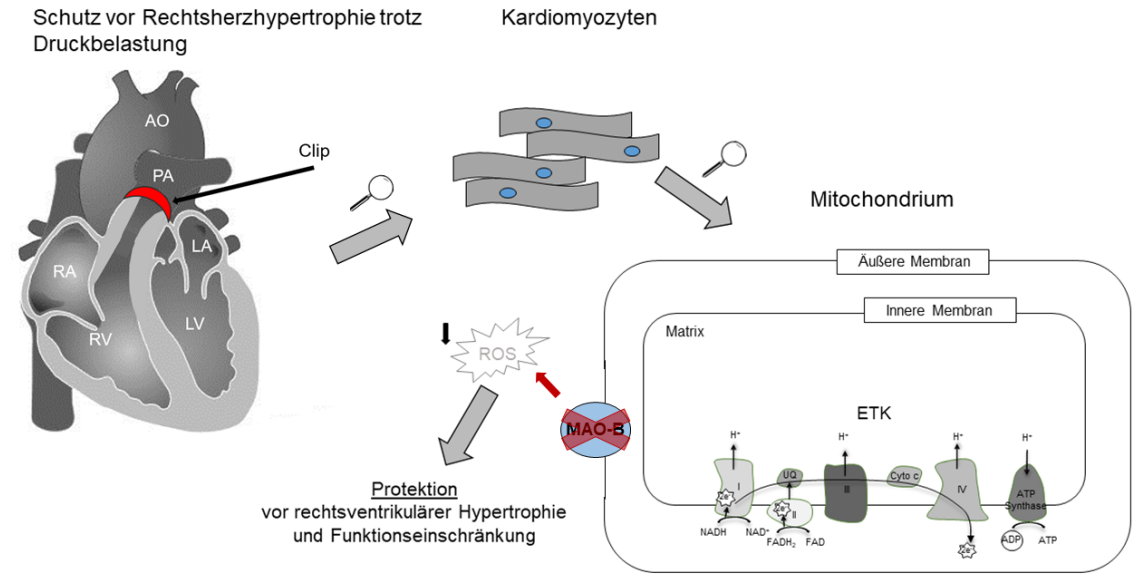


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. Das Pulmonalarterien *Banding* (PAB) Modell wird genutzt, um die Situation einer Druckbelastung mit nachfolgender Hypertrophie des Herzens zu simulieren.

Dazu wird der pulmonale Fluss mithilfe eines Clips eingeschränkt und eine starke Druckbelastung des RV induziert. Unter physiologischen Zuständen kommt es zu einer gesteigerten ROS-Produktion der Monoaminoxidasen (MAOs), welche auf der äußeren Mitochondrienmembran in Kardiomyozyten lokalisiert sind. Folglich entsteht oxidativer Stress im rechtsventrikulären Gewebe, welcher in ventrikulären Umbauprozessen, einer Fibrose und Hypertrophie endet (**A**). Wird das PAB Modell bei Mäusen mit einem Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B KO durchgeführt, so die Hypothese, wird das Herz gegenüber einer Hypertrophie und Dysfunktion geschützt (**B**). AO: Aorta, PA: Pulmonalarterie, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, ETK (Elektronentransportkette).

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Name	**Firma**
Greiner Microplate 96-Well, U-Shape	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
96F Nunclon Delta White MicroWell	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Automatische Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Artelac® Lipids Augentropfen	Dr. Gerhard Mann - Chemisch-pharmazeutische Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland
Aquagel® Lubricating Gel	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, USA
Aquasonic Clear® Ultrasound Gel	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, USA
BD MicrolanceTM 3 Kanülen: 27 G ¾, 0.40 x 19 mm, grau; 20 G 1½, 0.9 x 40 mm, gelb; 26 G 1½, 0.45 x 13 mm, braun: 25 G 1, 0,5 x 25 mm, orange; 30 G ½, 0.30 x 13 mm, gelb	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD INTRAMEDIC™ Polyethylene Tubing PE# 190	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD INTRAMEDIC™ Polyethylene Tubing PE# 240	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Braunol®	B. Braun Melsungen, AG Melsungen, Deutschland
Cellstar Pipetten (10 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes conical bottom (15 ml, 50ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cryo Pure Gefäße, 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Edisonite® Classic	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Einmalskalpell Nr. 11 und 21	Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japan
Einmalspritzen Inject Luer®, 1 ml, 2 ml, 5 ml,10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen, AG Melsungen, Deutschland
Einmalzellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Enthaarungscreme silky fresh	Veet, Heidelberg, Deutschland

Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Inc., USA
Hamilton™ 20-Gauge Nadel	Hamilton Germany GmbH, Planegg-Martinried, Deutschland
Keramikkügelchen	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Medizinisches Klebeband	3M Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Mullkompressen	Fuhrmann®, Much, Deutschland
Objektträger Menzel-Gläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	Bemis Company Inc., Rheinbach, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Raucotupf®	Lohmann& Rauscher International, Rengsdorf, Deutschland
PCR Reaktionsgefäß 0,2 ml	Nerbeplus, Winsen, Deutschland
Prolene 6-0, steriles, monofiles, nicht resorbierbares, chirurgisches Nahtmaterial	Ethicon, Lidingö, Schweden
Reaktionsgefäße safe seal 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Seraflex Nahtmaterial	Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila
Spectra 360 Elektroden-Gel	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius Group, Göttingen, Deutschland
Teflongefäß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Inc., Torrance, USA
Tupfer	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Vasofix® Safety 14 Gx2", 2.2x50 mm, Braunüle, 20 Gx1¼", 1.1x33 mm Braunüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
WECK Hemoclip® small titanium ligating clips	Edward Weck, Research, Triangle Park, NC, USA
Zentrifugenröhrchen mit konischem oder rundem Boden	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland oder Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.2 Chemikalien

Substanz	**Firma**
AccQ-Taq Derivatization Kit	Waters™, Milford, USA
Adenosintriphosphat (ATP)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Amplex Ultra Red reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Ascorbat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protein-Assay Kit	Pierce™ Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DC Protein Assay (Lowry)	Bio-Rad, München, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′- tetraessigsäure (EGTA)	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA frei	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, USA
Laminin	Roche, Mannheim, Deutschland
L-Glutaminsäure Kaliumsalz Monohydrat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Lowry: DC™ (detergent compatible) protein assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Callbiochem, La Jolla, CA, USA
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Malat	SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP)	Roche Diagnostics, Grenzach, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mitochondrienisolierungskit	Miltenyi Biotec B.V. Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
M-PER™ Extraktions-Reagenz für Säugetiere	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
M-PER™ Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, 10.000 U/ml)	Gibco by Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
Precellys® Keramik-Kit 1,4 mm	PEQLAB, TH.Geyer GmbH, Renningen, Deutschland
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffchlorid (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3 Injektionslösungen und Gase

Substanz	**Firma**
Buprenorphin	Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Isofluran	Forene® Abbott, Wiesbach, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland
Ventilationsgas 50 % O_2, 50 %N_2	Air Liquid, Siegen, Deutschland
Ventilationsgas, 100 % O_2	Air Liquid, Siegen, Deutschland

2.4 Allgemeine Geräte

Name	**Firma**
Feinwaage AE 200	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Bauchdeckenschere gebogen, 160 mm	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Exsikkator	Duran Group, Wertheim, Deutschland
Grill-Arruga-Kolibri Kapselpinzette	Eickenmeyer, Tuttlingen, Deutschland
Hamilton® Microliter™, 25 µl Spritze	Hamilton Germany GmbH, Planegg-Martinried, Deutschland
Ligating Clip Applier Hemoclip®	Edward Weck, Research, Triangle Park, NC, USA
HeraSafe Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Krokodilklemme	Eickenmeyer, Tuttlingen, Deutschland
Mikro-Nadelhalter, gerade, w/Lock 9 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
M60 Stereomikroskop	Leica, Frankfurt a.M., Deutschland
PB3001 (Waage)	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Perfusor Spritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
pH 211R Microprosser pH metern	Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland
Pinzette, Semken, gebogen, 1,3 x 1 mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzetten: Moria MC31 Forceps gebogen; Graefe - 0.8 mm, gebogen und gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen, blau, gelb, weiß	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Präparierschere klein und groß, 170 mm	Aesculap, Tuttlingen, Deutschlan
Precellys® 24 Homogenisator	Avantor™, Darmstadt, Deutschland
Schere	Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen, Deutschland
Schere, klein, spitz, gerade, 9,5 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Springschere, 8mm Schneidekante	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Student Vannas Spring Schere, 5 mm Schneidekante	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland

2.4.1 Kryoschnitte

Gerät	Firma
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

2.4.2 Echokardiographie, PAB und Hämodynamik-Messungen

Gerät	Firma
1.4F Mikronanometer Druckkatheter	Millar Instruments, Houston, USA
Heizplatte	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Heizplatte ML295/M-220	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Kaltlichtlampe KL-200 LED	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica M50 Operationsmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mini Vent Type 845	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur GmbH, March, Deutschland
MPVS-Ultra Single Segment Foundation System	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Rektalthermometer	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Schwebekörper Durchflussmesser PMR1-012148	Aalborg Instruments & Controls, Inc., Orangeburg, USA
Table Top Laboratory Animal Anesthesia System	VetEquip Inc, Pleasanton, USA
Thermasonic® Gel Warmer	Parker Laboratories, Inc., Fairfield, USA
Vevo2100 High-Resolution Imaging System mit 30 MHz Schallkopf	VisualSonics, Toronto, Kanada

2.4.3 Hypertrophie-Nachweis

Gerät	Firma
Jess-Simple Western System	ProteinSimple, San Jose CA, USA

2.4.4 Isolierung von Mitochondrien

Gerät	Firma
AllegraTM 64R Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heraeus Biofuge Primo R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
IKA® T25 digital Ultra-Turrax (Dispergiergerät)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Microfuge® 18 Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
OptimaTM MAX Ultrazentrifuge 130,000 RPM	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Potter-Elvejhem tissue homogenizer (1 ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Potter-Elvejhem tissue homogenizer (5 ml)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland

2.4.5 Mitochondrienfunktion

Gerät	**Firma**
Cary Eclipse Spektrophotometer	Agilent, Santa Clara, USA
Mini-Vac eco	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.4.6 Proteinbestimmung

Gerät	**Firma**
Infinite® M200 Pro Multimode Microplate reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Unimax 1010 (Plattformschüttler, rotierend)	Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.4.7 Kardiomyozyten-Isolierung und Kultivierung

Geräte und Zubehör	**Firma**
Heraeus Biofuge Primo Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Aqualine AL 18 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Büchnertrichter	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
C6 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Interface INT4	SI Heidelberg, Deutschland
Kanüle (iØ 1,8 mm)	Eigenbau des Physiologischen Instituts, JLU Gießen, Deutschland
Mc Ilwain tissue chopper	Cavey laboratory Engineering Co.Ltd., Goomshall, United Kingdom
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Nylongaze Polyamid monofil (Maschenweite 200 µm)	Neolab, Berlin, Deutschland
Perfusionsanlage (Apparatur nach Langendorff)	Eigenkonstruktion des Physiologischen Instituts, JLU Gießen, Deutschland
Peristaltikpumpe	Ismatec, Grevenbroich, Deutschland
Philips Observation Monitor	Philips, Hamburg, Deutschland
Plastikscheibe	Cavey laboratory Engineering Co.Ltd., Goomshall, UK
Oszilloskop OS 90204 20 MHz	GoldStar, Korea, Japan
Stimulator T	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Uhrglasschälchen	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Videokamera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Zeilenkamera	Scientific Instruments GmbH, Gilching, Deutschland

2.4.8 Kontraktionsmessung von Kardiomyozyten

Gerät	**Firma**

Interface INT4	SI Heidelberg, Deutschland
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Oszilloskop OS 90204 20 MHz	GoldStar, Korea, Japan
Philips Observation Monitor	Philips, Hamburg, Deutschland
Stimulator T	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Videokamera	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Zeilenkamera	Scientific Instruments GmbH, Gilching, Deutschland

2.5 Computerprogramme

Programm	**Firma**
BioNavigator Software, BioNavigator6, Version 6.3.67.0	PamGene, ´s-Hertogenbosch, Niederlande
Bio-Rad CFX Maestro Version 1.1	Bio-Rad, München, Deutschland
ChemiCapt 5000	Vilber Lourmant Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Compass for SW version 4.1.0, Protein Simple	Bio-Techne, Minneapolis, USA
Evolve Software, Evolve3, Version 3.1.0.5	PamGene, ´s-Hertogenbosch, Niederlande
Graph Pad Prism 8	Graph Pad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office 2010 und Office 365	Microsoft Deutschland GmbH, München
Mucell	Scientific Instruments GmbH Gilching, Deutschland
Strathkelvin 782 Firmware	Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
PowerLab Data Aquisitions Systems	VisualSonics, Toronto, Kanada
Labchart 7 MPVS-Ultra Single Segment Foundation System	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Quantity One Version 4.6.6	Bio-Rad, München, Deutschland
SigmaStat 3.5	Systat, Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Vevo LAB 5.5.0	FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada
1290 Infinity II Bio LC System gekoppelt an ein 6495C QQQ MS im dynamic MRM Mode	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany

2.6 Puffer und Medien

2.6.1 Isolierung von Mitochondrien

Puffer	**Zusammensetzung**
Homogenisationspuffer	100 mM KCl; 50 mM MOPS; 5 mM $MgSO_4$; 1 mM EGTA; mit 1 M Tris pH auf 7,4 einstellen
Puffer A	Homogenisationspuffer + 1 mM ATP
Puffer B	0,04 % BSA in Puffer A
Mitochondrien-Isolierungspuffer	250 mM Sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, mit Tris pH auf 7,4 einstellen
30 %ige Percoll-Lösung	30 % Percoll (steril filtriert) in Mitochondrien-Isolierungspuffer

2.6.2 ROS-Messung

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**
Elektrolytlösung	300 mM Na_2HPO_4; 200 mM KH_2PO_4; 140 mM KCl; AgCl gesättigt; 0,1 % NaN_3
Glutamat/Malat Inkubationspuffer	125 mM KCl; 10 mM Tris-MOPS 1,2 mM KH_2PO_4; 1,2 mM $MgCl_2$; 20 µM EGTA; 5 mM Glutamat; 2,5 mM Malat; mit 0,5 M Tris pH auf 7,4 einstellen
Succinat Inkubationspuffer	125 mM KCl; 10 mM Tris-MOPS; 1,2 mM KH_2PO_4; 1,2 mM $MgCl_2$;

	20 µM EGTA; 5 mM Succinat; mit 0,5 M Tris pH auf 7,4 einstellen HRP Working Solution 5 µl HRP (500 U/ ml in 1 x PBS) + 45 µl Glutamat/Malat Inkubationspuffer (50 U/ ml)
Amplex Ultra Red Working Solution	970 µl Glutamat/Malat Inkubationspuffer + 20 µl HRP Working Solution + 10 µl Amplex Ultra Red reagent (1 mg in 60 µl DMSO)

2.6.3 Isolierung und Kultivierung von adulten Kardiomyozyten

Puffer	**Zusammensetzung**
Creatin-Carnitin-Taurin Medium (CCT)	9,8 g/ l Medium M199 with Earle's salts, 15 mM HEPES, 5 mM Creatin, 2 mM Carnitin, 5 mM Taurin, 10 µM Cytosin-Arabinofuranosid, gelöst in ddH_2O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Powell- Medium	110 mM NaCl, 2,5 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4, 1,2 mM $MgSO_4$ x H_2O; 25 mM HEPES, 10 mM Glukose Monohydrat D+, gelöst ist ddH_2O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Vorplattiermedium	CTT Medium mit 2 % Penicillin/Streptomycin und 10 µl/ ml Laminin, pH 7,4
Zellkulturmedium	2,5 mM $CaCl_2$ ·x 2 H2O, 5 mM Glukose Monohydrat D+, 10 mM HEPES, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4, 0,8 mM $MgSO_4$ x H_2O, 118 mM NaCl, 1,9 mM Natriumpyruvat, gelöst ist ddH2O, pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Ausplattier- / Waschmedium	Zellkulturmedium mit 2 % Penicillin/Streptomycin, pH 7,4

2.6.4 Metabolom-Extraktion

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Methanol-Extraktionspuffer	100 % Methanol mit 1 mM TCEP, 1 mM Ascorbinsäure, 0,1 % Ameisensäure, 0,1 µM interne Standards

2.6.5 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Firma
MYH7 (NOQ7.5.4D)	1:50	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper	**Verdünnung**	**Firma**
Vinculin (7F9)	1:125.000	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

2.7 Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere, sowie die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien des „National Institutes for Health Guide for Care and Use of Labaratory Animals“ (NIH, Publikation Nr. 85-23, Revision 1996). Die Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen mit dem Aktenzeichen GI 20/1 31/2019 genehmigt und die Meldung über die geplanten Tötungen von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte gemäß §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes bei den Tierschutzbeauftragten der JLU Gießen.

Die verwendete Mauslinie wurde ursprünglich vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (MPI) in Bad Nauheim bezogen. Die herzspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren doppeltransgenen MAO-B-KO-Mäuse (Myh6-MCreM_x_MAO-B$^{fl/fl}$) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Braun erzeugt. Die Generierung von kmMAO-B KO-Mäusen erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche am MPI. Die Generierung erfolgte unter Verwendung der Standardtechniken (Johnson 1986) und wie bereits von Heger et al. beschrieben (Heger et al. 2021).

Die Versuchstiere wurden in Kleingruppen im hauseigenen Tierstall des Physiologischen Institutes Gießen bei 21 °C, konstanter Luftfeuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Standardfutter und Trinkwasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Ab einem Alter von 12-18 Wochen wurde der Kardiomyozyten-spezifische KO mittels Tamoxifenfütterung induziert: Zur Deletion des MAO-B Gens wurden Myh6-MCreM_x_MAOB$^{fl/fl}$-Mäuse (kmMAO-B KO) zwei Wochen lang mit 400 mg/kg Tamoxifencitrat (Altromin) gefüttert, gefolgt von 10 Wochen Standardfutter. Als Kontrollmäuse wurden Cre-negative Wurfgeschwister (MAO-B$^{fl/fl}$) verwendet, die das gleiche Protokoll durchliefen (Abbildung 9).

Nach erfolgreichem Abschluss der Tamoxifenfütterung wurden die Tiere unter basalen Bedingungen echokardiographisch untersucht (siehe Anhang, Tabelle 3).

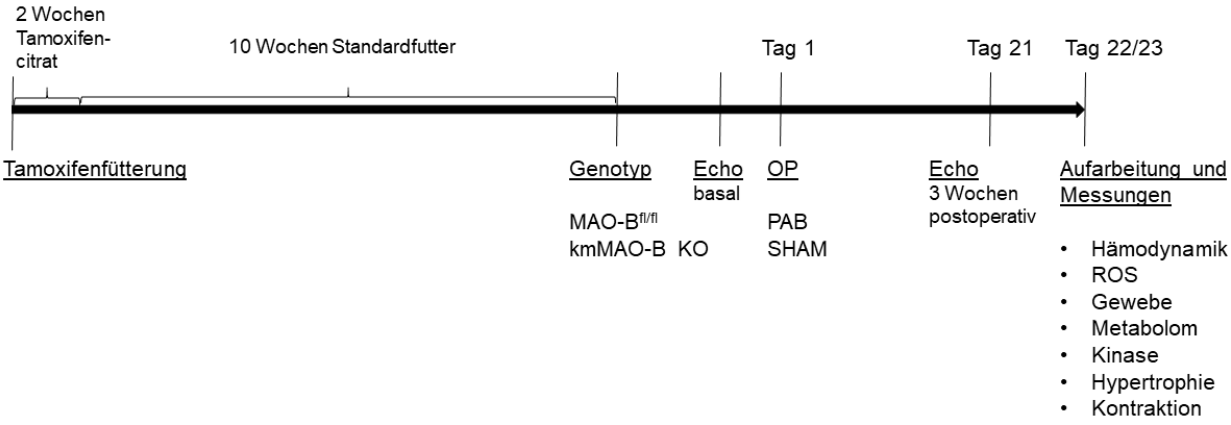


Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gruppen untersucht und miteinander verglichen: 1. Mäuse mit einem Kardiomyozyten-spezifischem *Knockout* (KO) des Enzyms MAO-B (kmMAO-B KO) und 2. Cre-negative Wurfgeschwister, die als Kontrolle dienten und das Enzym normal exprimierten (MAO-B$^{fl/fl}$). Mittels Tamoxifenfütterung wurde der KO induziert. Nach erfolgreichem Abschluss der Fütterung folgte zunächst eine echokardiographische Untersuchung (Echo, basal) und an Tag 1 die Operationen (OPs). Tiere beider Gruppen durchliefen entweder eine PAB- oder SHAM-Operation. Nach drei Wochen wurden die Tiere erneut echokardiographisch begutachtet (Echo, postoperativ) und an Tag 22 oder 23 wurden die Tiere getötet und das Gewebe aufgearbeitet sowie Messungen durchgeführt. Folgende Versuche erfolgten hierbei: Hämodynamik-Messungen, Kontraktionsanalysen von isolierten Kardiomyozyten, Gewebe wurde entnommen und schockgefroren für spätere Untersuchungen, Nachweis von ROS im Gewebe, Metabolom-Analysen, Kinase-Assays und Hypertrophie-Marker wurden untersucht.

3. Methoden

3.1 Pulmonalarterien *Banding* (PAB) Modell

Um eine Druckbelastung des RVs, wie sie bei einer PAH besteht, methodisch nachzustellen wurde das Pulmonalarterien *Banding* (PAB) Modell verwendet (Mamazhakypov et al. 2023). Bei diesem Verfahren wird das Lumen der Pulmonalarterie auf 0,3 mm mit Hilfe eines Titan Ligaturclip (Hemoclip®) verengt. Dadurch wird eine 65-70 %ige Stenose der Pulmonalarterie erzeugt und eine Druckbelastung des RVs induziert. Die Durchführung der Operationen erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Akylbek Sydykov aus dem *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System* (ECCPS) Gießen.

45 min vor dem operativen Eingriff eines jeden Tieres (MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO) wurde die analgetische Versorgung mittels subkutaner Buprenorphinhydrochlorid (0,1 mg/kg) - Injektion sichergestellt. In diesem Zuge wurde außerdem der allgemeine Gesundheitszustand, sowie das Gewicht der Mäuse dokumentiert. Die Narkoseeinleitung startete in einer Plexiglaskammer mit 4-5 % Isofluran in 100 %igem Sauerstoff bei einer Flussrate von 2 L/min. Sobald die gewünschte Narkosetiefe (nach ca. 2 min) erreicht war, wurden die Tiere intubiert und über ein Beatmungsgerät, welches mit einer Wärmeplatte verbunden war, mechanisch ventiliert. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern wurde je ein Tropfen der Augentropfen Artelac® Lipids auf ein Auge gegeben.

Während der Operationen wurde die Anästhesie auf ein 3 %iges Isofluran-Sauerstoffgemisch reduziert. Die Wärmeplatte wurde auf 37 ºC temperiert, um ein Auskühlen des Tieres während des Eingriffes zu verhindern. Mit Hilfe von Klebestreifen wurde das Tier an den vorderen Extremitäten auf der Unterlage fixiert, unter Verwendung von zwei Skalpellen das Fell am Operationsareal entfernt und die Haut mit Braunoderm® desinfiziert. Außerdem wurden 0,5 ml warme Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Die folgenden Schritte fanden unter einem Operationsmikroskop mit 8-facher Vergrößerung und einer Kaltlichtlampe statt. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde mit einem 5 mm langen Schnitt die Haut zwischen Sternum und Achselhöhle mithilfe der Skalpelle eröffnet und durch stumpfe Präparation mit Pinzette und Schere vom Gewebe gelöst. Im Thorax konnte die Muskelschicht erneut durch stumpfe Präparation mobilisiert und dadurch der zweite Interkostalraum mit einer Schere eröffnet werden. Unter Verwendung von Wundhaken mit Klebestreifen am Ende, konnte das Operationsareal offengehalten und später vergrößert werden. Daraufhin wurde das Perikard mit feinen Pinzetten eröffnet und schrittweise das umliegende Bindegewebe entfernt bis die Pulmonalarterie zu lokalisieren war. Vorsichtig wurde die Pulmonalarterie vom Gewebe befreit,

bis sie mit Hilfe einer Eigenkonstruktion zu mobilisieren war. Anschließend wurde mit einer, ebenfalls speziell dafür vorgesehenen Zange, der Ligaturclip um die Pulmonalarterie gesetzt (Abbildung 10). Nach kurzer Kontrolle der Herzaktivität wurden die Wundhaken entfernt und der Thorax konnte mit 6-0 Polypropylene Nahtmaterial zwischen erster und zweiter Rippe vernäht werden. Anschließend wurde die Thoraxmuskulatur zurückgeschoben und letztlich die Haut mit dem gleichen Nahtmaterial wie zuvor verschlossen. Als SHAM operierte Tiere (Schein-OP) wurde die Kontrollgruppe bezeichnet, welche der gleichen Operation unterzogen wurden mit Ausnahme der Platzierung des Ligaturclips. Nach Beendigung der Operation und sobald das Tier die selbstständige Atmung wieder übernahm, wurde es extubiert und zurück in den Käfig auf genügend Zellstoff und unter eine Wärmelampe gelegt. Nach 5-10 min konnte ein vollständiges Erwachen der Tiere verzeichnet werden. Die operierten Tiere wurden 72 h postoperativ alle 6-8 Stunden mit dem Analgetikum Buprenorphinhydrochlorid (0,1 mg/ kg) per subkutaner Injektion versorgt. Während dieser Zeit wurde zudem der Allgemeinzustand, versuchsspezifische Kriterien, sowie die Gewichte dokumentiert.

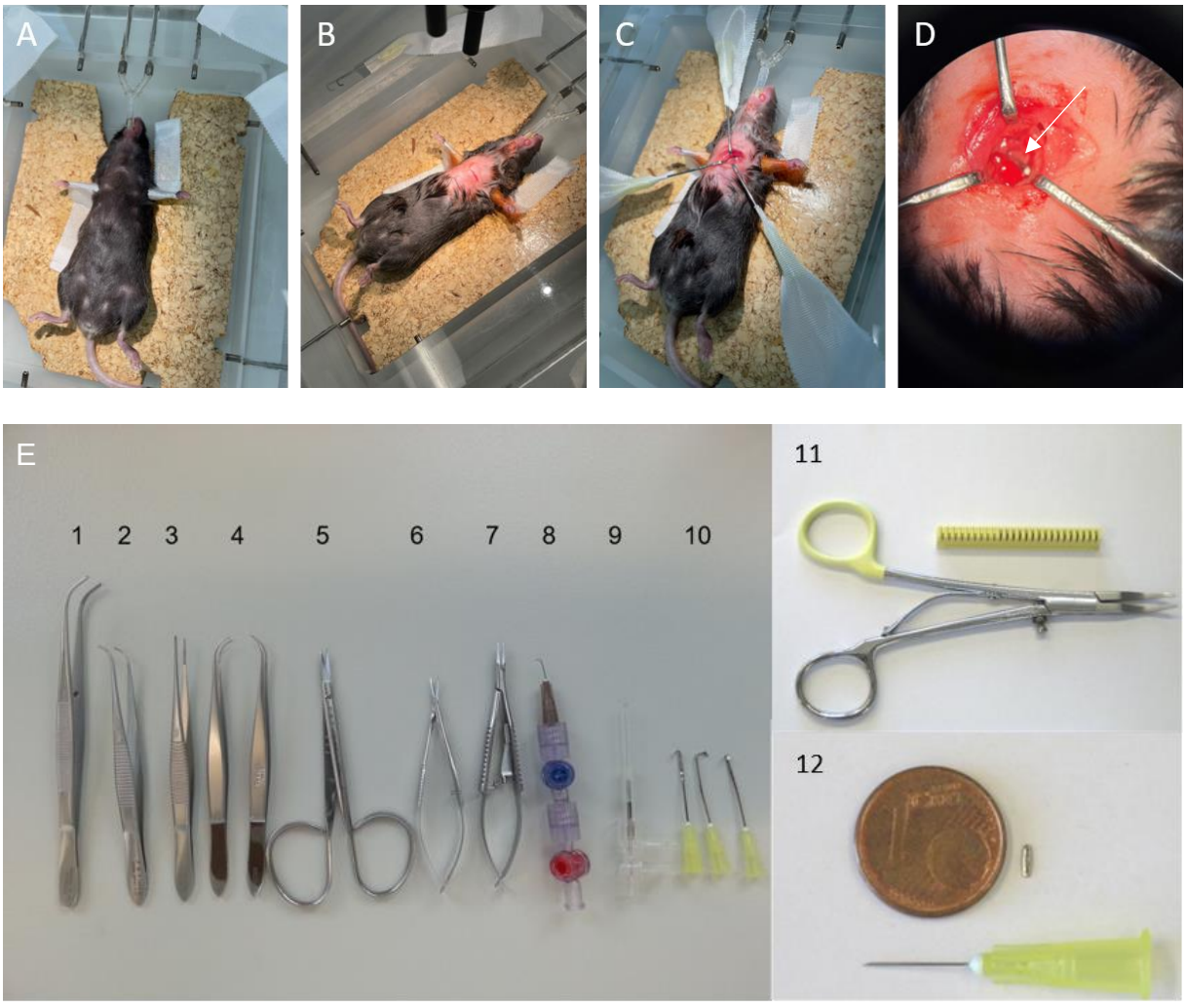


Abbildung 10: Repräsentative Bilder des Ablaufs des Pulmonalarterien *Banding* (PAB) sowie die dafür verwendeten Instrumente. Das, durch eine Isofluran Inhalationsnarkose schlafende, intubierte Tier wurde auf einer Wärmeplatte fixiert und über ein Beatmungsgerät ventiliert (**A**). Der Thoraxbereich wurde enthaart und die Haut mit Braunoderm® desinfiziert. Anschließend wurde die Haut mittels zweier Skalpelle eröffnet und mobilisiert (**B**). Die darunterliegende Muskelschicht wurde ebenfalls mobilisiert und der zweite Interkostalraum eröffnet. Wundhaken mit Klebestreifen am Ende wurden verwendet, um zu gewährleisten, dass das Operationsareal während des Eingriffs geöffnet bleibt (**C**). Nach Entfernung des umliegenden Bindegewebes konnte die Pulmonalarterie lokalisiert, freipräpariert und mit einem Ligaturclip (Pfeil) verengt werden (**D**). Der Eingriff wurde mit Hilfe folgender Instrumente durchgeführt: Semken Pinzette abgerundet, gezackte Spitze - 1,3 mmx 1 mm (1), Graefe Pinzette abgerundet – 0,8 mm (2), Graefe Pinzette gerade – 0,8 mm (3), Moria MC31 Pinzetten abgerundet, gezackte Spitze (4), Feine Irisschere gerade – 9,5 cm (5), Castroviejo Micro Nadelhalter gerade – 9 cm (6), Vannas-Tübingen Springschere – 5 mm (7), Eigenkonstruktion mit L-förmig gebogener G26 Kanüle zum Anheben der Pulmonalarterie (8), Eigenkonstruktion zur Intubation (9), Eigenkonstruktion eines Retraktors bestehend aus 3 20G Kanülen (10), Weck Hemoclip® Applikator klein und Weck Hemoclips® klein (11), Größenverhältnis des Clips – die Clipgröße (Durchmesser) entspricht dem Durchmesser der Nadelgröße 30G (12) (**E**).

3.2 Echokardiographie

Um die geometrischen und funktionellen Änderungen der durch die PAB-Operation induzierten Druckbelastung im RV zu dokumentieren, wurden die Tiere mittels Doppler-Echokardiographie untersucht. Dieses nicht-invasive Verfahren erlaubt die Beurteilung der Herzgröße und Herzfunktion mittels Ultraschallwellen. Die Durchführung der Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Akylbek Sydykov des *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System* (ECCPS) Gießen.

Einen Tag vor dem chirurgischen Eingriff wurde jedes Tier unter basalen Bedingungen geschallt, um die Ausgangssituation des Herzens zu erfassen. Postoperativ wurden die Tiere nach 21 Tagen echokardiographisch untersucht. Bei 4-5 % Isofluran mit 100 %igem Sauerstoff wurde die Inhalationsnarkose in einer Plexiglaskammer eingeleitet. Daraufhin wurden die Gewichte der Tiere ermittelt und sie anschließend in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen durch Klebestreifen fixiert. Dadurch konnte die Körpertemperatur mittels Rektalthermometer kontinuierlich auf 37 ºC gehalten werden, sowie die Herzfrequenz und das EKG aufgezeichnet werden. Während der Untersuchung wurde die Narkose über eine Beatmungsmaske auf 1,5-2 % Isofluran (mit 1 L/ min Sauerstoff gemischt) reduziert. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen wurde erneut ein Tropfen pro Auge der Artelac® Lipids verwendet. Der Brustkorb der Mäuse wurde durch Veet Enthaarungscreme enthaart und anschließend mit vorgewärmten Ultraschallgel Auqasomic CLEAR® bedeckt

(Abbildung 11). Folgende versuchsspezifische Parameter wurden mittels 30 MHz Schallkopf bestimmt:

Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser (endsystolisch und enddiastolisch) (*right ventricular inner diameter*, RVID in mm)

Der maximale Abstand zwischen der freien Wand des rechten Ventrikels und dem Septum wird als RVID definiert. Dieser wurde sowohl während der Endsystole als auch während der Enddiastole bestimmt. Der Abstand gibt Aufschluss über den Grad der Dilatation des rechten Ventrikels und wird im B-Mode des apikalen Vierkammerblicks gemessen.

Systolische Auslenkung der Trikuspidalklappe (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*, TAPSE in mm)

Zur systolischen Funktionsbeurteilung des rechten Ventrikels wird die Distanz der Bewegung des Trikuspidalklappenrings (Trikuspidalanulus) von der Enddiastole bis zur Endsystole im M-Mode des apikalen Vierkammerblicks gemessen.

Rechtsventrikuläre Wanddicke (*right ventricular wall thickness*, RVWT in mm)

Um den Grad der Hypertrophie zu bestimmen, wird die Dicke der freien rechtsventrikulären Wand im M-Mode der parasternalen Längsachse gemessen.

Abbildung 11: Repräsentative Bilder der echokardiographischen Messung. Mithilfe von Klebestreifen wurden die Tiere auf einer beweglichen Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen fixiert. Durch das Rektalthermometer konnte die Körpertemperatur kontinuierlich überwacht, sowie die Narkose über die Beatmungsmaske aufrechterhalten werden.

Nach Abschluss der Messungen wurde die Narkose beendet, die Fixierung sowie das Thermometer gelöst und die Tiere zurück in den Käfig gelegt. Nach wenigen Sekunden waren die Tiere bereits erwacht und erholt. Alle gewonnenen Parameter wurden später mit der PowerLab Software analysiert.

3.3 Hämodynamische Messungen

Zur späteren Quantifizierung der pulmonalen Hypertrophie ist der systolische Druck ein Maß für eine rechtsventrikuläre Druckbelastung. Mittels finaler, invasiver Messung mit einem Katheter-Mess-System wurden hämodynamische Parameter erhoben.

Die hämodynamischen Messungen wurden von der technischen Mitarbeiterin Christina Pilz im *Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System* (ECCPS) Gießen durchgeführt. Die Narkosekammer wurde zunächst mit 4-5 % Isofluran und Sauerstoff mit einer Flussrate von 3 L/min angeflutet. Das schlafende Tier wurde daraufhin gewogen und auf einer thermoregulierenden Unterlage in Rückenlage fixiert. Das, aus der Beatmungsmaske fließende, Isofluran-Sauerstoffgemisch (Flussrate 1 L/min) konnte während des Eingriffes auf

2 % Isofluran reduziert werden. Die Augen wurden unter Verwendung von Artelac® Lipids vor dem Austrocknen geschützt. Mittels Rektalthermometer wurde die Körpertemperatur überwacht, sowie die Herzfrequenz mittels integrierten EKG-Elektroden in der Wärmeplatte. Die Katheterisierung fand unter 8-facher Vergrößerung eines Stereomikroskops mit Kaltlichtlampe statt.

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurden die Tiere im Kehlkopf enthaart und die Haut mit Braunoderm® desinfiziert. Auf die Längsinzision von Haut und Muskulatur, folgte die Querinzision der Trachea. Ein Beatmungstubus wurde endotracheal eingeführt und die Jugularvene, sowie die Carotis Arterie freipräpariert.

Ein Jugularvenenmesskatheter (2F Mikrokatheter) wurde zur Erfassung des rechtsventrikulären Drucks platziert, sowie ein Messkatheter (1,4F Mikrokatheter) in der Carotis Arterie zur Detektion des systemischen Blutdrucks eingelegt.

Auf einem Monitor konnte anhand einer Druckkurve die korrekte Positionierung der Katheter verzeichnet und diese anschließend fixiert werden. Nach Abschluss der Messung wurde das Herz des Tieres punktiert und Blut für spätere Analysen entnommen. Letztlich wurde die Maus durch Entbluten getötet und das Herz (getrennt nach rechtem und linkem Ventrikel sowie dem Septum) aufgearbeitet.

Folgender hämodynamischen Parameter wurde drei Wochen nach SHAM oder PAB Operationen von MAO-$B^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO Mäusen erfasst:

Rechtsventrikulärer systolischer Druck (*right ventricular systolic pressure*, RVSP in mmHg)

Der höchst gemessene Druck während der Systole im rechten Ventrikel wird als RVSP definiert und gibt somit Aufschluss über die systolische Funktion des rechten Ventrikels.

3.4 Isolation von adulten rechtventrikulären Kardiomyozyten

Die Methode der *in vitro* Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen wurde erstmals von Piper (1982) beschrieben und von Nippert et al. (2017) modifiziert.

Für die Gewinnung isolierter Kardiomyozyten wurde das Herz mittels Perfusion eines kollagenasehaltigen Mediums (in mmol/l: 10 Glukose Monohydrat D^+, 25 Hepes, 2.5 KCl, 1.2 KH_2PO_4, 1.2 $MgSO_4$ x 7 H_2O, 110 NaCl; pH 7,4) verdaut. Bei der verwendeten Langendorff-

Anlage handelt es sich um eine Eigenkonstruktion des Physiologischen Institutes, Fachbereich Medizin, der JLU Gießen. Die Anlage besteht aus einem ca. 1 m doppelwandigen Glasrohr, an dessen unterem Ende eine feine Kanüle angebracht ist. Dadurch wird die retrograde Perfusion über die Aorta ermöglicht. In dem unterhalb dieses Glasrohrs befindlichen und beweglichen Trichter kann das durchlaufende Perfusat aufgefangen werden. Mittels einer Pumpe wird der Kreislauf geschlossen und das Perfusat in den oberhalb des Glasrohrs befindlichen Trichter befördert werden. Durch die doppelwandigen Glasgefäße der gesamten Konstruktion, kann die Temperatur mithilfe von zirkulierendem Wasser konstant auf 37 °C temperiert werden. Vor jeder Präparation wurde die Anlage zunächst mit Aqua bidest. und anschließend, mit dem später ebenfalls verwendeten Perfusionsmedium (in mmol/l: 10 Glukose Monohydrat D^+, 25 Hepes, 2.5 KCl, 1.2 KH_2PO_4, 1.2 $MgSO_4$ x 7 H_2O, 110 NaCl; pH 7,4) gespült. Abschließend wurde der Regelhahn der Kanüle geschlossen und die Langendorff-Anlage mit 45 ml Perfusionsmedium luftblasenfrei befüllt (Abbildung 12).

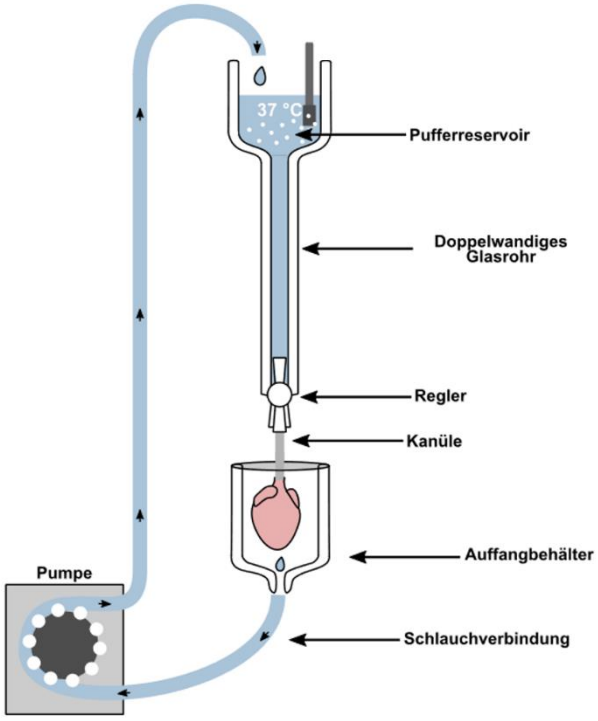


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Langendorff-Perfusionsanlage zur Isolierung adulter Kardiomyozyten der Maus. Das temperierte Wasser im doppelwandigen Glasrohr der Anlage (Eigenbau des Physiologischen Instituts Gießen) temperiert das kollagenasehaltige Perfusionsmedium im Inneren konstant auf 37 ºC. Mittels der, am unteren Ende der Anlage fixierten Kanüle wird das Herz über die Aorta retrograd perfundiert. Das aus dem Herzen austropfende Perfusat gelangt zunächst in den darunter befindlichen Auffangbehälter und wird anschließend mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zum Glastrichter am oberen Ende des Glasrohrs transportiert. Am Regler wird die Tropfgeschwindigkeit auf 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt.

Vor Versuchsbeginn wurden zunächst die Medien angesetzt, sowie die Kulturschalen mit CCT-Medium (Medium M199 with Earle's salts g/l, Carnitin 2 mM, Creatin 5 mM, Cytosin-Arabinofuranosid 10 µM, HEPES 15 mM, Taurin 5 mM; pH 7,4), Laminin (5 µg/ml) und 2 % Penicillin-Streptomycin beschichtet. Das Beschichten der Schalen wurde 2-24 Stunden vor den Isolationen durchgeführt, woduch das spätere Anheften der Kardiomyozyten gewährleistet werden konnte (Inkubation bei 37 °C).

Die rechtventrikulären Kardiomyozyten wurden aus adulten MAO-$B^{fl/fl}$ oder kmMAO-B KO Mäusen drei Wochen nach einer PAB oder SHAM Operation gewonnen.

Nach der Inhalationsnarkose mit 5 % Isofluran in einem Exsikkator, erfolgte die Tötung mittels zervikaler Dislokation. In Rückenlage des Tieres wurde die Bauchhöhle geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Das Herz-Lungen-Paket wurde entnommen und zügig in 4 °C kalte 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl) überführt. Dort wurde das Herz kurz geschwenkt, um es von überschüssigem Blut zu befreien. Anschließend konnten die Lungenflügel vom Herzen entfernt und das Herz erneut in frische 4 °C kalte 0,9 % NaCl-Lösung überführt werden. Nun erfolgte das Freipräparieren der Aorta, wobei überschüssiges Bindegewebe und Thymus ebenfalls entfernt wurden. Um die Aorta auf die Kanüle zu ziehen, wurde sie vor dem ersten Abgang des Aortenbogens gekürzt. Mithilfe eines Leinenfadens konnte die Aorta an der Kanüle fixiert und das Herz mit ca. 1 ml 4 °C kalter 0,9 % NaCl gespült werden. Anschließend konnte das Herz an die Anlage angeschlossen werden. Zunächst erfolgte die Perfusion in einem offenen Kreislauf bis ca. 5 ml Perfusionsmedium durchgelaufen waren. Somit wurden mögliche Blutreste aus dem Herzen gespült. In der Zwischenzeit wurden 20 mg Kollagenase, sowie 12,5 µl einer 100 mM $CaCl_2$-Lösung in 5 ml vorgewärmtem Perfusionsmedium gelöst. Nach dem Schließen des Kreislaufes wurde diese Lösung dem Pufferreservior hinzugefügt und die Perfusionsgeschwindigkeit auf ca. 1 Tropfen/Sekunde reguliert. Um die Temperatur besser konstant halten zu können, wurden beide Glastrichter mit Parafilm abgedeckt. Die enzymatische Verdauung der Herzen erfolgte für 25 min.

Im Anschluss wurde das verdaute Herz mithilfe einer Schere unterhalb der Vorhöfe von der Kanüle abgetrennt und auf ein Uhrglasschälchen überführt. Rechter und linker Ventrikel, sowie das Septum wurden voneinander getrennt und auf eine Teflonscheibe eines Gewebsschneiders (*Tissue chopper*) gelegt. Es folgte die maschinelle Zerkleinerung des Gewebes (0,7 mm Schnittbreite), sowohl in Quer- als auch in Längsrichtung. Anschließend wurde eine weitere manuelle Zerkleinerung mittels zweier Skalpelle durchgeführt.

Das gewonnene Material wurde für 5 min bei 37 °C nachverdaut. Hierfür wurden 5 ml des kollagenasehaltigen Perfusionsmediums aus der Langendorff-Anlage in ein 50 ml Tube

entnommen und die Suspension vorsichtig überführt. Über ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm konnten die Zellen von möglichen Gewebsresten herausfiltriert werden. In der nachfolgenden Zentrifugation bei 400 rpm für eine Minute konnten die Kardiomyozyten von den nicht-myozytären Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen getrennt werden. Vier weitere Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 rpm für eine Minute. Hierfür wurden die Zellen nach jeder Zentrifugation vorsichtig in frischem, vorgewärmtem Perfusionsmedium gelöst und mit 125 µM, 250 µM, 500 µM und 1000 µM $CaCl_2$ versetzt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Kardiomyozyten-Pellet in vorgewärmten Ausplattiermedium (in mmol/l: 2,5 $CaCl_2$-Dihydrat, 5 Glukose, 10 HEPES, 4,7 KCL, 1,2 KH_2PO_4, 0,8 $MgSO_4$, 118 NaCl, 1,9 Na-Pyrovat; pH 7,4) aufgenommen und auf die Laminin-beschichteten Kulturschalen unter der Sterilbank ausplattiert. Pro Maus konnten ungefähr vier Schalen mit Kardiomyozyten des rechten Ventrikels mit je 1 ml Zellsuspension gewonnen werden. Die Schalen kamen anschließend in den Brutschrank bei 37 °C, 5,5 % CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach ca. einer Stunde hatten sich die intakten Kardiomyozyten angeheftet und die Zellen konnten mit vorgewärmten Waschmedium (in mmol/l: 2,5 $CaCl_2$-Dihydrat, 5 Glukose, 10 HEPES, 4,7 KCL, 1,2 KH_2PO_4, 0,8 $MgSO_4$, 118 NaCl, 1,9 Na-Pyrovat; pH 7,4) gewaschen werden, sodass anschließend hauptsächlich stäbchenförmigen Zellen auf der Schale verblieben (Abbildung 13).

Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme rechtsventrikulärer Kardiomyozyten der Maus. Nach dem Waschen der isolierten Kardiomyozyten befanden sich überwiegend intakte, stäbchenförmige Zellen auf der Zellkulturschale. 200-fache Vergrößerung.

3.4.1 Funktionsmessungen der isolierten RV-Kardiomyozyten

Drei Wochen nach einer PAB oder SHAM Operation wurde die funktionelle Bedeutung der MAO-B für das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen untersucht. Hierfür wurde die lastfreie Zellverkürzung isolierter rechtsventrikulärer Kardiomyozyten von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren bestimmt.

Bei diesem Verfahren, werden die Zellen elektrisch stimuliert und die daraus resultierende isotonische Kontraktion anhand Hell-Dunkel-Kontrast der Zellmembran gemessen. Bei Raumtemperatur wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops die lastfreie Zellverkürzung bestimmt. Dieses Lichtmikroskop ist mit einer Zeilenkamera ausgestattet, welche die Zellgrenzen eines einzelnen Kardiomyozyten mittels Hell-Dunkel-Kontrast registriert. Außerdem verfügt das Mikroskop über eine Videokamera oberhalb des Objekttisches, wodurch die zu messende Zelle exakt in den Messbereich der Zeilenkamera positioniert werden kann. Durch Verwendung des Programms MUCELL konnte die Veränderung der Zelllänge während Kontraktion und Relaxation, in Abhängigkeit der Zeit und mit einer Frequenz von 500 Hz, dokumentiert werden. Die elektrische Stimulation erfolgte mit zwei parallel-ausgerichteten Silberchlorid-Drähten, befestigt an einem Deckel einer Kulturschale, mit einer Frequenz von 2 Hz. Auf diese Weise konnten zwei gegenläufige Rechteckspannungen von 20 mV für eine Dauer von 0,5 ms generiert werden. Pro Zelle wurden vier Kontraktionen gemessen und anschließend gemittelt. Von jeder Zellkulturschale wurden 9 Kardiomyozyten gemessen, welche rhythmisch kontrahierten und eine stäbchenförmige Morphologie aufwiesen. Aus den gewonnenen Daten wurde die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (m/s), sowie die relative Zellverkürzung (ΔL/L, in %, berechnet aus der Amplitude x 100 / diastolische Länge in µM) ermittelt.

3.5 Isolierung von Mitochondrien aus rechten Ventrikeln

Mitochondrien von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäuse wurden drei Wochen nach PAB- oder SHAM-Operationen isoliert und für Funktionsmessungen aufgearbeitet. Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, die Bauchhöhle eröffnet, das Herz mittels Pinzette und Schere gelöst und in 4 ºC kaltes 0,9 %iges NaCl überführt. Anhängende Gewebsreste wie Lungenflügel oder Thymus wurden entfernt. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis, um

die Funktionalität und Integrität der Mitochondrien zu gewährleisten. Für die Isolierung funktionell aktiver Mitochondrien wurden rechter und linker Ventrikel, sowie das Septum getrennt.

Der rechte Ventrikel wurde in 2 ml eiskaltem Puffer A gewaschen und anschließend auf einem Objektträger platziert. Ein Tropfen von Puffer A wurde auf das Gewebe gegeben und dieses mit zwei Skalpellen grob zerkleinert. Unter Verwendung eines 1 ml Potter-Elvejhem-Gewebehomogenisators wurde der RV in 1 ml Puffer B durch sechsmaliges Pottern aufgeschlossen. Die gewonnenen Homogenate wurden mittels Pasteurpipette in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 800 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die im Überstand enthaltenden Mitochondrien durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 8000 g sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer A und nachfolgender Zentrifugation bei 8000 g für weitere 10 min wurden die sedimentierten Mitochondrien des RVs in 30-70 µl Homogenisationspuffer resuspendiert.

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Lowry: DC™ (detergent compatible) protein assay

Unter Verwendung des Lowry: DC™ (detergent compatible) protein assay Kits wurde die Proteinkonzentration der isolierten Mitochondrien bestimmt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren. Rinder-Serumalbumin (BSA) wurde zur Erstellung einer Eichgeraden in einem Konzentrationsbereich von 0 -1,4 mg/ml verwendet. Von jeder Probe und BSA-Standard wurde eine Doppelbestimmung in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Hierfür wurden alle Proben und die Standards zunächst mit ddH_2O vorverdünnt und anschließend erst mit 25 µl Lösung A und darauffolgend mit 200 µl Lösung B versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit konnte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 650 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer erfolgen.

3.5.2 Detektion von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies aus rechten Ventrikeln

Für die mitochondriale H_2O_2-Detektion der rechten Ventrikel der Maus wurde die Amplex Ultra Red Methode von Invitrogen durchgeführt. Das farblose und fluorogene Substrat Amplex Ultra Red reagiert in einem Verhältnis von 1:1 mit der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), wodurch das stark fluoreszierende Produkt Amplex Ultra Red gebildet wird, welches somit die H_2O_2 Detektion ermöglicht (Abbildung 14).

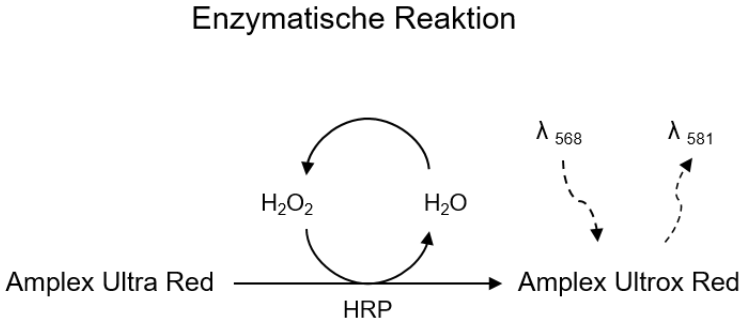


Abbildung 14: Prinzip der Amplex Ultra Red Methode. Das farblose Amplex Ultra Red wird in Gegenwart von H_2O_2 von der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) zu dem fluoreszierenden Amplex Ultrox Red umgesetzt. Seine Exitations-/Emissionsmaximum liegt bei 565 nm/ 581 nm.

Aus den isolierten rechtsventrikulären Mitochondrien der PAB und SHAM Tiere beider Genotypen wurden 25 µg in Glutamat/Malat-Puffer überführt und das Volumen auf 100 µl eingestellt.

50 µl der Probe wurden in eine 96-Well-Platte überführt und mit 50 µl Amplex Ultra Red Working Solution, welches das Fluorogen und die HRP enthält, pro Well versetzt. Die Messungen erfolgten unter basalen Bedingungen, sowie in der Anwesenheit des Komplex I Inhibitors Rotenon (2 µM). Durch dessen Zugabe kann die mitochondriale Atmungskette am Komplex I gehemmt werden. Außerdem wurden Messungen unter dem Einsatz des MAO-B Substrats PEA (250 µM) durchgeführt.

Bei einer Extinktions-/ Emissions-Wellenlänge von 565 nm/ 581 nm wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 5 min im Cary Eclipse Spektrophotometer gemessen. Die Steigung des Amplex Ultra Red Signals wurde für 1,5 min bestimmt und die Hintergrundfluoreszenz des Puffers ohne Mitochondrien subtrahiert.

3.6 Materialgewinnung für weitere Analysen

Um Gewebematerial für spätere Analysen zu gewinnen, wurden drei Wochen nach den chirurgischen Eingriffen die Herzen aus den Brustkörben der SHAM oder PAB operierten Mäusen (MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO) entnommen und in kaltem NaCl geschwenkt. Anschließend wurden die Aorten an Kanülen fixiert und mit kaltem NaCl gespült um sie von Blutrückständen zu reinigen. Die Herzen wurden dann nach RV, LV und Septum getrennt und sofort in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Material wurde bei -80 ºC gelagert.

3.6.1 Nachweis von intrazellulärem ROS aus rechten Ventrikeln mittels DHE-Färbung

Zum Nachweis von intrazellulärem ROS wurde der zellpermeable Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) verwendet. Der Superoxid-Indikator kann von ROS oxidiert werden und Ethidiumbromid bilden, welches in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) interkaliert. Wenn dies geschieht, emittiert die Verbindung rote Fluoreszenz.

Hierfür mussten zunächst die zuvor gewonnenen und kryokonservierten RVs (siehe 3.6) geschnitten werden. Dazu wurden die tiefgefrorenen RVs mithilfe eines Klebstoffes (Tissue-Tek®) an einem Objekthalter befestigt. Damit das Material nicht auftaute, fand das Aushärten des Klebers, sowie die folgenden Schnitte bei -20 ºC in einem Kryostaten statt. Jeder RV wurde nun in 5 µM dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträgern bei -80 ºC gelagert.

Nachfolgend wurden die RV-Kryoschnitte von SHAM oder PAB operierten MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren mit DHE (gelöst in 1x PBS, 1:1000) für 5 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Kryoschnitte mit PBS gewaschen und mit Dako-Fluoreszenzeinbettmedium fixiert. Die Objektträger wurden dann unter ein Fluoreszenzmikroskop gelegt und mit der Quantity One 1-D-Analysesoftware von BIO-RAD analysiert.

3.6.2 Metabolom-Analyse aus rechten Ventrikeln

Die Analyse der Metaboliten erfolgte in Frankfurt durch Herrn Dr. Stephan Klatt vom *Institute for Vascular Signalling des Vascular Research Centre* der Goethe Universität.

3.6.2.1 Metabolom- Extraktion:

Die zuvor bei -80 ºC gelagerten rechten Ventrikel der operierten MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO Mäuse (siehe 3.6) wurden auf Trockeneis homogenisiert und anschließend erneut bei -80 °C gelagert. Zur Metaboliten-Extraktion wurde den Proben das 10-20fache Volumen eines eiskalten Methanol-Extraktionspuffers zugesetzt (100 % Methanol mit 1mM TCEP, 1 mM Ascorbinsäure, 0,1 % Ameisensäure und 0,1 µM internen Standards). Die Proben wurden gevortext und auf Eis beschallt, bis sie vollständig homogenisiert waren. Daraufhin wurden die Proben für 15 min auf Eis gelegt und anschließend bei 14 000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen und das zweifache Volumen an MilliQ-Wasser wurde hinzugefügt. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren, gefolgt von einer Sublimation auf einem Gefriertrockner. Das getrocknete Material wurde in 80 µl Borsäurepuffer aufgenommen, kurz durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 µl AQC-Reagenz hinzugefügt (aus dem AccQ-Taq Derivatization Kit), durchmischt und für 10 min bei 55 °C derivatisiert. Nach der Inkubation folgte eine erneute Zentrifugation bei 14 000 rpm für 10 min und 4 °C. Schließlich wurde der Überstand in MS-Glasfläschchen überführt. Die Proben waren nun bereit für die Analyse.

3.6.2.2 LC-MS/MS-Analyse:

Die Metaboliten wurden mit Hilfe eines 1290 Infinity II Bio LC-Systems identifiziert und quantifiziert, das mit einem 6495C QQQ MS im dynamischen MRM-Modus gekoppelt ist (beide Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Für die Metaboliten-Quantifizierung wurden entsprechende Standards verwendet. Die LC-Trennung der Metaboliten erfolgte auf einer Agilent Zorbax Extend C18-Säule mit einem Lösungsmittelsystem aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der LC-Gradient umfasste 19 min, mit folgendem Schema: 0 min 1 % B, 2 min 1 % B, 9 min 15 % B, 14 min 30 % B, 16 min 60 % B,

17 min 65 % B bis 19 min 1 % (B). Die Flussrate war auf 300 µl/min und die Säulentemperatur auf 30 °C eingestellt. Die Datenaufnahme erfolgte im positiven Ionisierungsmodus. Die Gastemperatur wurde auf 290 ºC, der Gasfluss auf 20 l/min und der Zerstäuber auf 45 psi eingestellt. Der Mantelgasfluss betrug 11 l/min bei einer Temperatur von 400 ºC. Die Kapillarspannung war auf 3800 V und die Düsenspannung auf 500 V eingestellt. Die Spannungen des Hochdruck-HF und des Niederdruck-HF waren jeweils auf 150/60 V eingestellt.

3.6.3 Herstellung von Lysaten aus rechtsventrikulären Hälften der Septa

Die zuvor schockgefrorenen Septa (siehe 3.6) wurden im tiefgefrorenen Zustand erneut nach rechtsventrikulärem Anteil und linksventrikulärem Anteil aufgeteilt. Aus dem rechtsventrikulären Anteil wurden Lysate hergestellt, die später für den Hypertrophie-Nachweis mit der Simple Western Methode, sowie dem Kinase Assay genutzt wurden.

Die Präparation wurde größtenteils wie vom Hersteller empfohlen (PamGene Protokoll #1160), jedoch mit geringen Abweichungen, durchgeführt. Bei den folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet, beginnend mit der Vorbereitung des Puffers (Lysepuffer: M-PER Extraktionspuffer für Säugetiere), der mit beiden Inhibitoren (Phosphatase-Inhibitor: Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail und Protease-Inhibitor: Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA frei) versetzt wurde. Das Gewebe wurde anschließend in Precellys Röhrchen überführt und 150 µl des M-PER Puffers hinzugegeben. Die rechtsventrikulären Anteile der Septa wurden mit den Precellys-Gewebehomogenisatoren und 1,4-mm-Keramikkügelchen (Zirkonoxid) bei 5500 rpm für 10 Sekunden mechanisch homogenisiert. Dieser Prozess wurde zweimal durchgeführt und das Gewebe zwischendurch für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Abschluss des zweiten Durchlaufs wurde das Lysat per Hand durch eine 20-Gauge Nadel mit einer Spritze erneut dreimal homogenisiert. Die Lysate wurden nun für eine Stunde rotierend bei 4 ºC inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation für 15 min bei 16.000 g und 4°C. Letztlich konnte der proteinhaltige Überstand in ein vorgekühltes Röhrchen überführt und für 3 Sekunden gevortext werden. Aliquots von je 12 µl wurden auf 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Proben bei -80 ºC gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines BCA Protein Assay Kits (siehe 3.6.3.1).

3.6.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits wurde die Proteinbestimmung der Lysate der rechtsventrikulären Anteile der Septa nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Unter Verwendung von BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 - 2 mg/ml wurde eine Eichgerade als Standardreihe erstellt. Die Proben wurden 1:5 in PBS vorverdünnt und davon jeweils 25 µl in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Standardreihe und Proben wurden als Doppelbestimmung aufgetragen. Das BCA-Reagenz wurde aus Reagenz A und B in einer 1:50 Verdünnung hergestellt und anschließend 200 µl pro Well pipettiert. Die Platte wurde für 30 Sekunden auf einen Schüttler gelegt und darauffolgend für 30 min bei 37 ºC inkubiert. Sobald die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Absorption bei 562 nM am Microplate reader bestimmt.

3.6.4 Nachweis von Kinase-Aktivitäten aus den rechtsventrikulären Anteilen der Septa

Proteinisolierung und peptidbasierte Kinase-Aktivitäts-Assays für Tyrosin- sowie Serin/Threonin-Kinasen (unter Verwendung des PamStation-Geräts) wurden im Biomedizinischem Forschungszentrum von geschultem Personal (Frau Dr. Astrid Weiss) der Arbeitsgruppe von Professor Schermuly gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (Weiss et al. 2019; Alack et al. 2020; Yerabolu et al. 2021). Für die Analyse wurden die zuvor erstellten Lysate aus den rechtsventrikulären Anteilen der Septa verwendet (siehe 3.6.3). Die Lysate von operierten MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäusen wurden analysiert. Wie unter 3.6.3.1 beschrieben wurden die Proteinkonzentrationen zuvor bestimmt. 10 µg Proteinlysat wurden auf die Tyrosinkinase PamChips aufgetragen (2 µg für Serin/Threoninkinase), um die Kinase-vermittelte Phosphorylierung der Substratpeptide zu untersuchen. Der Assay wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit der Evolve-Software durchgeführt. Basierend auf dem Muster der Phosphorylierung für die vier experimentellen Bedingungen (MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO je SHAM und PAB operierte Tiere) ermöglichten bioinformatische Analysen der BioNavigator-Software unter Verwendung von Proteindatenbanken eine Vorhersage von Kinasen von diesen Ereignissen.

3.6.5 Hypertrophie-Nachweis mittels Jess – Simple Western

Der Hypertrophie-Nachweis wurde von Frau Julia Baldauf aus dem Biomedizinischem Forschungszentrum Seltersberg (BFS) Gießen durchgeführt.
Das Jess - Simple Western System ist ein automatisierter kapillarbasierter Größentrennungs-Immunoassay. Diese Technologie wurde verwendet, um den Hypertrophiemarker MYH7 auf Proteinebene in rechtsventrikulären Anteilen des Septums von Mäusen nachzuweisen. Die Analyse der verwendeten Lysate wurde wie unter 3.6.3 beschrieben zuvor durchgeführt. Der Standard Reagenzmix, welcher die Komponenten für die Probenvorbereitung und den Größenmarker (12-230 kDa) enthielt, wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgetragen. Für jede Kapillare wurden 2,4 µl der Probe mit 0,6 µl 5-facher Fluoreszenz-Mastermischung (als Teil des Standard Reagenzmix enthalten) gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, schnell zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Platte wurde nach dem Pipettierschema des Herstellers mit allen Komponenten beladen und anschließend für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Sowohl die Platte als auch die Kartusche (d.h. Kapillaren) wurden in das Jess-Gerät gelegt und eine vollautomatische Trennung zusammen mit der Immundetektion von Proteinen erfolgte innerhalb von 3 Stunden. Der Nachweis basiert auf Chemilumineszenz unter Verwendung von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Lichtemission wurde mit einer CCD-Kamera detektiert und anschließend von der Compass-Software analysiert. Die Ergebnisse, d.h. die Proteinexpression, die sich in Bandenintensitäten widerspiegelte, wurden sowohl in der traditionellen Laufansicht als auch in Elektropherogrammen angezeigt, die eine Berechnung der Fläche unter der Kurve des jeweiligen Bereichs ermöglichte.

3.7. Statistik

Die Ergebnisse wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts (SD) angegeben. Alle Abbildungen sowie die statistische Analyse wurden mit dem Programm Graph Pad Prism erstellt bzw. berechnet. Die Daten wurden als Balkendiagramm mit einzelnen Datenpunkten, Tabelle, Venn-Diagramm und Reaktomdiagramm dargestellt. Die Anzahl der einzelnen Experimente ist mit „n“ gekennzeichnet und zusammen mit den p-Werten in der jeweiligen Abbildungsunterschrift angegeben.
Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung der Zwei-Wege-ANOVA. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Paulin Brosinsky, Jacqueline Heger, Akylbek Sydykov, Astrid Weiss, Stephan Klatt, Laureen Czech, Simone Kraut, Ralph Theo Schermuly, Klaus-Dieter Schlüter and Rainer Schulz (2024). „Does Cell-Type-Specific Silencing of Monoamine Oxidase B Interfere with the Development of Right Ventricle (RV) Hypertrophy or Right Ventricle Failure in Pulmonary Hypertension?" International Journal of Molecular Sciences, Special Issue Molecular Pharmacology and Interventions in Cardiovascular Disease 25 (11): 6212.

4.1 Hämodynamische Unterschiede zwischen SHAM und PAB

Um die hämodynamischen Veränderungen nach PAB zu quantifizieren, wurden rechtsventrikuläre Katheterisierungen drei Wochen nach PAB und SHAM Operationen von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren durchgeführt. Dabei wurde der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP in mmHg) gemessen. In beiden Gruppen (MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO) konnte ein signifikanter Anstieg des RVSP nach PAB beobachtet werden (Abbildung 15).

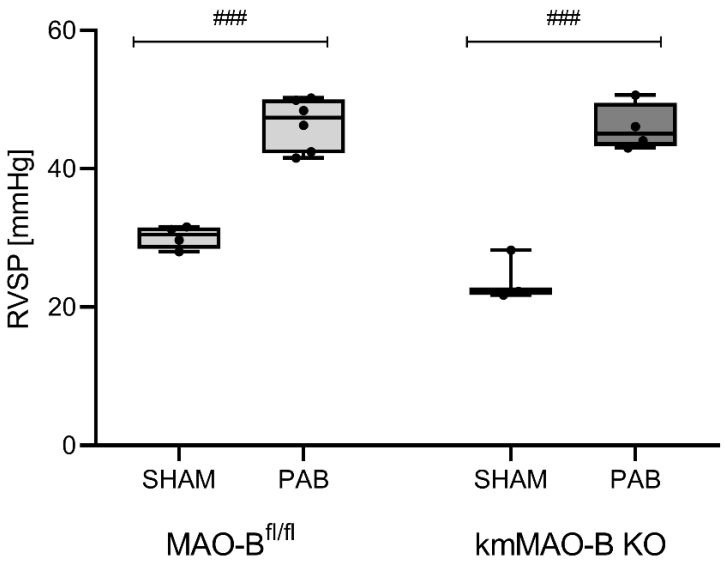
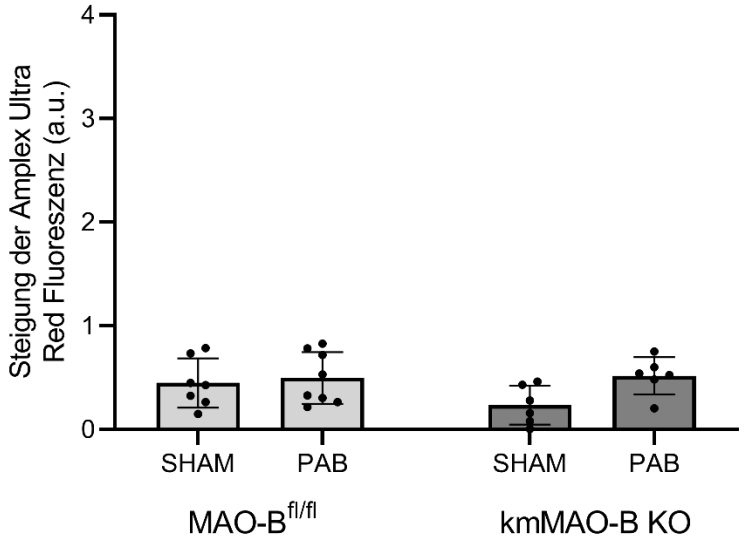


Abbildung 15: Rechtsventrikuläre Katheterisierung. Systemische Hämodynamikmessungen wurden bei Mäusen durchgeführt, die entweder einer SHAM-Operation (MAO-B$^{fl/fl}$ n = 4, kmMAO-B KO n = 3) oder PAB-Operation (MAO-B$^{fl/fl}$ n = 5, kmMAO-B KO n = 4) für drei Wochen ausgesetzt waren. Die Daten des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP in mmHg) sind abgebildet. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD, ###: p < 0,001 dar, der mit der Zwei-Wege-ANOVA analysiert wurde.

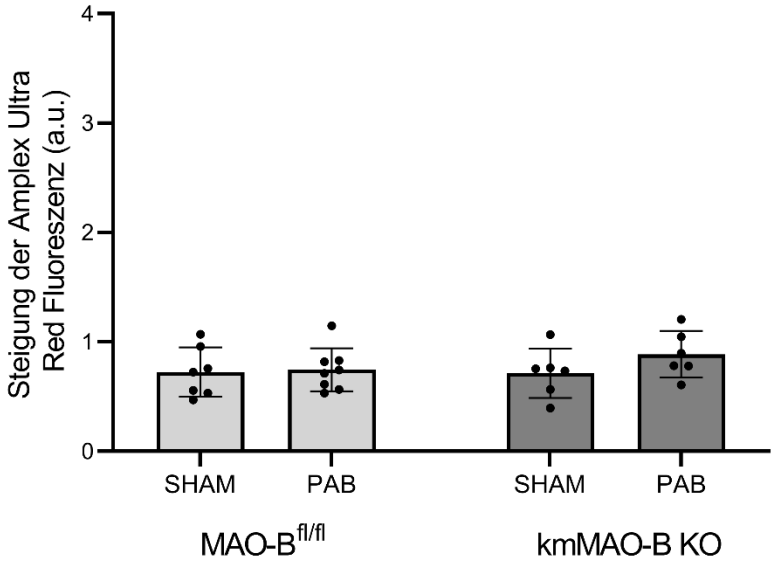
4.2 Effekte vom kardialen MAO-B-Verlust auf die mitochondriale ROS-Produktion

Rechtsventrikuläre Mitochondrien von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren wurden drei Wochen nach den operativen Eingriffen isoliert und auf ihre ROS-Produktion hin untersucht (Abbildung 16). Unter basalen Bedingungen (A) und unter Verwendung des Komplex I-Inhibitors Rotenon (B) war die ROS-Produktion in SHAM und PAB MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren vergleichbar. In Anwesenheit von PEA, einem spezifischen Substrat der MAO-B, hingegen zeigten nur die SHAM und PAB MAO-B$^{fl/fl}$-Mäuse, nicht aber die SHAM und PAB kmMAO-B KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg der ROS (C).

(A) basal



(B) Rotenon



(C) PEA

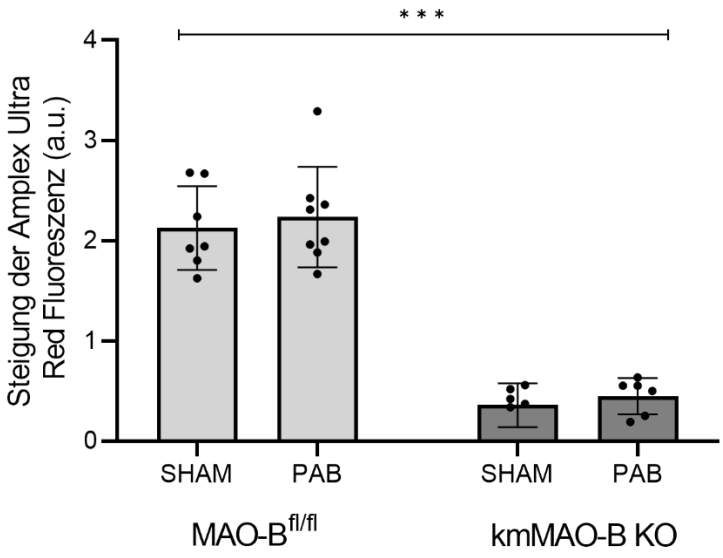
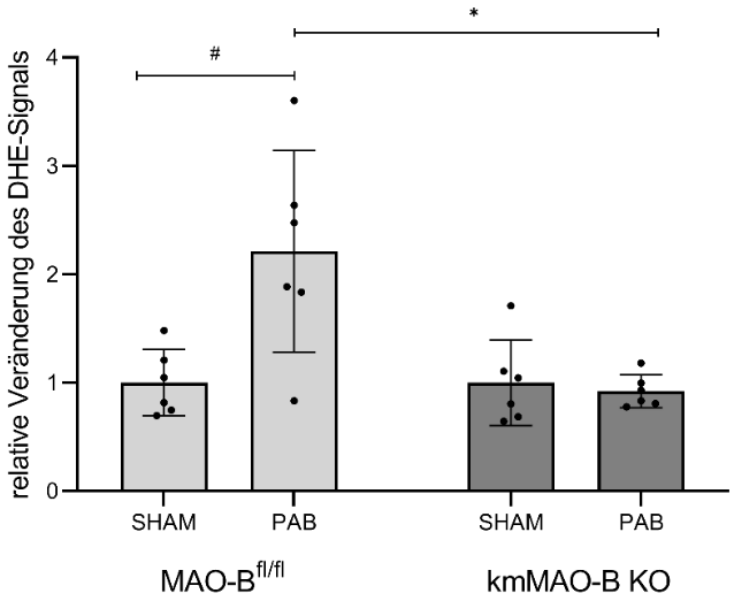


Abbildung 16: Messung der ROS-Produktion mittels der Amplex Ultra Red Methode. In isolierten Mitochondrien aus rechten Ventrikeln von MAO-B$^{fl/fl}$ (SHAM n = 7, PAB n = 8) und kmMAO-B KO-Mäusen (SHAM n = 5, PAB n = 6) wurde drei Wochen nach SHAM oder PAB Operationen die ROS-Produktion gemessen. Dargestellt ist die Steigung der Fluoreszenzzunahme über 1,5 min. Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: basal (**A**), Rotenon (2 µM) (**B**) und PEA (250 µM) (**C**). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, ***: $p < 0{,}001$, es wurde mit der Zwei-Wege-ANOVA analysiert.

4.3 Nachweis von intrazellulärem ROS nach PAB

Um zu überprüfen, ob das kardiomyozytäre Fehlen von MAO-B eine Relevanz für die intrazelluläre ROS-Produktion nach Druckbelastung hat, wurden die rechten Ventrikel drei Wochen postoperativ untersucht. Kryoschnitte des RV-Gewebes wurde mittels DHE-Färbung von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäusen analysiert. Die PAB operierten Tiere der MAO-B$^{fl/fl}$ Gruppe wiesen hierbei eine signifikante Erhöhung des DHE-Signals auf. Dieser Anstieg konnte innerhalb der Gruppe im Vergleich zu SHAM-Tieren und im Vergleich zu den PAB-Tieren der kmMAO-B KO-Mäuse, beobachtet werden (Abbildung 17).

(A)



(B)

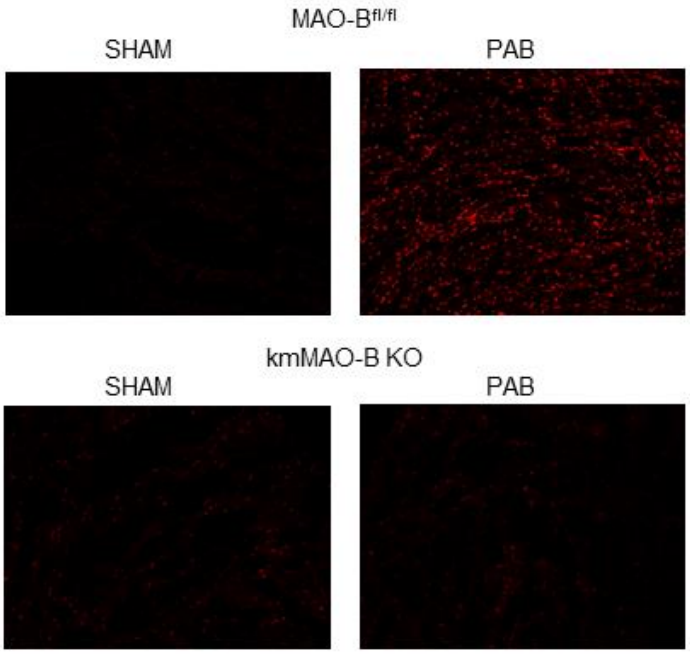


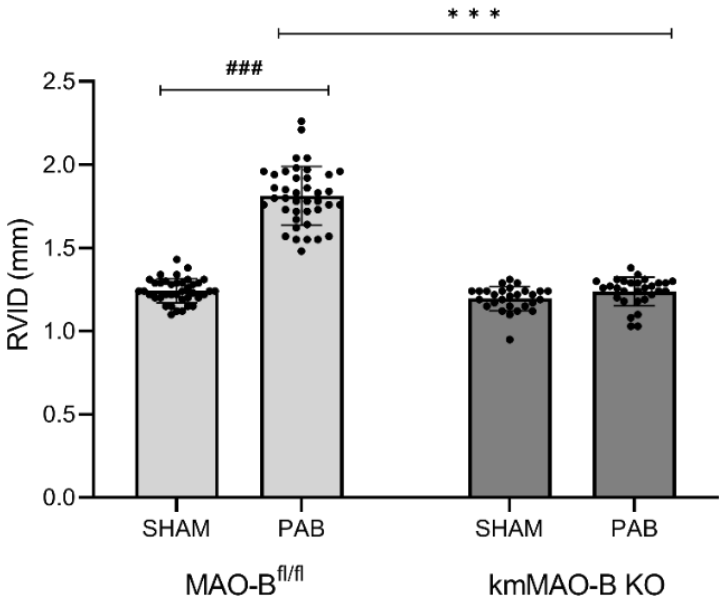
Abbildung 17: **Nachweis von intrazellulärem ROS mittels DHE-Färbung.** Kryoschnitte vom RV-Gewebe aus MAO-B$^{fl/fl}$ (SHAM und PAB je n = 6) und kmMAO-B KO (SHAM und PAB je n = 6) wurden analysiert. Die Quantifizierung der ROS-Bildung wurde durch Messung der Intensität des DHE-Signals erreicht. Die Daten werden als relative Veränderung im DHE-Signal im Vergleich zu MAO-B$^{fl/fl}$ SHAM-Tieren ± SD dargestellt. * und #: $p < 0,05$, die durch Zwei-Wege-ANOVA analysiert wurden (**A**). Repräsentative Bilder von DHE-gefärbtem RV-Gewebe sind in (**B**) dargestellt.

4.4 Beurteilung der rechtsventrikulären Geometrie und Funktion als Reaktion auf Druckbelastung

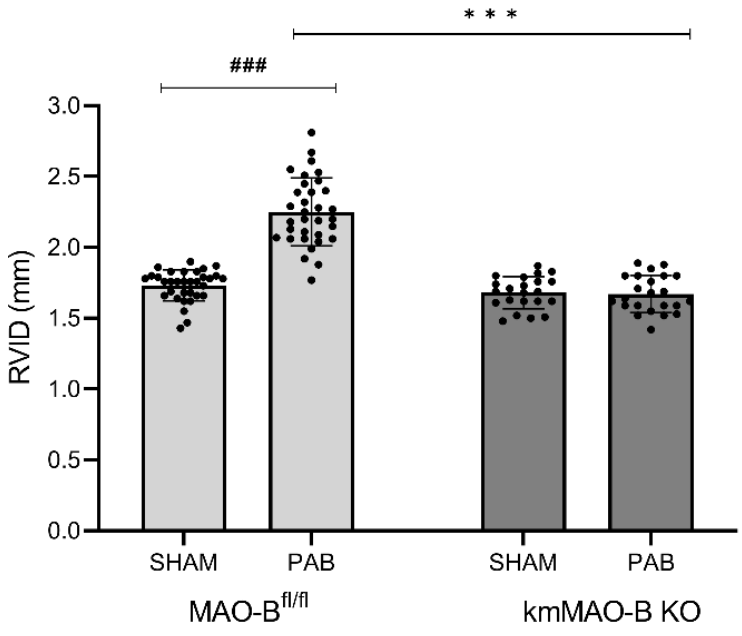
Echokardiographische Messungen wurden durchgeführt, um die Geometrie und Funktion des rechten Ventrikels zu beurteilen. Dafür wurde der Parameter RVID (endsystolisch und enddiastolisch) zur Beurteilung der rechtsventrikulären Dilatation und der Parameter TAPSE zur Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion analysiert (Abbildung 18). Drei Wochen postoperativ wurden alle Tiere (MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO mit je PAB/SHAM OP) echokardiographisch untersucht. Für den Parameter RVID wurde ein signifikanter Anstieg sowohl während der Endsystole als auch während der Enddiastole nach PAB bei den MAO-B$^{fl/fl}$-Tieren, aber nicht bei den Mäusen der kmMAO-B KO-Gruppe beobachtet (A). Die TAPSE

spiegelte bei PAB Mäusen von MAO-B$^{fl/fl}$ eine signifikante Reduktion wider im Vergleich zu SHAM operierten Mäusen dieser Gruppe. Bei den kmMAO-B KO-Tieren konnten keine Unterschiede zwischen SHAM und PAB beobachtet werden. Innerhalb der PAB operierten Tiere war die TAPSE der MAO-B$^{fl/fl}$ -Tiere signifikant vermindert im Vergleich zu kmMAO-B KO-Tieren (B).

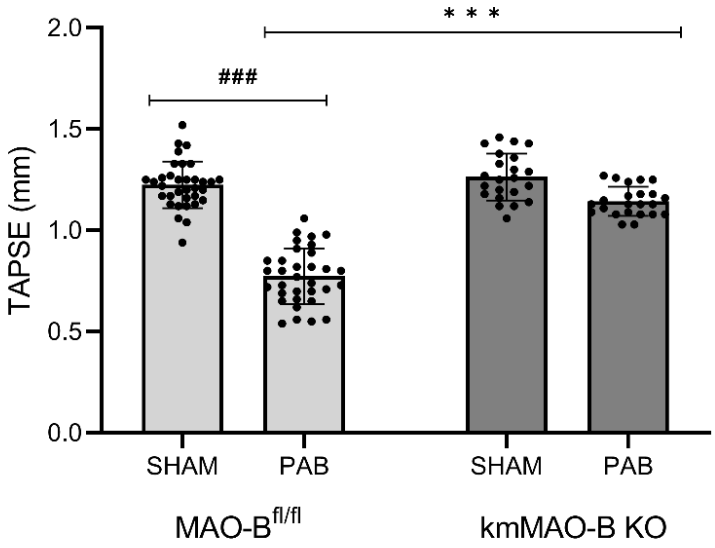
(A) endsystolisch



enddiastolisch



(B)



(C)

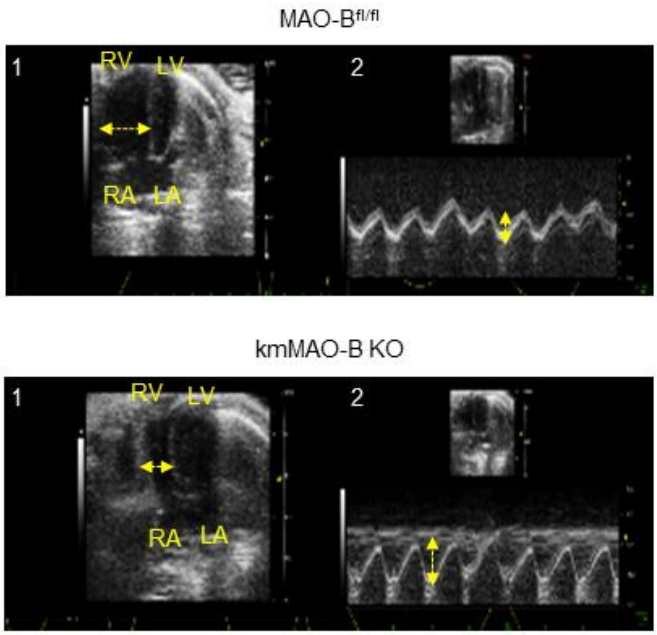


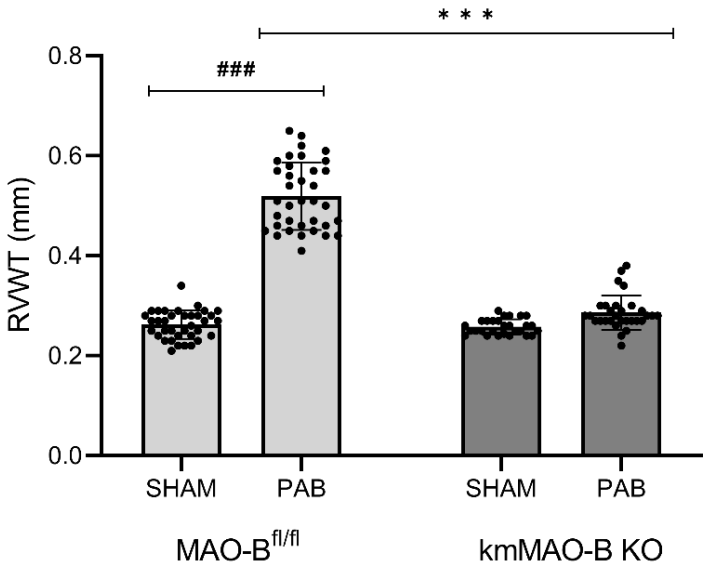
Abbildung 18: Beurteilung der rechtsventrikulären Geometrie und Funktion als Reaktion auf Druckbelastung.

Die RV-Geometrie und -Funktion wurde mittels Echokardiographie drei Wochen nach den PAB- oder SHAM-Operationen bei MAO-B$^{fl/fl}$ (SHAM n = 33, PAB n = 33) und kmMAO-B KO-Mäusen (SHAM n = 22, PAB n = 23) gemessen. Daten für den rechtsventrikulären Innendurchmesser während der Endsystole und der Enddiastole (RVID in mm) (**A**) sowie die systolische Auslenkung der Trikuspidalklappe (TAPSE in mm) (**B**) sind dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, ### und ***: $p < 0,001$, es wurde mit der Zwei-Wege-ANOVA analysiert. Bilder der apikalen Vierkammeransicht (1) und der TAPSE (2) eines repräsentativen MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Herzens nach PAB sind in (**C**) dargestellt.

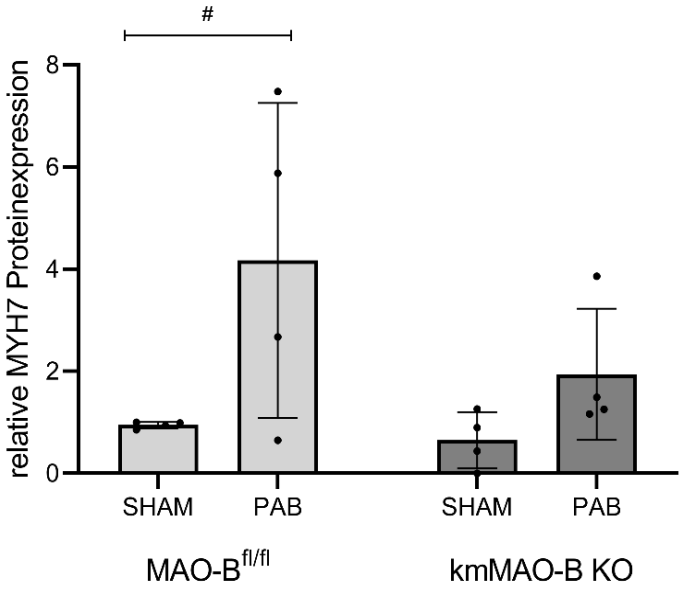
4.5 Analyse des Schweregrads der Hypertrophie

Da ein längerfristiges PAB eine RVH induziert, wurde mittels Echokardiographie und Proteinexpressions-Analysen die Ausprägung dieser Hypertrophie bestimmt. Hierfür wurde der echokardiographische Parameter der rechtsventrikulären Wanddicke (RVWT in mm) analysiert. Für die relative Proteinexpression des Hypertrophiemarkers MYH7 wurden die rechtsventrikulären Anteile der Septa der operierten Tiere verwendet (Abbildung 19). Beide Untersuchungen erfolgten an SHAM und PAB operierten MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren drei Wochen nach den operativen Eingriffen. Der echokardiographische Parameter RVWT spiegelte einen signifikanten Anstieg der Wanddicke zwischen den beiden Operationen innerhalb der MAO-B$^{fl/fl}$-Tiere wider. Außerdem war die RVWT der PAB MAO-B$^{fl/fl}$-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur PAB kmMAO-B KO-Gruppe. Innerhalb der KO-Tiere konnten keine Unterschiede zwischen den operativen Eingriffen verzeichnet werden (A). Bei der Proteinexpression des Hypertrophiemarkers MYH7 zeigten die PAB operierten Kontrolltiere (MAO-B$^{fl/fl}$) eine geringe, aber signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu SHAM-Tieren auf. Bei der kmMAO-B KO-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (B).

(A)



(B)



(C)

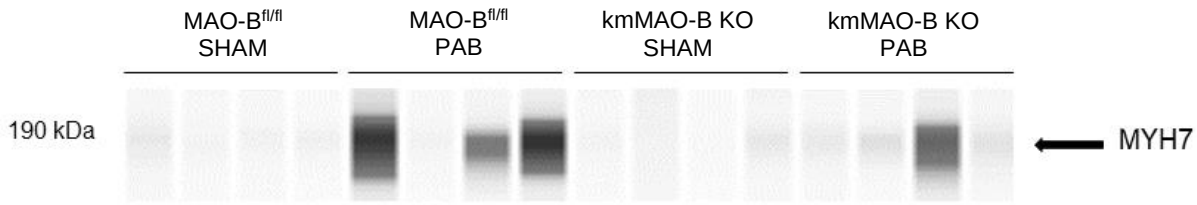


Abbildung 19: Beurteilung der Hypertrophie drei Wochen nach SHAM/PAB Operation. Mittels Echokardiographie wurde die rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT, in mm) bestimmt. Jeder Punkt steht für ein Tier. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD für MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäuse dar (**A**). Das Jess Simple Western-System wurde verwendet, um den Hypertrophiemarker MYH7 auf Proteinebene im rechtsventrikulären Anteil des Septums von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäusen (n = 4 für jede der vier Bedingungen) nachzuweisen. Die Proteinexpression wurde auf das Protein Vinculin normalisiert. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD in Bezug auf die MAO-B$^{fl/fl}$ SHAM-Gruppe dar (**B**). Beide Diagramme wurden mittels Zwei-Wege-ANOVA analysiert, #: $p < 0,05$, ### und ***: $p < 0,001$. In (**C**) ist der Lauf des Western Blots abgebildet

4.7 Analyse der Metaboliten während PAB und die Rolle für MAO-B

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten, welche während der Druckbelastung ansteigen und als Substrat der MAO-B fungieren können, wurde RV-Gewebe von MAO-B$^{fl/fl}$

und kmMAO-B KO-Tieren drei Wochen nach SHAM/PAB Eingriffen untersucht. Potentielle Substrate der MAO-B wurden dabei analysiert. Das kardiomyozytäre Fehlen von MAO-B resultierte in einer signifikanten Zunahme von Histamin (A) nach PAB in kmMAO-B KO-Tieren. Die gleiche Zunahme konnte für Ethanolamin (B) verzeichnet werden. Der Anstieg der Substratkonzentrationen in den kmMAO-B KO-Tieren zeigt, dass diese in den MAO-B$^{fl/fl}$-Tieren von der MAO-B verstoffwechselt werden (Abbildung 20).

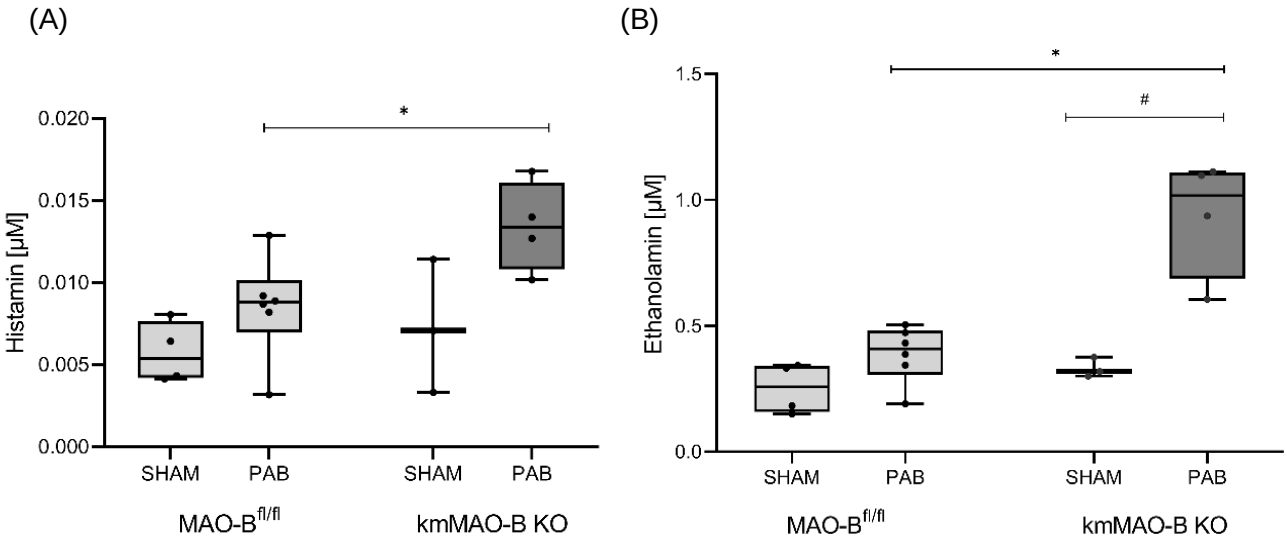
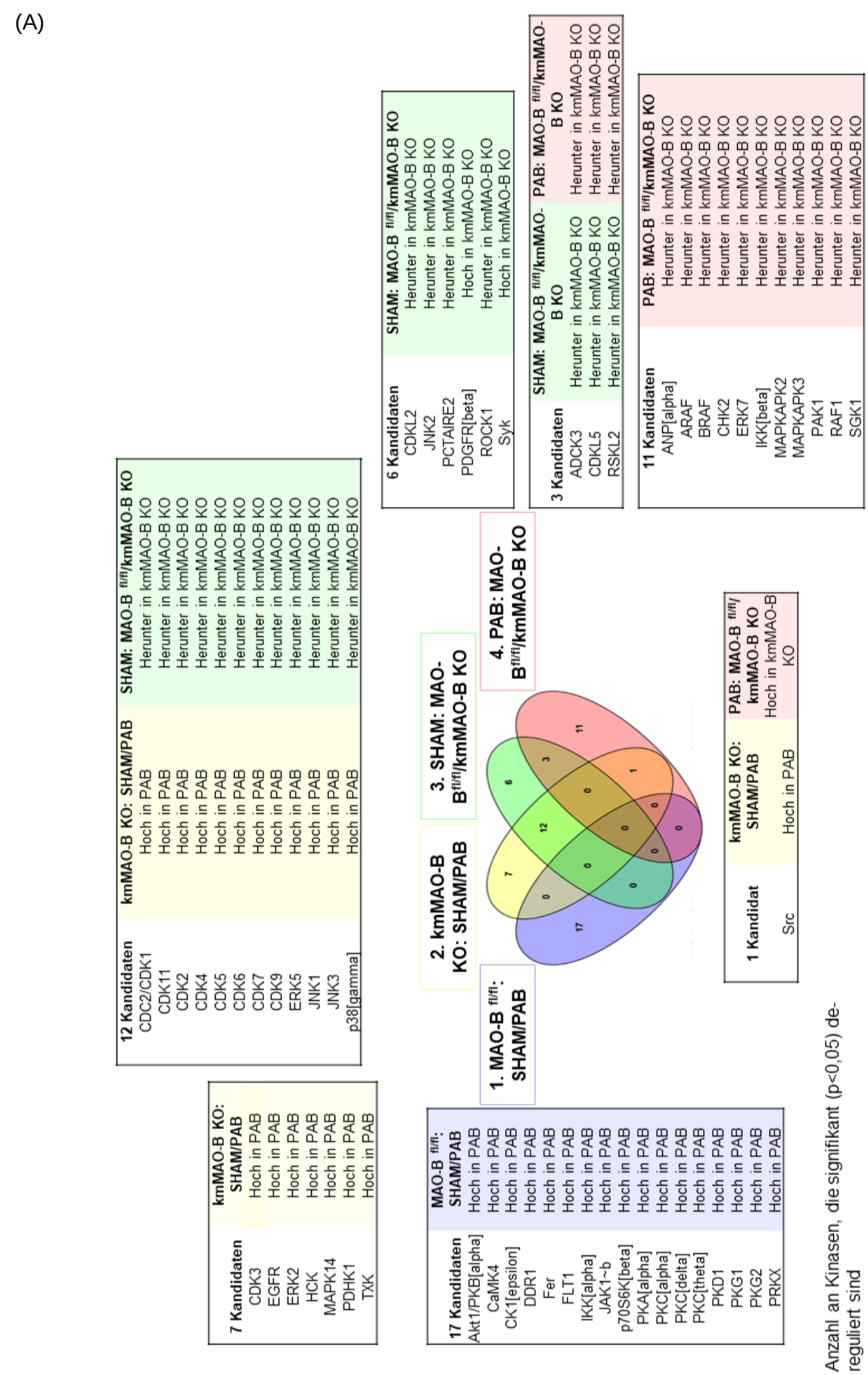


Abbildung 20: Analyse der Metaboliten im rechten Ventrikel während Druckbelastung. Die LC-MS/MS-Analyse wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten aus dem RV-Gewebe genutzt. Die Konzentrationen (in µM) der MAO-B-Substrate Histamin (**A**) und Ethanolamin (**B**) wurden drei Wochen postoperativ analysiert. Die Daten sind für MAO-B$^{fl/fl}$ (SHAM n = 4, PAB n = 6) und kmMAO-B KO-Mäuse (SHAM n = 3, PAB n = 4) angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, * und #: $p < 0,05$, die mit der Zwei-Wege ANOVA analysiert wurde.

4.8 Analyse der Kinase-Aktivitäten nach PAB

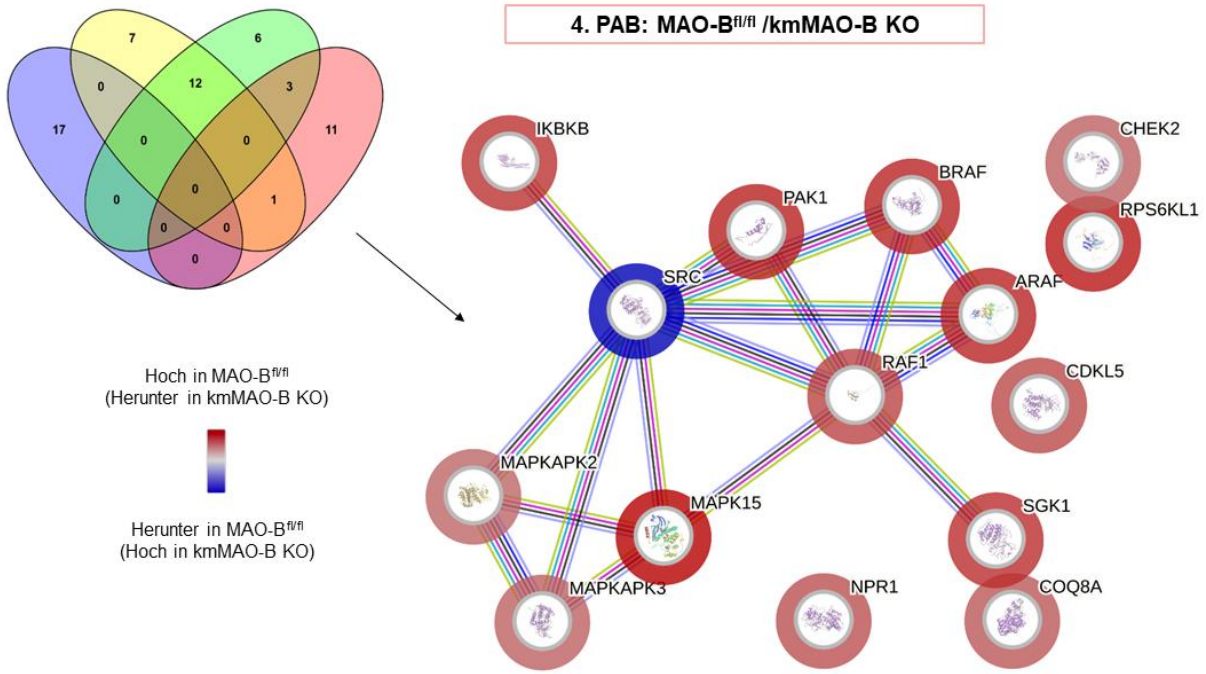
Um die Rolle der MAO-B bei hypertrophen Prozessen im Herzen zu erfassen, wurde ein Peptid-basierter Proteinkinase-Assay durchgeführt. Dabei wurden die rechtsventrikulären Anteile der Septa von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäusen drei Wochen nach SHAM/PAB Operationen verwendet. Die Proteinkinasen, die während der genannten Interventionen signifikant de-reguliert waren, sind in zwei Diagrammen abgebildet: Ein Venn-Diagramm und ein Reaktomdiagramm. In den kmMAO-B KO-Tieren sind einige Proteinkinasen nach PAB im Vergleich zu den Kontrolltieren (MAO-B$^{fl/fl}$) herunterreguliert (Abbildung 21).

(A)



Anzahl an Kinasen, die signifikant ($p<0,05$) de-reguliert sind

(B)



Ereignisse für 4. PAB:
MAO-B$^{fl/fl}$/ kmMAO-B KO

p38MAPK Ereignisse
Signaling von NTRK1 (TRKA)
Signaling nach ERKs
RAF Aktivierung
MAP2K und MAPK Aktivierung
Signaling durch moderate Kinaseaktivität BRAF-Mutanten
Signaling durch BRAF-Mutanten mit hoher Kinaseaktivität
Signaling durch BRAF- und RAF1-Fusionen
Paradoxe Aktivierung des RAF-Signalwegs durch Kinase-inaktives BRAF
Nachstehendes Signaling von RAS-Mutanten
Signaling durch RAF1-Mutanten
SHOC2 M1731-Mutante hebt MRAS-Komplexfunktion auf
Funktionserhöhung von MRAS Komplexen aktiviert RAF signaling
VEGFA-VEGFR2 Signalweg
Signaling durch Rezeptor-Tyrosinkinasen
Typ-C Lektionrezeptoren
Signalkaskaden der MAPK-Familie
Negative Regulation des MAPK-Signalwegs
Aktivierung der MAP-KinaseNegative
Rückkopplungsregulation des MAPK-Signalwegs

Abbildung 21: Kinase-Assoziationsnetzwerke. Funktionelle Proteinassoziationsnetzwerke von Kinasen wurden in rechtsventrikulären Anteilen des Septums von Mäusen vor dem Hintergrund des MAO-B-*Knockouts* und/oder Druckbelastung analysiert. MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Mäuse wurden einer PAB- Operation unterzogen (n = 4, für jede Gruppe). Nach drei Wochen wurden Proteinlysate aus den rechtsventrikulären Anteilen der Septa für das Kinom-*Profiling* präpariert. Sequentielle Zweigruppenvergleiche wurden durchgeführt, um Kinasen zu identifizieren, die aufgrund des genetischen Hintergrunds und als Reaktion auf Druckbelastung unterschiedlich reguliert waren. Die resultierenden Ergebnisse wurden auf die Webseite der String-Proteindatenbank hochgeladen, um Bilder zu erstellen, die funktionelle Beziehungen darstellen und Protein-, d.h. Kinase-Assoziationsnetzwerke aufzeigen. Das Venn-Diagramm (**A**) zeigt die Anzahl der Kinasen, die nicht nur in einem, sondern in mehreren Zweigruppenvergleichen signifikant ($p < 0,05$) dereguliert sind. Für das Reaktomdiagramm spiegelt die äußere Farbe die Kinaseaktivität wider, die für 4. PAB: MAO-B$^{fl/fl}$/kmMAO-B KO hervorgehoben ist. Die 20 wichtigsten Interaktionspartner, die mit den jeweiligen Kinasen des Netzwerks verbunden sind, sind darunter aufgelistet (**B**).

4.6 Auswirkung der Druckbelastung auf das kardiomyozytäre Kontraktionsverhalten

Zur Beurteilung der Funktion von rechtsventrikulären Kardiomyozyten wurden Zellen aus MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO-Tieren drei Wochen postoperativ isoliert. Die Parameter der diastolischen Zelllänge (Ldiast in µm), Kontraktionsgeschwindigkeit (Con Vel in µm/s), Relaxationsgeschwindigkeit (Rel Vel in µm/s) und zur lastfreien Zellverkürzung (dL/L in %) wurden erhoben und wiesen keine signifikanten Veränderungen zwischen den untersuchten Gruppen auf (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bestimmung der Zellkontraktion.
Die Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten aus den RVs drei Wochen nach PAB (MAO-B$^{fl/fl}$ n = 6, kmMAO-B KO n = 5) oder SHAM (MAO-B$^{fl/fl}$ n = 6, kmMAO-B KO n = 6) Operationen ist dargestellt. Es sind Daten zur diastolischen Zelllänge (Ldiast in µm), Kontraktionsgeschwindigkeit (Con Vel in µm/s), Relaxationsgeschwindigkeit (Rel Vel in µm/s) und zur lastfreien Zellverkürzung (quantifiziert als prozentuale Verkürzungsamplitude, normiert auf die diastolische Zelllänge der einzelnen Zellen, dL/L) dargestellt. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar.

	RV	Ldiast (µm)	Con Vel (µm/s)	Rel Vel (µm/s)	dL/L (%)
MAO-B$^{fl/fl}$	*SHAM*	109.93 ± 9.79	202.63 ± 51.36	166.05 ± 45.05	8.53 ± 1.82
	PAB	111.32 ± 7.23	182.99 ± 46.88	151.03 ± 45.33	7.65 ± 7.65
kmMAO-B KO	*SHAM*	112.08 ± 11.66	215.58 ± 72.75	180.14 ± 59.07	9.10 ± 2.44
	PAB	108.36 ± 11	183.64 ± 48.88	152.43 ± 45.1	8.30 ± 2.08

5. Diskussion

Die Bedeutung von MAOs bei Herzerkrankungen ist bislang nur teilweise beschrieben, jedoch lassen die bisherigen Untersuchungen auf eine zentrale Rolle dieser Enzyme schließen. Sowohl die Aktivität von MAO-A, als auch von MAO-B konnten bereits mit der Entstehung einer kardialen Hypertrophie in Zusammenhang gebracht werden. Wie bereits unter 1.8 beschrieben, wurden verschiedene Modelle der MAO-Hemmung vor dem Hintergrund der kardialen Hypertrophie untersucht.

Die Bedeutung von Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B im RV bei einer PAH ist ungeklärt, wird aber vermutet (Sommer and Schulz 2021). Daher wurde die, mit dem Cre/lox-System erzeugte und zuvor etablierte (Heger et al. 2021), Kardiomyozyten-spezifische und Tamoxifen-induzierbare MAO-B-*Knockout*-Maus (kmMAO-B KO) verwendet. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung der MAO-B-vermittelten ROS-Bildung auf die RV-Dilatation und -Funktion als Reaktion auf das pulmonalarterielle *Banding* (PAB) im induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B-*Knockout*-Mausmodell untersucht werden. Die wichtigsten gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Als Voraussetzung für die nachfolgenden Analysen konnte in beiden Gruppen (MAO-$B^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO) eine signifikante Erhöhung des RVSP nach PAB während der rechtsventrikulären Katheterisierung gemessen werden. Demnach stellte sich das PAB-Modell als geeignetes Verfahren zur Untersuchung einer RVH heraus. Zudem war die Induktion des Kardiomyozyten-spezifischen *Knockouts* von MAO-B durch Tamoxifengabe nachweisbar. Unter der Verwendung des MAO-B-spezifischen Substrats PEA, in isolierten Mitochondrien des RV, wurde kein Anstieg der ROS-Produktion in kmMAO-B KO-Tieren, anders als in MAO-$B^{fl/fl}$-Tieren, gemessen. Der intrazelluläre Nachweis von ROS mittels DHE-Färbung in histologischen Schnitten des RV zeigte außerdem, dass eine RV-Druckbelastung die myokardiale ROS-Bildung in einer MAO-B-abhängigen Weise erhöht. Dieser Befund belegt MAO-B als myokardiale Quelle von ROS in Stresssituationen wie einer Druckbelastung.
Die Metabolom-Analyse belegte zudem, dass Histamin und Ethanolamin nach PAB vermehrt freigesetzt werden und von MAO-B als Substrate zur ROS-Bildung verwendet werden, da diese zwei Metabolite in kmMAO-B KO-Tieren nur nach PAB signifikant erhöht waren. Redox-sensitive Proteinkinasen wurden in MAO-$B^{fl/fl}$-Tieren, nicht aber in kmMAO-B KO-Tieren aktiviert; viele dieser Proteinkinasen sind am hypertrophen Wachstum beteiligt.
Tatsächlich blieb die Geometrie und Funktion des RV nach PAB durch das Kardiomyozyten-spezifische Fehlen von MAO-B, im Gegensatz zu PAB operierten Kontrollmäusen, erhalten. Darüber hinaus war die Entwicklung einer Hypertrophie nach PAB sowohl *in vivo*

(Echokardiographie, RV Wanddicke) als auch *in vitro* (Western Blot, Proteinebene) durch den Kardiomyozyten-spezifischen KO von MAO-B aufgehoben. Daher scheint der kmMAO-B KO die rechtsventrikulären *Remodeling*-Prozesse aufzuheben.
Interessanterweise war die Funktion von isolierten RV-Kardiomyozyten weder durch Druckbelastung noch durch das myokardiale Fehlen von MAO-B beeinträchtigt.

5.1 MAO und ROS

Die mitochondriale Funktion ist bei Herzversagen tiefgreifend verändert (Kaludercic et al. 2011). Da innerhalb der Mitochondrien ROS von verschiedenen Molekülen gebildet wird, war die Untersuchung dieser naheliegend. Erwiesenermaßen stellen vermehrte ROS-Moleküle entscheidende Akteure bei Herzerkrankungen dar. Eine übermäßige ROS-Produktion kann zu oxidativem Stress (Binek et al. 2024; Giordano 2005) und nachfolgend zur Aktivierung von Redox-sensitiven Proteinkinasen und einer kardialen Hypertrophie führen (Bogaard et al. 2009; Qipshidze et al. 2012). Die Quelle der erhöhten myokardialen ROS-Produktion ist bisher nur teilweise aufgeklärt und immer noch umstritten.

Unter basalen Bedingungen und nach der Verwendung des Komplex I Inhibitor Rotenon konnten keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen in der ROS-Produktion aus isolierten Mitochondrien gemessen werden. Weder die Art der Operation, noch das kardiomyozytäre Fehlen von MAO-B hatten Einfluss auf die ROS-Produktion. Da Rotenon die Bildung von ROS durch Hemmung des Elektronentransfers von Komplex I zu Ubiquinon erhöht (Li et al. 2003), wäre eine Steigerung der ROS-Produktion unter Verwendung des Komplex I Inhibitor zu erwarten. Da dieser Effekt in allen Gruppen fehlte, lässt sich vermuten, dass weder die Operation noch der *Knockout* einen Einfluss auf die Funktion und Vitalität der Mitochondrien hatte. Generell schienen jedoch die Mitochondrien aller Gruppen leicht beeinträchtigt zu sein. Der fehlende Anstieg der ROS-Produktion könnte durch die aufwendige Isolation von Mitochondrien aus Ventrikeln, die zuvor noch getrennt werden müssen, im Vergleich zu der Isolation von Mitochondrien aus dem gesamten Herzen bedingt sein. Das zügige Arbeiten jedoch ist Grundvoraussetzung bei dieser Methode der ROS-Messung, da die Aktivität der Mitochondrien schnell beeinflusst werden kann.

Für das, ebenfalls mitochondriale, Protein p66shc konnten ähnliche Beobachtungen bezüglich der ROS-Produktion unter basalen Bedingungen gemacht werden. Auch hier wurde in SHAM

und PAB operierten Tieren die ROS-Produktion mit der gleichen Methode verglichen (isolierte RV-Mitochondrien wurden untersucht). Die Art der Operation hatte auch bei dieser Arbeit keine Auswirkungen auf die Bildung von ROS. Gegensätzlich zu dem Befund in der vorliegenden Arbeit, hatte jedoch das Fehlen von p66shc einen Einfluss auf die ROS-Bildung unter Rotenon. In diesem Fall führte die Hemmung vom Komplex I zu einer signifikanten Zunahme von ROS nach PAB in den Kontrolltieren. Erklärt wurde dieser Effekt mit einer Zunahme der p66shc-Aktivität in den Mitochondrien der Kontrolltiere (Hirschhäuser et al. 2020). Da mitochondriales p66shc bei oxidativem Stress aus dem inhibitorischen Komplex dissoziiert und dadurch aktiviert wird (Orsini et al. 2006), könnte die Rotenon-induzierte ROS-Bildung einen ausreichenden Stimulus dafür darstellen. Dadurch würde p66shc aktiviert werden und zur weiteren ROS-Bildung in den Mitochondrien der Kontrollmäuse führen (Hirschhäuser et al. 2020). MAO-B hingegen scheint keine Bedeutung für die akute H_2O_2-Produktion der Mitochondrien innerhalb der Kontrollgruppe zu haben. Im Gegensatz zu p66shc werden MAOs nicht durch oxidativen Stress aktiviert, sondern die ROS-Produktion wird durch die Enzymmenge und die Verfügbarkeit der Substrate reguliert. Demnach kann die Inhibition von Komplex I in keiner erhöhten MAO-B-Aktivität resultieren und folglich zu keiner vermehrten ROS-Bildung in den RV-Mitochondrien in MAO-$B^{fl/fl}$-Mäusen führen.

5.1.1 MAO und ihre Substrate

MAOs werden vorrangig im Gehirn exprimiert und sind dort essenziell für den zügigen Abbau von Monoaminen. Somit hat sich die MAO-Hemmung als therapeutisches Mittel bei Depressionen oder Parkinson-Erkrankungen erwiesen (Youdim and Bakhle 2006; Bortolato, Chen, and Shih 2008). Zudem werden MAOs auch im Herzen exprimiert (Saura et al. 1996; Rodríguez et al. 2001), wohingegen MAO-B besonders im Herzen von Maus und Mensch nachgewiesen wurde (Dorris 1982; Sivasubramaniam et al. 2003). MAOs sind für die oxidative Desaminierung von Katecholaminen verantwortlich, wobei ROS und Aldehyde als Nebenprodukt entstehen (Peoples et al. 2019; Di Lisa et al. 2009; Aljanabi et al. 2021). Bekannte Substrate der MAO-B sind Dopamin (Kaludercic, Carpi, et al. 2014), PEA (Maggiorani et al. 2017), Histamin (Costiniti et al. 2018) und Ethanolamin (Edwards 1978).

Es konnte gezeigt werden, dass Mäusen, denen entweder MAO-A oder MAO-B, oder beide MAO-Isoformen fehlten, einen erhöhten Spiegel von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und Phenylethylamin im kardialen Gewebe aufwiesen (Holschneider et al. 2002; Kaludercic, Carpi,

et al. 2014; Kaludercic et al. 2010; Lairez et al. 2009). Zudem wiesen Ratten mit einem MAO-A KO eine erhöhte Serotoninkonzentration in Blut und Gewebe auf (Lairez et al. 2009). Außerdem konnte die Blockade von MAO durch Medikamente, die für andere Indikationen eingesetzt wurden (z. B. Antidepressiva), den Histamingehalt im Herzen von Mäusen verändern (Neumann et al. 2021).
Interessanterweise hat Histamin auch einen großen Einfluss auf die Pathophysiologie des Herzens. Histamin kann über die Aktivierung des Histamin-H2-Rezeptors (Potnuri et al. 2018) bei Bluthochdruck zur Hypertrophie des Herzens beitragen (Saheera et al. 2022). Außerdem führte eine Veränderung im Ansprechen des Histamin-H2-Rezeptors (Polymorphismus) bei Patienten zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Leary et al. 2018). Vor dem Hintergrund des akuten Myokardinfarkts in Mäusen unterdrückten jedoch erhöhte Histamin-Konzentrationen die Hypoxie-induzierte Autophagie und Apoptose in Kardiomyozyten (Ding et al. 2018).

Angaben von Ethanolamin im Herzen deuten auf eine kardioprotektive Rolle von Ethanolamin gegen Ischämie/Reperfusionsverletzungen hin. Ethanolamin reduzierte die irreversible Schädigung des Herzens durch Ischämie und Reperfusion durch die Aktivierung vom *signal transducer and activator of transcription* 3 (STAT-3) in Mäusen und Ratten. Dieser kardioprotektive Effekt ging allerdings bei Kardiomyozyten-spezifischen STAT-3-defizienten Mäusen verloren (Kelly et al. 2010). Die Rolle beider Substrate der MAO-B im Zusammenhang mit PAH ist bislang ungeklärt.

Die Aktivierung von MAO-B durch Katecholamine konnte in dieser Arbeit während der Metabolom-Analyse nachvollzogen und die gesteigerte ROS-Produktion aus isolierten Mitochondrien als Konsequenz erfasst werden. Der Kardiomyozyten-spezifische *Knockout* von MAO-B erhöhte die Histamin- und Ethanolaminwerte im Herzen von Mäusen nach PAB. Dieser Nachweis bestätigt, dass die oben genannten Substrate nach PAB vermehrt freigesetzt und als Substrate von MAO-B für die Bildung von ROS im Herzen genutzt werden. Jedoch war trotz der Zunahme der Histamin-Konzentration im RV von kmMAO-B KO-Mäusen, die durch die Druckbelastung ausgelöste RVH geringer, was damit im Kontrast zu den zuvor erwähnten Arbeiten steht. Als mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte die Spezies (Ratte vs. Maus), sowie der untersuchte Ventrikel (LV vs. RV) (Potnuri et al. 2018) oder gar die Nutzung isolierter Mastzellen (Saheera et al. 2022) angeführt werden.

Die, in dieser Studie durchgeführten, ROS-Produktionsmessungen der isolierten RV-Mitochondrien bestätigte zudem das Kardiomyozyten-spezifische Fehlen von MAO-B. In Anwesenheit von PEA, dem spezifischen Substrat der MAO-B (Grimsby et al. 1997;

Maggiorani et al. 2017), konnte ein signifikanter Anstieg in der Kontrollgruppe gemessen werden. Diese Zunahme wurde nicht bei kmMAO-B KO-Mäusen beobachtet, was auf eine Inaktivität von MAO-B in den Kardiomyozyten deutet. Bei einer MAO-B-Aktivität und der Anwesenheit von PEA wird das Substrat verstoffwechselt und ROS wird als Nebenprodukt gebildet. Somit lässt sich anhand dieser Messungen bestätigen, dass der induzierbare und Kardiomyozyten-spezifische MAO-B KO erfolgreich war.

5.1.2 Intrazelluläres ROS

Als Ursprung einer erhöhten ROS-Bildung konnten schon bei verschiedenen Herzerkrankungen die MAOs ermittelt werden.
Beispielsweise ist MAO-A als myokardiale Quelle von ROS bereits identifiziert und ihre Beteiligung an der Entstehung einer Herzinsuffizienz, des myokardialen Ischämie/Reperfusion-Schadens sowie der diabetischen Kardiomyopathie belegt (Kaludercic et al. 2010; 2011; Sturza et al. 2015; Umbarkar et al. 2015; Manni et al. 2016). Zudem ist kürzlich in Mäusen beschrieben worden, dass Kardiomyozyten-spezifisches MAO-A an der Entstehung von Herzrhythmusstörungen beteiligt ist: Mit der MAO-A-Hemmung in Kardiomyozyten konnte eine anti-arrhythmische Wirkung gezeigt werden. Erklärt wurde dieser Befund damit, dass mit der Inhibition von MAO-A die diastolische Kalziumhomöostase trotz einer gesteigerten Katecholamin-Konzentration durch die MAO-A-Hemmung verbessert wurde. Mechanistisch wurde dieser Nachweis mit der verringerten ROS-Produktion erklärt, welche zu einer verminderten Oxidation der Typ-II-Proteinkinase A und der Calmodulinkinase II führte (Shi et al. 2024). Somit konnte MAO-A erneut unter bestimmten Stressbedingungen (Katecholaminanstieg) als myokardiale Quelle von ROS belegt werden.
Für die MAO-B wurden ebenfalls Zusammenhänge zwischen einer gesteigerten ROS-Produktion und Herzerkrankungen aufgezeigt. Mit der Verwendung der genetisch kodierten Redox-sensitiven Fluoreszenzsonde HyPer wurde die mitochondriale H_2O_2-Produktion in isolierten Kardiomyozyten von Mäusen untersucht. Das globale Fehlen von MAO-B führte zu einer verringerten H_2O_2-Produktion bei Mäusen mit einer linksventrikulären Hypertrophie. Eine gesteigerte MAO-Aktivität hingegen förderte die Entstehung von oxidativem Stress (Kaludercic, Carpi, et al. 2014). Darüber hinaus, wurde die Kardiomyozyten-spezifische MAO-B-Aktivität in Verbindung mit der Ausprägung von linksventrikulären Infarktgrößen *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Heger et al. 2021; 2023).

Vor dem Hintergrund der Präeklampsie, eine hypertensive Erkrankung während der Schwangerschaft, wurde bereits intrazelluläres ROS mittels DHE-Färbung nachgewiesen. Eine erhöhte MAO-Expressionen in der Plazenta war hierbei für eine Zunahme des oxidativen Stresses verantwortlich (Bînă et al. 2022).
Auch bei den durch eine pulmonale Hypertonie-induzierten RV-Veränderungen scheint die MAO-B bedeutsam: Die intrazelluläre ROS-Detektion aus RV-Kryoschnitten zeigte eine signifikante Zunahme der DHE-Fluoreszenz in den Kontrolltieren drei Wochen nach PAB, welche nach dem Kardiomyozyten-spezifischen *Knockout* von MAO-B vollständig aufgehoben war. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem Nachweis der kürzlich erschienenen Studie zu Kardiomyozyten-spezifischen MAO-A in Mäusen (Shi et al. 2024). Daher scheint der Beitrag der MAOs zur stressinduzierten ROS-Bildung vom zugrundeliegenden Stimulus abhängig zu sein (Katecholaminstress vs. Druckbelastung).

5.2 MAO und der RV

Die Rolle der MAOs bei LV-Erkrankungen ist in zahlreichen Studien belegt (Deshwal et al. 2017; 2018; Antonucci et al. 2021; Kaludercic, Arusei, and Di Lisa 2023). Daten über die Bedeutung von MAOs für RV-Erkrankungen sind selten, jedoch wurde eine Beteiligung bei der Entstehung einer PH bereits spekuliert (Sommer and Schulz 2021).

Eine PAH ist mit rechtsventrikulären Umbauprozessen und Dysfunktionen assoziiert und kann schließlich zur HI führen (Maron et al. 2021). Demnach kann PAH einen tödlichen Verlauf haben, sofern die Erkrankung zu spät oder ungenügend diagnostiziert wird (Deaño et al. 2013). Das Überleben von Patienten ist hierbei eng mit der verbleibenden Funktion des RVs verknüpft (Sztrymf et al. 2010; Naeije and Manes 2014).

5.2.1 PAH-Induktion und MAO

Zur Induktion einer PAH kommen verschiedene Methoden infrage. Anhand von hämodynamischen Messungen lässt sich die Druckbelastung des RV (RVSP in mmHg) bestimmen. Mäuse, bei denen mittels Sugen5416/Hypoxie (Su/Hx) eine PAH induziert wurde,

erreichten nach drei Wochen einen RVSP von ~ 40-50 mmHg (Ciuclan et al. 2011; Vitali et al. 2014; Bikou et al. 2020).
Hinweise zu einem genetischen Beitrag zur Entstehung der PAH lieferte eine Mutation des *Bone morphogenetic protein receptor 2* (BMPR2) (Nichols et al. 1997; Deng et al. 2000; Lane et al. 2000). Bei transgenen Mäusen mit einer induzierbaren Gefäßmuskel-spezifischen dominant-negativen Form von BMPR2, stiegen die RVSP-Werte auf ~ 55 mmHg an (West et al. 2004).

Eine Studie verglich zudem die drei gängigsten Verfahren zur Induktion einer PAH in Ratten: PAB, SuHx und Monocrotalin-Injektion (MCT). Alle drei Varianten erzielten ähnliche RVSP-Werte von ungefähr 70 mmHg für die spezifischen Parameter der Pathogenese dieser Erkrankungen (Akazawa et al. 2020).
Zur Simulation der PAH wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des PAB-Verfahrens verwendet: Bei diesem chirurgischen Eingriff wird ein Clip um die Pulmonalarterie gesetzt und damit eine 70-80 %ige Stenose der Pulmonalarterie erreicht (Ukita et al. 2021; Mamazhakypov et al. 2023). Die PAB-Operation steigerte den RVSP (rechtsventrikuläre Katheterisierung) von MAO-B$^{fl/fl}$ sowie kmMAO-B KO-Mäusen gleichermaßen signifikant auf 40-50 mmHg.
Der normale systolische Pulmonalarteriendruck beträgt zwischen 15-30 mmHg, der mittlere Pulmonalarteriendruck (mPAP) 8-20 mmHg: Ein mPAP von > 25mmHg entspricht somit dem Krankheitsbild einer PAH (Douschan et al. 2018; Strange et al. 2019). Obwohl der mPAP in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurde kann man bei einem RVSP von 40-50 mmHg von dem Vorliegen einer PAH ausgehen.

Ratten, bei denen mittels Injektion von MCT (van Eif, Bogaards, and van der Laarse 2014) oder Su/Hx oder durch PAB (Sun et al. 2021) eine PAH induziert wurde, zeigten eine Hochregulierung der MAO-A-Expression in den Lungengefäßen und ein Rechtsherz-Versagen. Eine Behandlung von Su/Hx-Ratten mit dem MAO-A Hemmer Clorgylin reduzierte die RV-Nachlast und den pulmonalen Gefäßumbau. Gegensätzlich dazu, hatte die Verwendung von Clorgylin keine Auswirkungen auf die durch PAB-induzierte Verschlechterung der RV-Funktion und Geometrie (Sun et al. 2021). Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Sowohl die Zunahme des RVID (systolisch wie diastolisch), als auch die Abnahme der TAPSE zeigten sich mit dem Fehlen von MAO-B in Kardiomyozyten von Mäusen nach PAB unverändert. Somit bewahrte der induzierbare, Kardiomyozyten-spezifische MAO-B KO die RV-Geometrie und –Funktion nach Druckbelastung durch PAB. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zur Arbeit von Sun et al. könnte die Wahl der Druckbelastung sein. Mittlerweile erwiesen sich

verschiedene Verfahren zur Induktion der Druckbelastung als vielversprechend. Je nach Wahl des Tiermodells haben sich verschiedene Methoden als erfolgreich herausgestellt (Boucherat et al. 2022). Wie bereits zuvor diskutiert, ist eins der gängigsten PAH-Modelle bei Ratten die Induktion mittels MCT-Injektion. Seit über einem halben Jahrhundert wird diese Methode verwendet, bei der meist eine einmalige subkutane und intraperitoneale Injektion von MCT (meist 60 mg/kg Ratte) ausreicht um pulmonales Gefäß-*Remodeling* zu bewirken (Heath and Kay 1967; Smith, Kay, and Heath 1970). Dieses führt letztlich zu einer Erhöhung des mPAP und nachfolgend einer RV-Dysfunktion, die in nur wenigen Wochen zum Tod des Tieres führt (Omura et al. 2020). Bei Mäusen hingegen kann dieses Verfahren nicht angewendet werden, da diese nicht in der Lage sind MCT in seinen aktiven pneumotoxischen Metaboliten (MCT-Pyrrol) in den Leberzellen umzuwandeln. Ebenso wie die Sugen5416/Hypoxie-Methode (Su/Hx), welche unterschiedliche Ergebnisse zur Induktion von Druckbelastung bei Ratte und Maus aufwiesen (Boucherat et al. 2022): Mäuse, bei denen die Druckbelastung mittels Su/Hx induziert wurde, zeigten geringere Werte der RV-Nachlast mit ~ 50 mmHg (Ciuclan et al. 2011) im Gegensatz zu Ratten mit ~ 70 mmHg (Akazawa et al. 2020).

Zudem könnte der Unterschied in der Wahl der Spezies (Ratte vs. Maus) begründet sein. Zur Untersuchung einer Erkrankung fällt die Wahl meist auf ein Tiermodell, welches die höchste Vergleichbarkeit mit der menschlichen Pathophysiologie hat und dennoch realisierbar, kostengünstig und im Sinne des Tierschutzes steht. Somit werden die meisten Studien an Nagern durchgeführt (Mukherjee et al. 2022). Zur Untersuchung einer PH eignen sich unterschiedliche Spezies, unterschiedlich gut. Die Vor- und Nachteile einiger Tiermodelle in Bezug auf PH wurden erst kürzlich beschrieben (Boucherat et al. 2022). Wie bereits eingehend erwähnt, sind speziesbezogene Unterschiede bei der MAO-Expression bekannt. MAO-A wird vorrangig im Herzen von Ratten exprimiert, wohingegen MAO-B im Herzen von Maus und Mensch vermehrt exprimiert wird (Dorris 1982; Sivasubramaniam et al. 2003). Daher wurde in den oben zitierten Studien (van Eif, Bogaards, and van der Laarse 2014; Sun et al. 2021) folgerichtig in Ratten pharmakologisch die MAO-A gehemmt, in Mäusen hingegen die Expression der MAO-B genetisch reduziert.

Letztlich kann daher die gewählte Methode der MAO-Hemmung (genetisch vs. pharmakologisch) einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Inzwischen gibt es viele Beispiele, bei denen ungleiche Phänotypen entstehen je nachdem, ob ein Protein von einem Inhibitor pharmakologisch oder mit einem *Knockout* des Gens angegriffen wird. Beispielsweise wurden unterschiedliche Phänotypen für die Kinase JNK2 festgestellt: JNK2-*Knockout*-Zellen haben eine normale c-Jun-Phosphorylierung und eine erhöhte Proliferation wohingegen die pharmakologische Hemmung von JNK2 die c-Jun-Phosphorylierung und zelluläre Proliferation blockiert (Knight and Shokat 2007).

Für die MAOs sind ebenfalls Unterschiede zwischen einer pharmakologischen Inhibition und der genetischen Unterdrückung durch einen *Knockout* bekannt. In Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen wurde diese Diskrepanz bereits diskutiert (Bortolato, Chen, and Shih 2008). Auch vor dem Hintergrund einer kardialen Hypertrophie sind Unterschiede innerhalb verschiedener *Knockout* Modelle in Mäusen, aber auch zu pharmakologischen Hemmungen bekannt (Kaludercic, Mialet-Perez, et al. 2014). Mäusen, denen die MAO-A fehlte, zeigten bei der Untersuchung der LVH eine Kardiomyozytenhypertrophie und eine LV-Dilatation ohne LV-Dysfunktion und hämodynamischen Veränderungen (Lairez et al. 2009). Dem entgegen wiesen Mäuse mit einer hypomorphen MAO-A-Mutation (MAO-A^{neo}), die zur Expression einer verkürzten, nicht funktionsfähigen Variante des MAO-A^{neo}-Transkripts führt, keine strukturellen LV-Veränderungen aber einige hämodynamische Unterschiede auf. So waren beispielsweise der systolische LV-Druck, sowie die Kontraktilität bzw. Relaxation der Kardiomyozyten bei MAO-A^{neo}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern niedriger (Kaludercic et al. 2010). Während genetische Modifikationen der MAO-Expression oder Aktivität somit einen Phänotyp induzieren, hat eine sechswöchige Behandlung der Mäuse mit dem MAO-A-Hemmer Clorgylin keine Auswirkungen auf die Herzstruktur oder Herzfunktion, wie durch histologische und hämodynamische Messungen festgestellt wurde (Kaludercic et al. 2010).

Dennoch gibt es Befunde, die vergleichbare Ergebnisse der genetischen oder pharmakologischen Beeinflussung der MAO-B Expression/Aktivität auf die LV Hypertrophie zeigen (Antonucci et al. 2021; Kaludercic, Mialet-Perez, et al. 2014). Mit beiden Ansätzen reduzierte sich die Ausprägung morphologischer Veränderungen und der Funktionsverlust des LVs. Bemerkenswert ist hierbei jedoch, dass bei der pharmakologischen Inhibition beide MAO-Isoformen (MAO-A und B) mittels Pargylin blockiert wurden (Antonucci et al. 2021). Außerdem wurden in beiden Studien unterschiedliche Methoden der Induktion einer Hypertrophie verwendet. Eine Arbeit nutzte Doxorubicin (Antonucci et al. 2021), ein Medikament welches zu oxidativem Stress der Zellen und somit zur Kardiotoxizität führen kann, während die andere das Verfahren der transversalen Aortenverengung (TAC) zur Induktion der LVH nutzte (Kaludercic, Carpi, et al. 2014).

5.3 MAO und Hypertrophie

Gemäß der WHO ist die PAH eine der fünf Untergruppen der PH. Diese Erkrankung wird über einen pulmonalarteriellen Druckanstieg definiert, was letztlich zu einer RVH führen kann.

Die Beteiligung von MAO-B an der Pathogenese der RVH ist bislang nur unzureichend untersucht. Die bisherigen Erkenntnisse zur Bedeutung der MAO für die kardiale Hypertrophie basieren auf Analysen der Druckbelastung im linken Ventrikel. Wie bereits unter 5.2.1 beschrieben, führten Untersuchungen zu MAO-B und LVH, induziert entweder mittels TAC oder Doxorubicin-Intoxikation bei Mäusen, zu einer Zunahme des enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Durchmessers (Kaludercic, Carpi, et al. 2014; Antonucci et al. 2021). Der globale *Knockout* von MAO-B (Kaludercic, Carpi, et al. 2014) oder deren pharmakologische Blockade (Antonucci et al. 2021) reduzierten die stressbedingten Veränderungen der linksventrikulären Geometrie. Beide Arbeiten deuteten somit auf einen Zusammenhang der MAO-B-Aktivität und nachfolgend der gesteigerten ROS-Produktion und der Entstehung einer LVH hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von MAO-B während einer PAH untersucht. Die Konsequenz dieser Pathogenese, die RVH, wurde anhand von echokardiographischen Messungen (RVWT in mm) und auf Proteineben (relative Expression von MYH7) bestimmt.
Die RVH, die durch die PAB-Operation induziert wurde, scheint dabei von der myokardialen MAO-B abhängig zu sein, da der Kardiomyozyten-spezifische MAO-B *Knockout* die Zunahme der rechtsventrikulären Wanddicke (RVWT) und Proteinexpression von MYH7 nach PAB verhinderte. Die Drucküberlastung in den Kontrolltieren hingegen, führte zu einer signifikanten Zunahme der Wanddicke und der Proteinexpression und somit auch zu einer ausgeprägten RVH. Dieser Befund, zusammen mit dem der MAO-B-abhängigen Zunahme der intrazellulären ROS-Konzentration, legt nahe, dass das von MAO-B erzeugte ROS zu einer RVH führen kann.

Dennoch zeigten die Ergebnisse der Proteinexpression relativ starke Schwankungen auf. Für diese Analyse wurden die rechtsventrikulären Anteile der Septa verwendet und nicht der hypertrophierte rechte Ventrikel selbst. Das Septum trennt die beiden Ventrikel voneinander (Bronicki and Baden 2010) und weist somit Gewebsanteile beider Ventrikel auf. Die Schwankungen bei der Messung der Proteinexpression könnten daher zum einen auf dem Problem der Trennung zwischen rechts- und linksventrikulären Anteilen des Septums basieren (unterschiedlicher verbleibender Anteil linksventrikulärer Septum-Anteile) und zum anderen auf einer verminderten Hypertrophie der rechtsventrikulären Anteile des Septums im Vergleich zur freien Wand des rechten Ventrikels.

Die Daten der MAO-B-abhängigen Auswirkungen auf die Myokardhypertrophie werden zusätzlich durch die gemessenen Veränderungen der Proteinkinaseaktivitäten gestützt. Die rechtsventrikulären Anteile der Septa aller vier Gruppen wurden mittels eines Kinase-Assays

untersucht. In dieser Arbeit wurde sich jedoch hauptsächlich auf die Analyse der druckbelasteten Tiere beider Gruppen (PAB: MAO-B$^{fl/fl}$/kmMAO-B KO) fokussiert.
Während in MAO-B$^{fl/fl}$-Mäusen das PAB die Aktivität von Proteinkinasen, die am hypertrophen Wachstum beteiligt sind erhöhte, war diese Wirkung von PAB im Myokard von Mäusen mit dem Kardiomyozyten-spezifischem *Knockout* von MAO-B abgeschwächt. Wie zuvor beschrieben, können ROS-Moleküle Einfluss auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege im Herzen nehmen (Seko et al. 1997; Clerk et al. 1998; Kulisz et al. 2002; Wen et al. 2019). Die Redox-sensitiven Kinasen der Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK – Signalwege sind bekannterweise an pathologischen Ereignissen im Herzen beteiligt (Fuller et al. 2015; X. Wu et al. 2022; Yanwen Wang et al. 2018). Die Effektoren dieser Signaltransduktionskaskaden ERK1/2, JNK, p38 oder die RAF-Kinasen gelten als zentrale Akteure bei hypertrophem Zellwachstum und Apoptose von Kardiomyozyten (Bueno et al. 2000; Kehat and Molkentin 2010; Moldogazieva et al. 2018; Wen et al. 2019), bei der Aktivierung von Fibroblasten (Thum et al. 2008) oder in Stresssituationen mit mitochondrialen Dysfunktionen (Ono and Han 2000; Papaconstantinou 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizierten tatsächlich vorrangig Kinasen der Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK – Signalwege, die in den Kontrolltieren nach PAB signifikant hochreguliert waren; insgesamt waren von den 15 veränderten Kinasen 14 Stück in ihrer Aktivität gesteigert.
SRC war die einzige Kinase, die bei Druckbelastung eine erhöhte Aktivität in kmMAO-B KO Tieren im Vergleich zu MAO-B$^{fl/fl}$ Tieren zeigte. Zhai et al. fasste die Rolle der *Src-family protein tyrosine kinases* (SFKs) bei Herzerkrankungen zusammen (Zhai et al. 2021). Bei einer Krankheit wie der Hypertonie wirkt die C-terminale Src-Kinase (Csk) physiologisch als negativer Regulator von SFKs (Kim et al. 2018, 2; Qian et al. 2018); wenn Csk inaktiv war wurde SRC aktiviert und der Blutdruck stieg (H.-J. Lee et al. 2016; B. Qin and Zhou 2015). In diesen Veröffentlichungen wurden Csk siRNAs (H.-J. Lee et al. 2016) oder Ang II (Angiotension II) induziert zur Analyse der Hypertension (B. Qin and Zhou 2015).
Diese Beobachtungen verdeutlichen die Bedeutung dieser Kinase bei der Gefäßregulation und der Entstehung einer Hypertonie. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gefäß allerdings mechanisch verengt (PAB) und die Auswirkungen auf den RV analysiert. Hierbei scheint der Wirkmechanismus der SRC-Kinase nicht von gleicher Bedeutung zu sein.

Die restlichen 14 Kinasen hingegen zeigten eine Beeinträchtigung der Aktivität ohne MAO-B in Kardiomyozyten und gehörten hauptsächlich zu den Kinasen der Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK – Signalwege. Jedoch auch weitere Signalwege wie beispielsweise die von NPR1 und SGK1 zeigten eine Herunterregulation nach PAB in kmMAO-B KO-Mäusen. Auch diese Kinasen sind bekannterweise an der Entstehung von Hypertrophie und Fibrose beteiligt (Ellmers et al. 2007;

Jang, Park, and Jang 2022). Diese Ergebnisse heben die Beteiligung von MAO-B an der Pathogenese rechtsventrikulärer Veränderungen nach PAH hervor und lassen eine zentrale Rolle von ROS durch MAO-B vermuten.

5.4 MAO und Kardiomyozytenfunktion

Eine erhöhte MAO-Aktivität gilt als frühes Ereignis in der Pathogenese der Herzhypertrophie (Tanijiri 1975). Sowohl in Herzen (Tanijiri 1975), als auch in isolierten Kardiomyozyten (Pino et al. 1997) von hypertensiven Ratten wurde eine erhöhte MAO-Aktivität bereits vor der Entwicklung einer Herzhypertrophie beobachtet (Pino et al. 1997).
Die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten ist entscheidend bei der Beurteilung der Vitalität von Herzen. Es ist bekannt, dass eine funktionelle Konsequenz der Hypertrophie eine erhöhte Kontraktilität der Herzmuskelzellen ist. Sowohl bei Patienten mit PAH (Spruijt et al. 2015), als auch im Tiermodell mit Druckbelastung (Z. Wang et al. 2013) konnte diese Tatsache als gemeinsames Merkmal festgestellt werden. Dieser Befund konnte tatsächlich auch bei einem ähnlichen Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde, beobachtet werden. Isolierte rechtsventrikuläre Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen wiesen eine gesteigerte lastfreie systolische Verkürzung drei Wochen nach PAB auf (Esfandiary et al. 2019). Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser beobachtete Effekt von der ROS-Bildung abhängt oder sekundär auf Veränderungen im kardialen Stoffwechsel zurückzuführen ist. Im Gegenteil, wie zuvor beschrieben, kann eine erhöhte ROS-Bildung die Funktion der Kardiomyozyten durch eine oxidative Veränderung der kontraktilen Proteine auch reduzieren (Canton et al. 2006; Sharma and Kass 2014).

In dieser Arbeit wurden ebenso isolierte, rechtsventrikuläre Kardiomyozyten auf ihre Funktion untersucht. Hier war die Funktion durch keine der beiden Interventionen (MAO-B-Hemmung oder Druckbelastung) beeinträchtigt, obwohl die ROS-Bildung im Myokard durch PAB erhöht war. Die RVs der vier Bedingungen unterschieden sich nicht in ihrer diastolischen Zelllänge, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, oder der lastfreien Zellverkürzung voneinander. Die Menge, der von MAO-B gebildeten ROS während PAB, scheint also nicht auszureichen um die kontraktilen Proteine direkt zu verändern

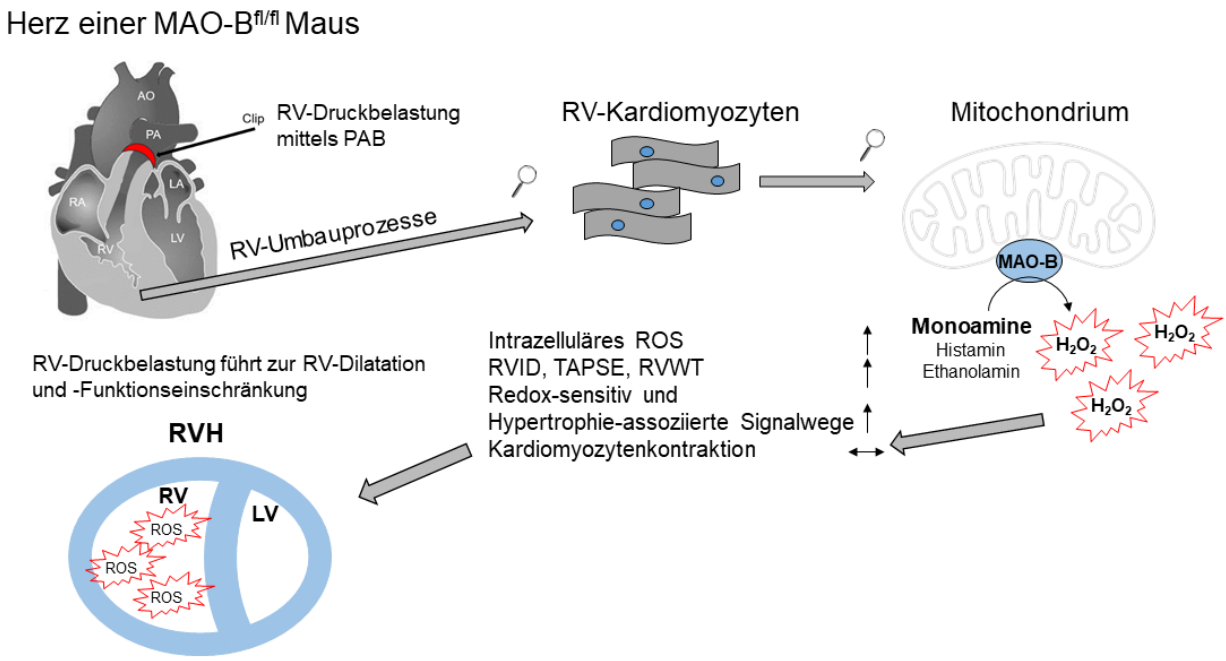
6. Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) beschreibt eine pathologische Veränderung des Blutflusses, welche mit einem Druckanstieg in den Gefäßen einhergeht. Diese Erkrankung ist über einen mittleren pulmonalarteriellen Druck von > 20-25 mmHg definiert und ist mit Umbauprozessen und Dysfunktionen des rechten Ventrikels (RVs) assoziiert.
Die übermäßige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann Redox-abhängige Kinasen aktivieren, welche an der Entstehung der kardialen Hypertrophie beteiligt sind. Neben der Elektronentransportkette sind weitere mitochondriale Proteine, wie die Monoaminoxidasen, an der ROS-Produktion beteiligt und können somit zur Entstehung einer kardialen Hypertrophie beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Monoaminoxidase B (MAO-B) während der rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH) nach Druckbelastung untersucht. Zur Induktion der Druckbelastung des RV wurde das Verfahren des pulmonalarteriellen *Bandings* (PAB) eingesetzt und im induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B-*Knockout*-Mausmodell untersucht. Hierbei wurden MAO-B$^{fl/fl}$-Mäuse mit kmMAO-B KO-Mäusen drei Wochen nach den chirurgischen Eingriffen miteinander verglichen. SHAM operierte (Schein-OP) Gruppen dienten dabei als Kontrollen. Folglich konnte die MAO-B-vermittelte ROS-Bildung auf die RV-Dilatation und -Funktion als Reaktion auf Druckbelastung analysiert werden.

Das Kardiomyozyten-spezifische Fehlen von MAO-B schützt die Tiere vor einer RV-Dilatation, Hypertrophie und Dysfunktion durch RV-Druckbelastung nach PAB. Diese Ergebnisse können durch eine gesteigerte ROS-Produktion im RV-Gewebe von MAO-B$^{fl/fl}$-Tieren, aber nicht in den kmMAO-B KO-Tieren, erklärt werden. Die, durch die PAB Operation induzierte, RVH scheint somit vom myokardialen MAO-B abhängig zu sein und MAO-B kann als myokardiale Quelle von ROS bei Stresssituationen, wie der Druckbelastung, identifiziert werden. Zusätzlich wird diese Aussage einer MAO-B-abhängigen Myokardhypertrophie durch die gemessenen Veränderungen der Proteinkinaseaktivitäten gestützt. Redox-sensitive Kinase sind in kmMAO-B KO-Tieren herunterreguliert und bieten demnach ebenfalls einen Schutz vor Hypertrophie-Induktion im rechten Herzen. Damit führt das Fehlen von MAO-B im Kardiomyozyten zur Protektion gegenüber einer Druck-induzierten RVH und RV-Dilatation. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Kardiomyozyten-spezifische MAO-B eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von RVH und somit bei der Erkrankung PAH spielt (Abbildung 22).

(A)



(B)

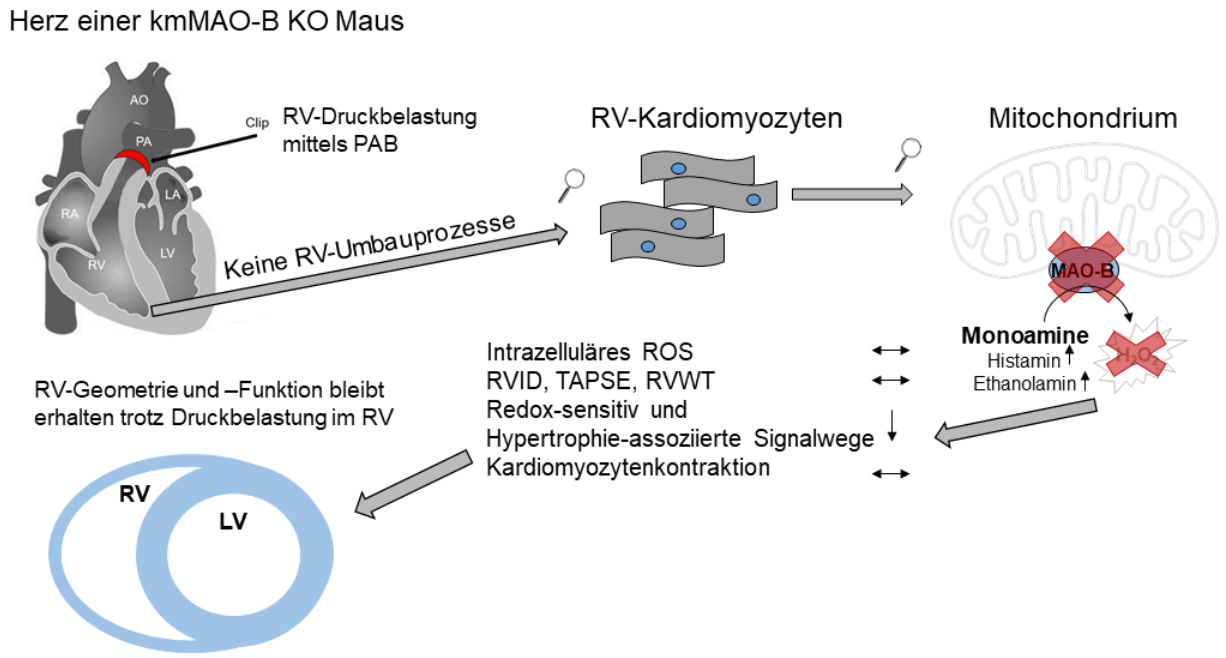


Abbildung 22: Schematische Abbildung der Bedeutung von Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B bei einer RVH. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die dreiwöchige Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) durch die Stenose der Pulmonalarterie mittels Pulmonalarterien *Banding* (PAB) eine RV-Hypertrophie (RVH) in MAO-B$^{fl/fl}$-Mäusen induziert und in Mäusen ohne Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B verhindert. Bei MAO-B$^{fl/fl}$-

Tieren konnte die Pathogenese anhand typischer-krankheitsbezogener Symptome beobachtet werden, wie den Verlust der physiologischen RV-Geometrie (*right ventricular inner diameter*, RVID) und –Funktion (*tricuspid annular plane systolic excursion*, TAPSE) und die Erhöhung der rechtsventrikulären Wanddicke (*right ventricular wall thickness*, RVWT). Die, auf der äußeren Mitochondrienmembran befindlichen, MAO-B (Monoaminoxidase-B) trägt zu einer gesteigerten ROS (reaktive Sauerstoffspezies) -Produktion während der oxidativen Desaminierung ihrer Substrate (Histamin und Ethanolamin) bei, welche in Stresssitutationen (Druckbelastung) zu oxidativen Schäden führen kann. Somit werden Redox-sensitive und Hypertrophie-assoziierte Signalwege vermehrt aktiviert, was ebenfalls das hypertrophe Wachstum fördert. Die Kontraktilität der Kardiomyozyten bleibt jedoch unbeeinflusst (**A**). Bei kmMAO-B KO- (Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B KO) Mäusen wird die Pathogenese einer RVH jedoch verhindert und RV-Geometrie, –Funktion und -Wanddicke bleiben erhalten. Zudem findet ohne MAO-B keine vermehrte ROS-Bildung im RV-Gewebe statt, wodurch keine Erhöhung der Kinase-Aktivitäten resultiert, die an der Pathogenese einer RVH beteiligt sind. Das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten ist erneut unbeeinträchtigt. Folglich bietet ein kmMAO-B KO ein Schutz vor der Entstehung einer RVH (**B**). H_2O_2 (Wasserstoffperoxid = ROS), LV (Linker Ventrikel).

6.1 Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) describes a pathological change in the blood flow that is associated with an increase in pressure in the blood vessels. This disease is defined by an average pulmonary arterial pressure of > 20-25 mmHg and is related to remodeling processes and dysfunction of the right ventricle (RV).

Excessive production of reactive oxygen species (ROS) can activate redox-dependent kinases, which are involved in the development of cardiac hypertrophy. In addition to the electron transport chain other mitochondrial proteins, such as monoamine oxidases, are involved in ROS production and can thus contribute to the development of cardiac hypertrophy. In the present study, the role of monoamine oxidase B (MAO-B) during right ventricular hypertrophy (RVH) after pressure overload was investigated. The pulmonary arterial banding (PAB) method was used to induce RV pressure overload and investigated in the inducible cardiomyocyte-specific MAO-B knockout (cmMAO-B KO) mouse model. MAO-$B^{fl/fl}$ mice were compared to cmMAO-B KO mice three weeks after surgery. SHAM operated groups served as controls. Consequently, MAO-B-mediated ROS formation could be analyzed for RV dilation and function in response to pressure overload.

Cardiomyocyte-specific absence of MAO-B protects animals from RV dilatation, hypertrophy and dysfunction due to RV pressure stress after PAB. These results can be explained by increased ROS production in RV tissue of MAO-$B^{fl/fl}$ animals, but not in cmMAO-B KO animals. Thus, RVH induced by PAB surgery appears to be dependent on myocardial MAO-B and MAO-

B can be identified as the myocardial source of ROS during stressful situations such as pressure overload. In addition, this hypothesis of MAO-B-dependent myocardial hypertrophy is supported by the measured changes in protein kinase activities. Redox-sensitive kinases are downregulated in cmMAO-B KO animals and consequently provide protection against hypertrophy induction in the right heart.
Summarized, the absence of MAO-B in cardiomyocytes leads to protection against pressure-induced RVH and RV dilatation. These results support the hypothesis that cardiomyocyte-specific MAO-B plays a key role in the development of RVH and thus in the disease PAH.

6.2 Ausblick

Zusammengenommen verdeutlichen die Daten dieser Arbeit die Rolle von MAO-B in Kardiomyozyten bei einer PAH. Das hier gewählte PAH-Modell, PAB, ist eine gängige Methode, um bei Nagern oder sogar größeren Tieren eine RV-Druckbelastung zu erzeugen (Ukita et al. 2021; Mamazhakypov et al. 2023). Vorteilhaft hierbei ist zudem, im Gegensatz zu den anderen PAH-Induktionsmethoden, dass getestet werden könnte, ob ein Medikament Anti-*Remodeling* Wirkungen auf die Pathogenese einer RVH haben könnte, unabhängig von möglichen Änderungen auf den Gefäßumbau und den Gefäßtonus (Bogaard et al. 2011; Van Der Feen et al. 2019). Obwohl, wie unter 5.2.1 diskutiert, Diskrepanzen zwischen pharmakologischer und genetischer Hemmung von verschiedenen Arbeiten bekannt sind, wäre die Untersuchung einer RVH mit einem pharmakologischen MAO-B Hemmer interessant. Das Medikament Deprenyl, welches den bekannten MAO-B-Hemmer Selegilin beinhaltet, ist bereits Bestandteil der Therapiemöglichkeiten von Parkinson-Erkrankung (Knoll and Magyar 1972; Magyar 2004). Dieser umfangreich erforschte Inhibitor der MAO-B gilt als sicheres und effektives Medikament zur Behandlung von Parkinson im Frühstadium, entweder als Monotherapie oder als Adjuvans zu Levodopa (Binde et al. 2018; Mizuno et al. 2017). Bei der Desaminierung von Dopamin durch MAO-B entsteht ROS, was möglicherweise an der fortschreitenden nigrostriatalen Degeneration bei der idiopathischen Parkinson-Krankheit beteiligt ist. Selegilin verhindert daher die Entstehung von oxidativen Stress durch die Blockierung von MAO-B (Chrisp, Mammen, and Sorkin 1991).
Die wichtigste Wirkung von Deprenyl im Gehirn ist also die Sensibilisierung der dopaminergen Neuronen für physiologische und pharmakologische Einflüsse. Somit erhöhen die MAO-B-Inhibitoren die Menge und Dauer der Wirkung von Dopamin durch Hemmung des Dopamin-Stoffwechsels im Gehirn (Murakami et al. 2023). In der für die Anwendung bei Parkinson-

Patienten empfohlenen Dosierung (10 mg/Tag) ist Selegilin ein irreversibler, selektiver Hemmer der MAO-B. Post-mortem-Studien an Empfängern von Selegilin und Levodopa zeigten eine etwa 90 %ige Hemmung der nigrostriatalen MAO-B-Aktivität, was zu einem 70 %igen Anstieg des Dopaminspiegels im Vergleich zu unbehandelten Parkinson-Patienten führte (Chrisp, Mammen, and Sorkin 1991). Trotz bekannten, dennoch seltenen, Nebenwirkungen ist diese MAO-B-Inhibition fester Bestandteil der Therapiemöglichkeiten (Moore and Saadabadi 2024; Alborghetti et al. 2024).

Darüber hinaus bewertete eine Meta-Analyse Selegilin bei unterschiedlichen psychischen Erkrankungen. Selegilin hat sich ebenfalls bei depressiven Störungen als wirksam, sicher und gut verträglich erwiesen (Rossano et al. 2023).

Auch vor dem Hintergrund einer Herzerkrankung konnten erste Ergebnisse bereits gewonnen werden. MAO-B wurde als Quelle von oxidativem Stress im Gefäßsystem identifiziert, insbesondere bei Diabetes (Sturza et al. 2015). Die Hemmung von MAO-B durch Selegilin verbesserte die Gefäßfunktion menschlicher Brustarterien bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes (Lighezan et al. 2016). Außerdem wurde eine Reduktion der vaskulären Hyperpermeabilität durch Selegilin nach hämorrhagischem Schock (Tharakan et al. 2010) und thermischen Verletzungen (Whaley et al. 2009) beobachtet.

Zudem wurde die zytoprotektive Wirkung von Selegilin in einem Kaninchenmodell der chronischen Herzinsuffizienz durch eine Verringerung des oxidativen Stresses des Herzens und der Apoptose der Myozyten nachgewiesen. Hierfür wurde den Tieren 1 mg Selegilin/Tag über 8 Wochen verabreicht (F. Qin et al. 2003). Mehrere Forschergruppen berichteten außerdem über vielversprechende kardio-metabolische Wirkungen von Selegilin in Tierstudien. Selegilin zeigte eine antioxidative Wirkung und verringerte die Fettansammlung in der Leber von Ratten, die eine lipidreiche Ernährung erhielten. In dieser Studie wurde Selegilin ins Trinkwasser der Tiere gegeben (2,5 µg/ml), was in Bezug auf die Trinkgewohnheit von Ratten (20–30 ml/Tag) ungefähr der Tagesdosierung in der Humantherapie entspricht (Bekesi et al. 2012).

Bei Mäusen, denen 2,5 mg/kg Deprenyl oral über einen Zeitraum von 15 Wochen verabreicht wurden, zeigten eine signifikante Reduktion der MAO-B-Aktivität und ROS-Produktion, was zu einer verringerten Arteriosklerose und Fettleber führte (S.-H. Wang et al. 2023). Ratten, die täglich Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, um die durch oxidativen Stress induzierte, chronischen obstruktiven Lungenerkrankung zu untersuchen, wurden mit Selegilin-Injektionen behandelt. Den Tieren wurde 30 min vor jeder Zigarettenrauch-Exposition 2 mg/kg Selegilin intraperitoneal verabreicht, was in einem Schutz vor oxidativen Stress und Entzündungen resultierte (Cui et al. 2020).

Da es bis heute kaum spezifische Interventionsmöglichkeiten für die RVH gibt (Arrigo et al. 2019; Maron et al. 2021), besteht eine hohe Notwendigkeit zur Erforschung neuer Therapieansätze. Demnach stellt die Verwendung von Deprenyl einen attraktiven Forschungsansatz dar, da sowohl der Wirkungsmechanismus, als auch die Dosierung bekannt sind und das Medikament bereits auf dem Markt verfügbar ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit heben die Rolle der MAO-B zur Entstehung einer erhöhten ROS-Bildung hervor, sowie die daraus resultierende RVH. Diese Erkenntnisse, zusammen mit den Vorarbeiten zur Verwendung von Deprenyl, stellen somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, um einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung einer PAH zu untersuchen.

Tabelle 3: Unter basalen Bedingungen hatte der Kardiomyozyten-spezifische *Knockout* von MAO-B keine Auswirkungen auf die Herzen während der echokardiographischen Messungen. Nach dem erfolgreichen Abschluss der Tamoxifenfütterung wurden MAO-B$^{fl/fl}$ mit kmMAO-B KO Tieren innerhalb der Geschlechter und unter basalen Bedingungen miteinander vergleichen. Folgende morphologische und funktionelle Parameter wurden hierbei verglichen: Körpergewicht, EDV (enddiastolisches Volumen), ESV (endsystolisches Volumen), SV (Schlagvolumen), EF (Ejektionsfraktion), FS (*fractional shortening*, Fraktionelle Verkürzung), CO (*cardiac output*, Herzzeitvolumen), CI (*cardiac index*, Herzindex), IVSd und IVSs (*Interventricular septum thickness in end diastole/ end systole*, Interventrikuläre septale Wanddicke (enddiastolisch und endsystolisch)), LVIDd und LVIDs (*Left ventricular internal diameter in end diastole/ end systole*, Linksventrikulärer innerer Durchmesser (enddiastolisch und endsystolisch)), LVPWd und LVPWs (*Left ventricular posterior wall thickness in end diastole/ end systole*, Linksventrikuläre posteriore Wanddicke (enddiastolisch und endsystolisch)), LV mass (Linksventrikuläre Masse), VTI (*Velocity time integral*, Schlagdistanz), HR (*Heart rate*, Herzfrequenz), TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*, Systolische Auslenkung der Trikuspidalklappe), RVID (*right ventricular inner diameter*, Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser), RVWT *(right ventricular wall thickness*, Rechtsventrikuläre Wanddicke). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar.

Parameter	*MAO-B$^{fl/fl}$ Weibchen n = 32*	*kmMAO-B KO Weibchen n = 20*	*MAO-B$^{fl/fl}$ Männchen n = 33*	*kmMAO-B KO Männchen n = 30*
Körpergewicht (g)	23,42 ± 2,00	23,06 ± 1,57	30,01 ± 1,96	29,92 ± 1,66
EDV (Teicholz) (µl)	51,54 ± 11,88	52,44 ± 14,03	58,32 ± 13,49	59,1 ± 13,59
ESV (Teicholz) (µl)	16,39 ± 7,07	17,04 ± 7,47	18,29 ± 7,76	18,63 ± 7,62
SV (Teicholz) (µl)	35,55 ± 6,18	35,57 ± 7,27	40,03 ± 6,87	40,48 ± 7,82
EF (%)	69,20 ± 7,60	68,68 ± 6,65	69,83 ± 7,50	69,49 ± 7,34
FS (%)	38,41 ± 5,93	37,89 ± 5,16	39,15 ± 6,75	38,76 ± 5,78
CO (Teicholz) (ml/min)	17,95 ± 4,07	17,67 ± 4,09	20,92 ± 4,30	20,50 ± 3,71
CI (l/min/m^2)	0,82 ± 0,22	0,79 ± 0,19	0,74 ± 0,13	0,77 ± 0,19
IVSd (mm)	0,79 ± 0,11	0,80 ± 0,13	0,82 ± 0,12	0,82 ± 0,13
IVSs (mm)	1,23 ± 0,16	1,28 ± 0,19	1,27 ± 0,16	1,29 ± 0,14
LVIDd (mm)	3,5 ± 0,32	3,52 ± 0,38	3,68 ± 0,37	3,60 ± 0,71

LVIDs (mm)	2,17 ± 0,36	2,20 ± 0,38	2,25 ± 0,42	2,28 ± 0,39
LVPWd (mm)	0,76 ± 0,12	0,76 ± 0,14	0,84 ± 0,20	0,82 ± 0,16
LVPWs (mm)	1,13 ± 0,27	1,12 ± 0,17	1,24 ± 0,26	1,24 ± 0,18
LV mass (mg)	90,49 ± 14,12	92,98 ± 18,77	108,06 ± 22,13	107,59 ± 21,28
VTI (mm/s)	34,09 ± 6,61	32,53 ± 6,57	35,36 ± 4,08	36,88 ± 7,54
HR (BPM)	483 ± 44,58	478 ± 69,13	507 ± 56,99	502 ± 55,85
TAPSE (mm)	1,24 ± 0,08	1,24 ± 0,10	1,25 ± 0,09	1,24 ± 0,10
RVID (Systole) (mm)	1,19 ± 0,06	1,18 ± 0,08	1,22 ± 0,05	1,23 ± 0,07
RVWT (mm)	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,03

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des Herzens. Echokardiographische Aufnahme im Vierkammerblick. Mittels der systolischen Auslenkung der Trikuspidalklappe (TK), welche sich zwischen dem rechten Ventrikel (RV) und dem rechten Atrium (RA) befindet, wird die TAPSE ermittelt. Anhand dieser lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des RVs schließen (Höhe der Amplituden). Linker Ventrikel (LV), linkes Atrium (LA), Septum (S).....10
Abbildung 2: Schematische Abbildung der strukturellen Umbauprozesse nach pulmonaler Hypertension (PH). Die rechtsventrikuläre Hypertrophie spiegelt sich in einer Zunahme der rechtsventrikulären Wanddicke, der Dilatation, des rechten Ventrikels (RV) wider. LV (linker Ventrikel).....12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Quellen und Abbausysteme von ROS modifiziert nach Schlüter et al., 2018. Die Komplexe I und III der mitochondrialen Elektronentransportkette produzieren kontinuierlich O_2^-, Komplex II kann durch NOX-abhängiges ROS aktiviert werden (**A**). Die Desaminierung von Monoaminen wie Serotonin (5-HT) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAL) wird von den Monoaminoxidasen (MAOs) katalysiert, was zur H_2O_2-Produktion führt (**B**). Die Xanthinoxidase (XO) katalysiert schrittweise die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure, welche H_2O_2 freisetzt (**C**). Durch das Entkoppeln der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) entsteht O_2^- als Nebenprodukt (**D**). Die NADPH-Oxidase (NOX) kann nach Aktivierung O_2^- generieren (**E**). Mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) wird die Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2 katalysiert (**F**), was wiederum von der Katalase (CAT) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgesetzt wird (**G**). Durch die Glutathion-Peroxidase (GPX) wird H_2O_2 reduziert und gleichzeitig Glutathion oxidiert (GSH zu GSSG) (**H**). Gekoppelte NOS generiert NO, welches O_2^- neutralisieren kann (**I**).....14
Abbildung 4: Mitochondriale Energiegewinnung. Elektronen ($2e^-$) werden über die Komplexe I-IV der Elektronentransportkette (ETK) geleitet und schließlich zu Wasser (H_2O) reduziert. Dadurch gelangen Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht. An der ATP-Synthase (Komplex V) strömen schließlich die Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix. Simultan dazu, wird an diesem Komplex Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) gewonnen. Komplex I (Nikotinamid-Adenin-Dinukleorid-Dehydrogenase), Komplex II (Succinat-Dehydrogenase), Ubichinon (Coenzym Q), Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase), Sauerstoff (O_2), Cytochrom c (Cyto c), Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase), Komplex V (ATP-Synthase).....15
Abbildung 5: Reaktionsschema der oxidativen Desaminierung von Monoaminen, katalysiert durch MAOs. Die Bindung eines Monoamins an das Flavoenzym E-FAD führt zur Reduktion des Flavins-Adenin-Dinukleotid (FAD) zum Cofaktor $FADH_2$, wobei die entsprechenden Aldehyde, Ammoniak und ROS (H_2O_2) als Nebenprodukte entstehen.....17
Abbildung 6: Schematische Darstellung der mitochondrialen ROS-Produktion. Die Monoaminoxidasen (MAOs) sind an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Durch den Abbau von MAOs zu Aldehyden entstehen ROS in Form von H_2O_2 als Nebenprodukt. Auf der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die Elektronentransportkette (ETK) bestehend aus den Komplexen I bis V. Elektronen werden über die Atmungskette übertragen, wodurch Protonen (H^+) an den Komplexen I, III und IV in den Intermembranraum gelangen, was wiederum ein Membranpotential erzeugt. Dieser Protonengradient wird von Komplex V, der ATP-Synthase, genutzt um ATP aus ADP und Phosphat zu katalysieren und Protonen zurück in den mitochondrialen Matrixraum zu leiten. Während des Elektronentransfers

erzeugen die Komplexe I, II und III ROS in Form von Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).....18
Abbildung 7: Schematische Darstellung vom Ungleichgewicht der Redox-Homöostase und die pathophysiologischen Effekte bei Herzinsuffizienz. Oxidativer Stress entsteht, wenn ROS (reaktive Sauerstoffspezies) mehr produziert als abgebaut werden. Als Resultat folgen eine Vielzahl von pathologischen Ereignissen, sowie der Verlust von NO (Stickstoffmonoxid), welches O_2^- neutralisieren kann.....19
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. Das Pulmonalarterien Banding (PAB) Modell wird genutzt, um die Situation einer Druckbelastung mit nachfolgender Hypertrophie des Herzens zu simulieren. Dazu wird der pulmonale Fluss mithilfe eines Clips eingeschränkt und eine starke Druckbelastung des RV induziert. Unter physiologischen Zuständen kommt es zu einer gesteigerten ROS-Produktion der Monoaminooxidasen (MAOs), welche auf der äußeren Mitochondrienmembran in Kardiomyozyten lokalisiert sind. Folglich entsteht oxidativer Stress im rechtsventrikulären Gewebe, welcher in ventrikulären Umbauprozessen, einer Fibrose und Hypertrophie endet (**A**). Wird das PAB Modell bei Mäusen mit einem Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B KO durchgeführt, so die Hypothese, wird das Herz gegenüber einer Hypertrophie und Dysfunktion geschützt (**B**). AO: Aorta, PA: Pulmonalarterie, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, ETK (Elektronentransportkette).....23
Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gruppen untersucht und miteinander verglichen: 1. Mäuse mit einem Kardiomyozyten-spezifischem Knockout (KO) des Enzyms MAO-B (kmMAO-B KO) und 2. Cre-negative Wurfgeschwister, die als Kontrolle dienten und das Enzym normal exprimierten (MAO-$B^{fl/fl}$). Mittels Tamoxifenfütterung wurde der KO induziert. Nach erfolgreichem Abschluss der Fütterung folgte zunächst eine echokardiographische Untersuchung (Echo, basal) und an Tag 1 die Operationen (OPs). Tiere beider Gruppen durchliefen entweder eine PAB- oder SHAM Operation. Nach drei Wochen wurden die Tiere erneut echokardiographisch begutachtet (Echo, postoperativ) und an Tag 22 oder 23 wurden die Tiere getötet und das Gewebe aufgearbeitet sowie Messungen durchgeführt. Folgende Versuche erfolgten hierbei: Hämodynamik-Messungen, Kontraktionsanalysen von isolierten Kardiomyozyten, Gewebe wurde entnommen und schockgefroren für spätere Untersuchungen, Nachweis von ROS im Gewebe, Metabolom-Analysen, Kinase-Assays und Hypertrophie-Marker wurden untersucht.....37
Abbildung 10: Repräsentative Bilder des Ablaufs des Pulmonalarterien Banding (PAB) sowie die dafür verwendeten Instrumente. Das, durch eine Isofluran Inhalationsnarkose schlafende, intubierte Tier wurde auf einer Wärmeplatte fixiert und über ein Beatmungsgerät ventiliert (**A**). Der Thoraxbereich wurde enthaart und die Haut mit Braunoderm® desinfiziert. Anschließend wurde die Haut mittels zweier Skalpelle eröffnet und mobilisiert (**B**). Die darunterliegende Muskelschicht wurde ebenfalls mobilisiert und der zweite Interkostalraum eröffnet. Wundhaken mit Klebestreifen am Ende wurden verwendet, um zu gewährleisten, dass das Operationsareal während des Eingriffs geöffnet bleibt (**C**). Nach Entfernung des umliegenden Bindegewebes konnte die Pulmonalarterie lokalisiert, freipräpariert und mit einem Ligaturclip verengt werden (**D**). Der Eingriff wurde mit Hilfe folgender Instrumente durchgeführt: Semken Pinzette abgerundet, gezackte Spitze - 1,3 mmx 1 mm (1), Graefe Pinzette abgerundet – 0,8 mm (2), Graefe Pinzette gerade – 0,8 mm (3), Moria MC31 Pinzetten abgerundet, gezackte Spitze (4), Feine Irisschere gerade – 9,5 cm (5), Castroviejo Micro Nadelhalter gerade – 9 cm (6), Vannas-Tübingen Springschere – 5 mm (7), Eigenkonstruktion

mit L-förmig gebogener G26 Kanüle zum Anheben der Pulmonalarterie (8), Eigenkonstruktion zur Intubation (9), Eigenkonstruktion eines Retraktors bestehend aus 3 20G Kanülen (10), Weck Hemoclip® Applikator klein und Weck Hemoclips® klein (11), Größenverhältnis des Clips – die Clipgröße (Durchmesser) entspricht dem Durchmesser der Nadelgröße 30G (12) (**E**). 40
Abbildung 11: Repräsentative Bilder der echokardiographischen Messung. Mithilfe von Klebestreifen wurden die Tiere auf einer beweglichen Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektrodenplättchen fixiert. Durch das Rektalthermometer konnte die Körpertemperatur kontinuierlich überwacht, sowie die Narkose über die Beatmungsmaske aufrechterhalten werden. 42
Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Langendorff-Perfusionsanlage zur Isolierung adulter Kardiomyozyten der Maus. Das temperierte Wasser im doppelwandigen Glasrohr der Anlage (Eigenbau des Physiologischen Instituts Gießen) temperiert das kollagenasehaltige Perfusionsmedium im Inneren konstant auf 37 ºC. Mittels der, am unteren Ende der Anlage fixierten, Kanüle wird das Herz über die Aorta retrograd perfundiert. Das aus dem Herzen austropfende Perfusat gelangt zunächst in den darunter befindlichen Auffangbehälter und wird anschließend mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zum Glastrichter am oberen Ende des Glasrohrs transportiert. Am Regler wird die Tropfgeschwindigkeit auf 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt. 44
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme rechtsventrikulärer Kardiomyozyten der Maus. Nach dem Waschen der isolierten Kardiomyozyten befanden sich überwiegend intakte, stäbchenförmige Zellen auf der Zellkulturschale. 200-fache Vergrößerung. 46
Abbildung 14: Prinzip der Amplex Ultra Red Methode. Das farblose Amplex Ultra Red wird in Gegenwart von H_2O_2 von der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) zu dem fluoreszierenden Amplex Ultrox Red umgesetzt. Seine Exitations-/Emissionsmaximum liegt bei 565 nm/ 581 nm. 49
Abbildung 15: Rechtsventrikuläre Katheterisierung. Systemische Hämodynamikmessungen wurden bei Mäusen durchgeführt, die entweder einer SHAM Operation (MAO-$B^{fl/fl}$ n = 4, kmMAO-B KO n = 3) oder PAB Operation (MAO-$B^{fl/fl}$ n = 5, kmMAO-B KO n = 4) für drei Wochen ausgesetzt waren. Die Daten des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP in mmHg) sind abgebildet. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD, ###: $p < 0,005$ dar, der mit der Zwei-Wege-ANOVA analysiert wurde. 56
Abbildung 16: Messung der ROS-Produktion mittels der Amplex Ultra Red Methode. In isolierten Mitochondrien aus rechten Ventrikeln von MAO-$B^{fl/fl}$ (SHAM n = 7, PAB n = 8) und kmMAO-B KO (SHAM n = 5, PAB n = 6) Mäusen wurde drei Wochen nach SHAM oder PAB Operationen die ROS-Produktion gemessen. Dargestellt ist die Steigung der Fluoreszenzzunahme über 1,5 min. Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: basal (**A**), Rotenon (2 µM) (**B**) und PEA (250 µM) (**C**). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, ***: $p < 0,005$, es wurde mit der Zwei-Wege-ANOVA analysiert. 57
Abbildung 17: **Nachweis von intrazellulärem ROS mittels DHE-Färbung.** Kryoschnitte vom RV-Gewebe aus MAO-$B^{fl/fl}$ (SHAM und PAB je n = 6) und kmMAO-B KO (SHAM und PAB je n = 6) wurden analysiert. Die Quantifizierung der ROS-Bildung wurde durch Messung der Intensität des DHE-Signals erreicht. Die Daten werden als relative Veränderung im DHE-Signal im Vergleich zu MAO-$B^{fl/fl}$ SHAM-Tieren ± SD dargestellt. * und #: $p < 0,05$, die durch Zwei-Wege-ANOVA (A) analysiert wurden. Repräsentative Bilder von DHE-gefärbtem RV-Gewebe sind in (B) dargestellt. 59

Abbildung 18: Beurteilung der rechtsventrikulären Geometrie und Funktion als Reaktion auf Druckbelastung. 61
Abbildung 19: Beurteilung der Hypertrophie drei Wochen nach SHAM/PAB Operation. Mittels Echokardiographie wurde die rechtsventrikuläre Wanddicke (RVWT, in mm) bestimmt. Jeder Punkt steht für ein Tier. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD für MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO Mäuse dar (**A**). Das Jess Simple Western-System wurde verwendet, um den Hypertrophiemarker MYH7 auf Proteinebene im rechtsventrikulären Anteil des Septums von MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO Mäusen (n = 4 für jede der vier Bedingungen) nachzuweisen. Die Proteinexpression wurde auf das Protein Vinculin normalisiert. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD in Bezug auf die MAO-B$^{fl/fl}$ SHAM Gruppe dar (**B**). In (**C**) ist der Lauf des Western Blots abgebildet. Beide Diagramme wurden mittels Zwei-Wege-ANOVA analysiert, #: $p < 0,05$, ### und ***: $p < 0,005$. 63
Abbildung 20: Analyse der Metaboliten im rechten Ventrikel während Druckbelastung. Die LC-MS/MS-Analyse wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten aus dem RV-Gewebe genutzt. Die Konzentrationen (in µM) der MAO-B-Substrate Histamin (**A**) und Ethanolamin (**B**) wurden drei Wochen postoperativ analysiert. Die Daten sind für MAO-B$^{fl/fl}$ (SHAM n = 4, PAB n = 6) und kmMAO-B KO (SHAM n = 3, PAB n = 4) Mäuse angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, * und #: $p < 0,05$, die mit der Zwei-Wege ANOVA analysiert wurde. 64
Abbildung 21: Kinase-Assoziationsnetzwerke. Funktionelle Proteinassoziationsnetzwerke von Kinasen wurden in rechtsventrikulären Anteilen des Septums von Mäusen vor dem Hintergrund des MAO-B-*Knockouts* und/oder Druckbelastung analysiert. MAO-B$^{fl/fl}$ und kmMAO-B KO Mäuse wurden einer PAB Operation unterzogen (n = 4, für jede Gruppe). Nach drei Wochen wurden Proteinlysate aus den rechtsventrikulären Anteilen der Septa für das Kinom-*Profiling* präpariert. Sequentielle Zweigruppenvergleiche wurden durchgeführt, um Kinasen zu identifizieren, die aufgrund des genetischen Hintergrunds und als Reaktion auf Druckbelastung unterschiedlich reguliert waren. Die resultierenden Ergebnisse wurden auf die Webseite der String-Proteindatenbank hochgeladen, um Bilder zu erstellen, die funktionelle Beziehungen darstellen und Protein-, d.h. Kinase-Assoziationsnetzwerke aufzeigen. Das Venn-Diagramm (**A**) zeigt die Anzahl der Kinasen, die nicht nur in einem, sondern in mehreren Zweigruppenvergleichen signifikant ($p < 0,05$) dereguliert sind. Für das Reaktomdiagramm spiegelt die äußere Farbe die Kinaseaktivität wider, die für 4. PAB: MAO-B$^{fl/fl}$/kmMAO-B KO hervorgehoben ist. Die 20 wichtigsten Interaktionspartner, die mit den jeweiligen Kinasen des Netzwerks verbunden sind, sind darunter aufgelistet (**B**).....66
Abbildung 22: Schematische Abbildung der Bedeutung von Kardiomyozyten-spezifischem MAO-B bei einer RVH. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die dreiwöchige Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) durch die Stenose der Pulmonalarterie mittels Pulmonalarterien *Banding* (PAB) eine RV-Hypertrophie (RVH) in MAO-B$^{fl/fl}$-Mäusen induziert und in Mäusen ohne Kardiomyozyten-spezifischen MAO-B verhindert. Bei MAO-B$^{fl/fl}$ Tieren konnte die Pathogenese anhand typischer-krankheitsbezogener Symptome beobachtet werden, wie den Verlust der physiologischen RV-Geometrie (*right ventricular inner diameter*, RVID) und –Funktion (*tricuspid annular plane systolic excursion*, TAPSE) und die Erhöhung der rechtsventrikulären Wanddicke (*right ventricular wall thickness*, RVWT). Die, auf der äußeren Mitochondrienmembran befindlichen, MAO-B (Monoaminoxidase-B) trägt zu einer gesteigerten ROS (reaktive Sauerstoffspezies) -

Produktion während der oxidativen Desaminierung ihrer Substrate (Histamin und Ethanolamin) bei, welche in Stresssitutationen (Druckbelastung) zu oxidativen Schäden führen kann. Somit werden Redox-sensitive und Hypertrophie-assoziierte Signalwege vermehrt aktiviert, was ebenfalls das hypertrophe Wachstum fördert. Die Kontraktilität der Kardiomyozyten bleibt jedoch unbeeinflusst (**A**). Bei kmMAO-B KO- (Kardiomyozyten-spezifischer MAO-B KO) Mäusen wird die Pathogenese einer RVH jedoch verhindert und RV-Geometrie, –Funktion und -Wanddicke bleiben erhalten. Zudem findet ohne MAO-B keine vermehrte ROS-Bildung im RV-Gewebe statt, wodurch keine Erhöhung der Kinase-Aktivitäten resultiert, die an der Pathogenese einer RVH beteiligt sind. Das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten ist erneut unbeeinträchtigt. Folglich bietet ein kmMAO-B KO ein Schutz vor der Entstehung einer RVH (**B**). H_2O_2 (Wasserstoffperoxid = ROS), LV (Linker Ventrikel). 81

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gemäß der WHO klassifizierten Hauptgruppen der Pulmonalen Hypertonie (modifiziert nach (Jone et al. 2023)). 8

Tabelle 2: Bestimmung der Zellkontraktion. Die Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten aus den RVs drei Wochen nach PAB (MAO-B $^{fl/fl}$ n = 6, kmMAO-B KO n = 5) oder SHAM (MAO-B $^{fl/fl}$ n = 6, kmMAO-B KO n = 6) Operationen ist dargestellt. Es sind Daten zur diastolischen Zelllänge (Ldiast in µm), Kontraktionsgeschwindigkeit (Con Vel in µm/s), Relaxationsgeschwindigkeit (Rel Vel in µm/s) und zur lastfreien Zellverkürzung (quantifiziert als prozentuale Verkürzungsamplitude, normiert auf die diastolische Zelllänge der einzelnen Zellen, dL/L) dargestellt. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar. 67

Tabelle 3: Unter basalen Bedingungen hatte der Kardiomyozyten-spezifische Knockout keine Auswirkungen auf die Herzen während der echokardiographischen Messungen. Nach dem erfolgreichen Abschluss der Tamoxifenfütterung wurden MAO-B$^{fl/fl}$ mit kmMAO-B KO Tieren innerhalb der Geschlechter und unter basalen Bedingungen miteinander vergleichen. Folgende morphologische und funktionelle Parameter wurden hierbei miteinander verglichen: Körpergewicht, EDV (enddiastolisches Volumen), ESV (endsystolisches Volumen), SV (Schlagvolumen), EF (Ejektionsfraktion), FS (fractional shortening, Fraktionelle Verkürzung), CO (cardiac output, Herzzeitvolumen), CI (cardiac index, Herzindex), IVSd und IVSs (Interventricular septum thickness in end diastole/ end systole, Interventrikuläre septale Wanddicke (enddiastolisch und endsystolisch)), LVIDd und LVIDs (Left ventricular internal diameter end diastole/ end systole, Linksventrikulärer innerer Durchmesser (enddiastolisch und endsystolisch)), LVPWd und LVPWs (Left ventricular posterior wall thickness in end diastole/ end systole, Linksventrikuläre posteriore Wanddicke (enddiastolisch und endsystolisch)), LV mass (Linksventrikuläre Masse), VTI (Velocity time integral, Schlagdistanz), HR (Heart rate, Herzfrequenz), TAPSE (Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion, Systolische Auslenkung der Trikuspidalklappe), RVID (right ventricular inner diameter, Rechtsventrikulärer innerer Durchmesser), RVWT (right ventricular wall thickness, Rechtsventrikuläre Wanddicke). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar. 86

9. Referenzen

Abraham, William T., Kirkwood F. Adams, Gregg C. Fonarow, Maria Rosa Costanzo, Robert L. Berkowitz, Thierry H. LeJemtel, Mei L. Cheng, and Janet Wynne. 2005. “In-Hospital Mortality in Patients With Acute Decompensated Heart Failure Requiring Intravenous Vasoactive Medications.” *Journal of the American College of Cardiology* 46 (1): 57–64. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.051.

Aikawa, Ryuichi, Toshio Nagai, Mariko Tanaka, Yunzeng Zou, Toshimitsu Ishihara, Hiroyuki Takano, Hiroshi Hasegawa, et al. 2001. “Reactive Oxygen Species in Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (4): 901–7. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6068.

Akazawa, Yohei, Kenichi Okumura, Ryo Ishii, Cameron Slorach, Wei Hui, Haruki Ide, Osami Honjo, et al. 2020. “Pulmonary Artery Banding Is a Relevant Model to Study the Right Ventricular Remodeling and Dysfunction That Occurs in Pulmonary Arterial Hypertension.” *Journal of Applied Physiology* 129 (2): 238–46. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00148.2020.

Alack, Katharina, Astrid Weiss, Karsten Krüger, Mona Höret, Ralph Schermuly, Torsten Frech, Martin Eggert, and Frank-Christoph Mooren. 2020. “Profiling of Human Lymphocytes Reveals a Specific Network of Protein Kinases Modulated by Endurance Training Status.” *Scientific Reports* 10 (1): 888. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57676-6.

Alborghetti, Marika, Edoardo Bianchini, Lanfranco De Carolis, Silvia Galli, Francesco E. Pontieri, and Domiziana Rinaldi. 2024. “Type-B Monoamine Oxidase Inhibitors in Neurological Diseases: Clinical Applications Based on Preclinical Findings.” *Neural Regeneration Research* 19 (1): 16–21. https://doi.org/10.4103/1673-5374.375299.

Aljanabi, Reem, Lina Alsous, Dima A. Sabbah, Halise Inci Gul, Mustafa Gul, and Sanaa K. Bardaweel. 2021. “Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development.” *Molecules* 26 (19): 6019. https://doi.org/10.3390/molecules26196019.

Antonucci, Salvatore, Moises Di Sante, Federica Tonolo, Laura Pontarollo, Valeria Scalcon, Petra Alanova, Roberta Menabò, et al. 2021. “The Determining Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Monoamine Oxidase Activity in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity.” *Antioxidants & Redox Signaling* 34 (7): 531–50. https://doi.org/10.1089/ars.2019.7929.

Archer, Stephen L., John J. Ryan, Stuart Rich, Sandeep Nathan, Kevin Tsai, Amit R. Patel, Yong-Hu Fang, and Lin Piao. 2012. “The Right Ventricle.” In *Muscle*, 537–53. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00038-7.

Arrigo, Mattia, Lars Christian Huber, Stephan Winnik, Fran Mikulicic, Federica Guidetti, Michelle Frank, Andreas J Flammer, and Frank Ruschitzka. 2019. “Right Ventricular Failure: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment.” *Cardiac Failure Review* 5 (3): 140–46. https://doi.org/10.15420/cfr.2019.15.2.

Bach, A W, N C Lan, D L Johnson, C W Abell, M E Bembenek, S W Kwan, P H Seeburg, and J C Shih. 1988. “cDNA Cloning of Human Liver Monoamine Oxidase A and B: Molecular Basis of Differences in Enzymatic Properties.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (13): 4934–38. https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4934.

Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel. 2005. “Mitochondria, Oxidants, and Aging.” *Cell* 120 (4): 483–95. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001.

Bekesi, Gabor, Zsolt Tulassay, Gabriella Lengyel, Zsuzsa Schaff, Dezso Szombath, Julia Stark, Istvan Marczell, et al. 2012. “The Effect of Selegiline on Total Scavenger Capacity and Liver Fat Content: A Preliminary Study in an Animal Model.” *Journal of Neural Transmission* 119 (1): 25–30. https://doi.org/10.1007/s00702-011-0666-x.

Bhattacharya, Priyanka T., and Matthew B. Ellison. 2024. “Right Ventricular Hypertrophy.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499876/.

Bikou, Olympia, Roger J. Hajjar, Lahouaria Hadri, and Yassine Sassi. 2020. “Induction and Characterization of Pulmonary Hypertension in Mice Using the Hypoxia/SU5416 Model.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 160 (June), 59252. https://doi.org/10.3791/59252.

Bînă, Anca M., Adrian Sturza, Ioana Iancu, Adelina G. Mocanu, Elena Bernad, Daniela V. Chiriac, Claudia Borza, et al. 2022. “Placental Oxidative Stress and Monoamine Oxidase Expression Are Increased in Severe Preeclampsia: A Pilot Study.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 477 (12): 2851–61. https://doi.org/10.1007/s11010-022-04499-w.

Binde, C. D., I. F. Tvete, J. Gåsemyr, B. Natvig, and M. Klemp. 2018. “A Multiple Treatment Comparison Meta-analysis of Monoamine Oxidase Type B Inhibitors for Parkinson’s Disease.” *British Journal of Clinical Pharmacology* 84 (9): 1917–27. https://doi.org/10.1111/bcp.13651.

Binek, Aleksandra, Celia Castans, Inmaculada Jorge, Navratan Bagwan, José Manuel Rodríguez, Rodrigo Fernández-Jiménez, Carlos Galán-Arriola, et al. 2024. “Oxidative Post-Translational Protein Modifications upon Ischemia/Reperfusion Injury.” *Antioxidants* 13 (1): 106. https://doi.org/10.3390/antiox13010106.

Boengler, Kerstin, Julia Bornbaum, Klaus-Dieter Schlüter, and Rainer Schulz. 2019. “P66shc and Its Role in Ischemic Cardiovascular Diseases.” *Basic Research in Cardiology* 114 (4): 29. https://doi.org/10.1007/s00395-019-0738-x.

Bogaard, Harm J., Kohtaro Abe, Anton Vonk Noordegraaf, and Norbert F. Voelkel. 2009. “The Right Ventricle Under Pressure.” *Chest* 135 (3): 794–804. https://doi.org/10.1378/chest.08-0492.

Bogaard, Harm J., Shiro Mizuno, Ayser A. Al Hussaini, Stefano Toldo, Antonio Abbate, Donatas Kraskauskas, Michael Kasper, Ramesh Natarajan, and Norbert F. Voelkel. 2011. “Suppression of Histone Deacetylases Worsens Right Ventricular Dysfunction after Pulmonary Artery Banding in Rats.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (10): 1402–10. https://doi.org/10.1164/rccm.201007-1106OC.

Bortolato, Marco, Kevin Chen, and Jean C. Shih. 2008. “Monoamine Oxidase Inactivation: From Pathophysiology to Therapeutics.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (13–14): 1527–33. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002.

Boucherat, Olivier, Vineet Agrawal, Allan Lawrie, and Sebastien Bonnet. 2022. “The Latest in Animal Models of Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure.” *Circulation Research* 130 (9): 1466–86. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319971.

Brenner, Bernhard, Gerhard Burckhardt, Andreas Draguhn, Heimo Ehmke, Ulf Eysel, Joachim Fandrey, Yves Garnier, et al. 2019. *Physiologie*. Edited by Hans-Christian Pape, Armin Kurtz, Stefan Silbernagl, Rainer Klinke, Rüdiger Gay, and Astried Rothenburger. 9., Vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. https://doi.org/10.1055/b-006-163285.

Bronicki, Ronald A., and Harris P. Baden. 2010. “Pathophysiology of Right Ventricular Failure in Pulmonary Hypertension:” *Pediatric Critical Care Medicine* 11 (March):S15–22. https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181c7671c.

Brown, David A., Justin B. Perry, Mitchell E. Allen, Hani N. Sabbah, Brian L. Stauffer, Saame Raza Shaikh, John G. F. Cleland, et al. 2017. “Mitochondrial Function as a Therapeutic Target in Heart Failure.” *Nature Reviews Cardiology* 14 (4): 238–50. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.203.

Bueno, O. F., L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, et al. 2000. “The MEK1-ERK1/2 Signaling Pathway Promotes Compensated Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice.” *The EMBO Journal* 19 (23): 6341–50. https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6341.

Cadenas, E., and K. J. Davies. 2000. “Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging.” *Free Radical Biology & Medicine* 29 (3–4): 222–30. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8.

Campo, A., S. C. Mathai, J. Le Pavec, A. L. Zaiman, L. K. Hummers, D. Boyce, T. Housten, et al. 2011. “Outcomes of Hospitalisation for Right Heart Failure in Pulmonary Arterial Hypertension.” *European Respiratory Journal* 38 (2): 359–67. https://doi.org/10.1183/09031936.00148310.

Canton, Marcella, Andreas Skyschally, Roberta Menabò, Kerstin Boengler, Petra Gres, Rainer Schulz, Michael Haude, Raimund Erbel, Fabio Di Lisa, and Gerd Heusch. 2006. “Oxidative Modification of Tropomyosin and Myocardial Dysfunction Following Coronary Microembolization.” *European Heart Journal* 27 (7): 875–81. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi751.

Chrisp, Paul, George J. Mammen, and Eugene M. Sorkin. 1991. “Selegiline: A Review of Its Pharmacology, Symptomatic Benefits and Protective Potential in Parkinson??S Disease.” *Drugs & Aging* 1 (3): 228–48. https://doi.org/10.2165/00002512-199101030-00006.

Ciuclan, Loredana, Olivier Bonneau, Martin Hussey, Nicholas Duggan, Alan M. Holmes, Robert Good, Rowan Stringer, et al. 2011. “A Novel Murine Model of Severe Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (10): 1171–82. https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0412OC.

Clerk, Angela, Stephen J. Fuller, Ashour Michael, and Peter H. Sugden. 1998. “Stimulation of ‘Stress-Regulated’ Mitogen-Activated Protein Kinases (Stress-Activated Protein Kinases/c-Jun N-Terminal Kinases and P38-Mitogen-Activated Protein Kinases) in Perfused Rat Hearts by Oxidative and Other Stresses.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (13): 7228–34. https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7228.

Costiniti, Veronica, Iolanda Spera, Roberta Menabò, Erika M. Palmieri, Alessio Menga, Pasquale Scarcia, Vito Porcelli, Rosanna Gissi, Alessandra Castegna, and Marcella Canton. 2018. “Monoamine Oxidase-Dependent Histamine Catabolism Accounts for Post-Ischemic Cardiac Redox Imbalance and Injury.” *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1864 (9 Pt B): 3050–59. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.018.

Cui, Yuting, Kenneth W. K. Liu, Mary S. M. Ip, Yingmin Liang, and Judith C. W. Mak. 2020. “Protective Effect of Selegiline on Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Lungs in Vivo.” *Annals of Translational Medicine* 8 (21): 1418. https://doi.org/10.21037/atm-20-2426.

Deaño, Roderick C., Cherylanne Glassner-Kolmin, Melvyn Rubenfire, Adaani Frost, Scott Visovatti, Vallerie V. McLaughlin, and Mardi Gomberg-Maitland. 2013. “Referral of Patients With Pulmonary Hypertension Diagnoses to Tertiary Pulmonary Hypertension

Centers: The Multicenter RePHerral Study." *JAMA Internal Medicine* 173 (10): 887. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.319.

Dell'Italia, Louis J. 1991. "The Right Ventricle: Anatomy, Physiology, and Clinical Importance." *Current Problems in Cardiology* 16 (10): 658–720. https://doi.org/10.1016/0146-2806(91)90009-Y.

Deng, Zemin, Jane H. Morse, Susan L. Slager, Nieves Cuervo, Keith J. Moore, George Venetos, Sergey Kalachikov, et al. 2000. "Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor–II Gene." *The American Journal of Human Genetics* 67 (3): 737–44. https://doi.org/10.1086/303059.

Deshwal, Soni, Moises Di Sante, Fabio Di Lisa, and Nina Kaludercic. 2017. "Emerging Role of Monoamine Oxidase as a Therapeutic Target for Cardiovascular Disease." *Current Opinion in Pharmacology* 33 (April):64–69. https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.003.

Deshwal, Soni, Marleen Forkink, Chou-Hui Hu, Guido Buonincontri, Salvatore Antonucci, Moises Di Sante, Michael P. Murphy, et al. 2018. "Monoamine Oxidase-Dependent Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Dysfunction and Mast Cell Degranulation Lead to Adverse Cardiac Remodeling in Diabetes." *Cell Death and Differentiation* 25 (9): 1671–85. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0071-1.

Di Lisa, Fabio, Nina Kaludercic, Andrea Carpi, Roberta Menabò, and Marco Giorgio. 2009. "Mitochondrial Pathways for ROS Formation and Myocardial Injury: The Relevance of p66Shc and Monoamine Oxidase." *Basic Research in Cardiology* 104 (2): 131–39. https://doi.org/10.1007/s00395-009-0008-4.

Ding, Suling, Mieradilijiang Abudupataer, Zheliang Zhou, Jinmiao Chen, Hui Li, Lili Xu, Weiwei Zhang, et al. 2018. "Histamine Deficiency Aggravates Cardiac Injury through miR-206/216b-Atg13 Axis-Mediated Autophagic-Dependant Apoptosis." *Cell Death & Disease* 9 (6): 694. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0723-6.

Dodou, Evdokia, Michael P. Verzi, Joshua P. Anderson, Shan-Mei Xu, and Brian L. Black. 2004. "*Mef2c* Is a Direct Transcriptional Target of ISL1 and GATA Factors in the Anterior Heart Field during Mouse Embryonic Development." *Development* 131 (16): 3931–42. https://doi.org/10.1242/dev.01256.

Dorris, Roy L. 1982. "A Simple Method for Screening Monoamine Oxidase (MAO) Inhibitory Drugs for Type Preference." *Journal of Pharmacological Methods* 7 (2): 133–37. https://doi.org/10.1016/0160-5402(82)90025-0.

Douschan, Philipp, Gabor Kovacs, Alexander Avian, Vasile Foris, Fabian Gruber, Andrea Olschewski, and Horst Olschewski. 2018. "Mild Elevation of Pulmonary Arterial

Pressure as a Predictor of Mortality." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197 (4): 509–16. https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1215OC.

Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001.

Durrant, David E, and Deborah K Morrison. 2018. "Targeting the Raf Kinases in Human Cancer: The Raf Dimer Dilemma." *British Journal of Cancer* 118 (1): 3–8. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.399.

Edmondson, D. E., A. Mattevi, C. Binda, M. Li, and F. Hubalek. 2004. "Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase." *Current Medicinal Chemistry* 11 (15): 1983–93. https://doi.org/10.2174/0929867043364784.

Edwards, David J. 1978. "Phenylethanolamine Is a Specific Substrate for Type B Monoamine Oxidase." *Life Sciences* 23 (11): 1201–7. https://doi.org/10.1016/0024-3205(78)90355-7.

Eif, Vincent W. W. van, Sylvia J. P. Bogaards, and Willem J. van der Laarse. 2014. "Intrinsic Cardiac Adrenergic (ICA) Cell Density and MAO-A Activity in Failing Rat Hearts." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 35 (1): 47–53. https://doi.org/10.1007/s10974-013-9373-6.

Ellmers, Leigh J, Nicola J A Scott, Jarkko Piuhola, Nobuyo Maeda, Oliver Smithies, Chris M Frampton, A Mark Richards, and Vicky A Cameron. 2007. "Npr1-Regulated Gene Pathways Contributing to Cardiac Hypertrophy and Fibrosis." *Journal of Molecular Endocrinology* 38 (2): 245–57. https://doi.org/10.1677/jme.1.02138.

Esfandiary, Azadeh, Hanna S. Kutsche, Rolf Schreckenberg, Martin Weber, Oleg Pak, Baktybek Kojonazarov, Akylbek Sydykov, et al. 2019. "Protection against Pressure Overload-Induced Right Heart Failure by Uncoupling Protein 2 Silencing." *Cardiovascular Research* 115 (7): 1217–27. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz049.

Fuller, Stephen J., Sally A. Osborne, Sam J. Leonard, Michelle A. Hardyman, George Vaniotis, Bruce G. Allen, Peter H. Sugden, and Angela Clerk. 2015. "Cardiac Protein Kinases: The Cardiomyocyte Kinome and Differential Kinase Expression in Human Failing Hearts." *Cardiovascular Research* 108 (1): 87–98. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv210.

Giordano, Frank J. 2005. "Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, and Heart Failure." *Journal of Clinical Investigation* 115 (3): 500–508. https://doi.org/10.1172/JCI200524408.

Grimsby, Joseph, Miklos Toth, Kevin Chen, Takeshi Kumazawa, Lori Klaidman, James D. Adams, Farouk Karoum, Judit Gal, and Jean C. Shih. 1997. "Increased Stress Response and β–Phenylethylamine in MAOB–Deficient Mice." *Nature Genetics* 17 (2): 206–10. https://doi.org/10.1038/ng1097-206.

Haddad, François, Sharon A. Hunt, David N. Rosenthal, and Daniel J. Murphy. 2008. “Right Ventricular Function in Cardiovascular Disease, Part I: Anatomy, Physiology, Aging, and Functional Assessment of the Right Ventricle.” *Circulation* 117 (11): 1436–48. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653576.

Handoko, M. L., F. S. de Man, C. P. Allaart, W. J. Paulus, N. Westerhof, and A. Vonk-Noordegraaf. 2010. “Perspectives on Novel Therapeutic Strategies for Right Heart Failure in Pulmonary Arterial Hypertension: Lessons from the Left Heart.” *European Respiratory Review* 19 (115): 72–82. https://doi.org/10.1183/09059180.00007109.

Heath, D., and J. M. Kay. 1967. “Medial Thickness of Pulmonary Trunk in Rats with Cor Pulmonale Induced by Ingestion of Crotalaria Spectabilis Seeds.” *Cardiovascular Research* 1 (1): 74–79. https://doi.org/10.1093/cvr/1.1.74.

Heger, Jacqueline, Christine Hirschhäuser, Julia Bornbaum, Akylbek Sydykov, Astrid Dempfle, André Schneider, Thomas Braun, Klaus-Dieter Schlüter, and Rainer Schulz. 2021a. “Cardiomyocytes-Specific Deletion of Monoamine Oxidase B Reduces Irreversible Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.” *Free Radical Biology & Medicine* 165 (March):14–23. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.020.

2021b. “Cardiomyocytes-Specific Deletion of Monoamine Oxidase B Reduces Irreversible Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.” *Free Radical Biology & Medicine* 165 (March):14–23. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.020.

2021c. “Cardiomyocytes-Specific Deletion of Monoamine Oxidase B Reduces Irreversible Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.” *Free Radical Biology and Medicine* 165 (March):14–23. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.020.

Heger, Jacqueline, Tamara Szabados, Paulin Brosinsky, Péter Bencsik, Péter Ferdinandy, and Rainer Schulz. 2023. “Sex Difference in Cardioprotection against Acute Myocardial Infarction in MAO-B Knockout Mice In Vivo.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (7): 6443. https://doi.org/10.3390/ijms24076443.

Heinrich, Peter C., Matthias Müller, and Lutz Graeve, eds. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3.

Hirschhäuser, Christine, Akylbek Sydykov, Annemarie Wolf, Azadeh Esfandiary, Julia Bornbaum, Hanna Sarah Kutsche, Kerstin Boengler, et al. 2020. “Lack of Contribution of P66shc to Pressure Overload-Induced Right Heart Hypertrophy.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 9339. https://doi.org/10.3390/ijms21249339.

Holschneider, D. P., O. U. Scremin, K. P. Roos, D. R. Chialvo, K. Chen, and J. C. Shih. 2002. “Increased Baroreceptor Response in Mice Deficient in Monoamine Oxidase A and B.”

American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 282 (3): H964-972. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00309.2001.

Huppelsberg, Jens, and Kerstin Walter. 2013. *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4., Aktualisierte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.

Jang, Hyunsoo, Youngjun Park, and Jaebong Jang. 2022. "Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1: Structure, Biological Functions, and Its Inhibitors." *Frontiers in Pharmacology* 13 (November):1036844. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1036844.

Johnson, Martin. 1986. "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual." *Trends in Genetics* 2 (January):298. https://doi.org/10.1016/0168-9525(86)90275-1.

Jone, Pei-Ni, D. Dunbar Ivy, Amanda Hauck, Tara Karamlou, Uyen Truong, Ryan D. Coleman, Juan Pablo Sandoval, et al. 2023. "Pulmonary Hypertension in Congenital Heart Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association." *Circulation: Heart Failure* 16 (7). https://doi.org/10.1161/HHF.0000000000000080.

Kaludercic, Nina, Ruth Jepchirchir Arusei, and Fabio Di Lisa. 2023. "Recent Advances on the Role of Monoamine Oxidases in Cardiac Pathophysiology." *Basic Research in Cardiology* 118 (1): 41. https://doi.org/10.1007/s00395-023-01012-2.

Kaludercic, Nina, Andrea Carpi, Roberta Menabò, Fabio Di Lisa, and Nazareno Paolocci. 2011. "Monoamine Oxidases (MAO) in the Pathogenesis of Heart Failure and Ischemia/Reperfusion Injury." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (7): 1323–32. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.010.

Kaludercic, Nina, Andrea Carpi, Takahiro Nagayama, Vidhya Sivakumaran, Guangshuo Zhu, Edwin W. Lai, Djahida Bedja, et al. 2014. "Monoamine Oxidase B Prompts Mitochondrial and Cardiac Dysfunction in Pressure Overloaded Hearts." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (2): 267–80. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4616.

Kaludercic, Nina, Jeanne Mialet-Perez, Nazareno Paolocci, Angelo Parini, and Fabio Di Lisa. 2014. "Monoamine Oxidases as Sources of Oxidants in the Heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73 (August):34–42. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.032.

Kaludercic, Nina, Eiki Takimoto, Takahiro Nagayama, Ning Feng, Edwin W. Lai, Djahida Bedja, Kevin Chen, et al. 2010. "Monoamine Oxidase A–Mediated Enhanced Catabolism of Norepinephrine Contributes to Adverse Remodeling and Pump Failure in Hearts With Pressure Overload." *Circulation Research* 106 (1): 193–202. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198366.

Kehat, Izhak, and Jeffery D. Molkentin. 2010. "Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Signaling in Cardiac Hypertrophy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1188 (1): 96–102. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05088.x.

Kelly, Roisin F., Kim T. Lamont, Sarin Somers, Damian Hacking, Lydia Lacerda, Paul Thomas, Lionel H. Opie, and Sandrine Lecour. 2010. “Ethanolamine Is a Novel STAT-3 Dependent Cardioprotective Agent.” *Basic Research in Cardiology* 105 (6): 763–70. https://doi.org/10.1007/s00395-010-0125-0.

Kim, Sung-Moon, Ji-One Kang, Ji Eun Lim, Sue-Yun Hwang, and Bermseok Oh. 2018. “Csk Regulates Blood Pressure by Controlling the Synthetic Pathways of Aldosterone.” *Circulation Journal* 82 (1): 168–75. https://doi.org/10.1253/circj.CJ-17-0080.

Knight, Zachary A., and Kevan M. Shokat. 2007. “Chemical Genetics: Where Genetics and Pharmacology Meet.” *Cell* 128 (3): 425–30. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.021.

Knoll, J., and K. Magyar. 1972. “Some Puzzling Pharmacological Effects of Monoamine Oxidase Inhibitors.” *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 5:393–408.

Kulisz, Andre, Ningfang Chen, Navdeep S. Chandel, Zuohui Shao, and Paul T. Schumacker. 2002. “Mitochondrial ROS Initiate Phosphorylation of P38 MAP Kinase during Hypoxia in Cardiomyocytes.” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 282 (6): L1324–29. https://doi.org/10.1152/ajplung.00326.2001.

Lairez, Olivier, Denis Calise, Pascale Bianchi, Catherine Ordener, Odile Spreux-Varoquaux, Céline Guilbeau-Frugier, Ghislaine Escourrou, et al. 2009. “Genetic Deletion of MAO-A Promotes Serotonin-Dependent Ventricular Hypertrophy by Pressure Overload.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (4): 587–95. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017.

Lambeth, J. David. 2004. “NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen.” *Nature Reviews Immunology* 4 (3): 181–89. https://doi.org/10.1038/nri1312.

Lane, Kirk B., Rajiv D. Machado, Michael W. Pauciulo, Jennifer R. Thomson, John A. Phillips, James E. Loyd, William C. Nichols, and Richard C. Trembath. 2000. “Heterozygous Germline Mutations in BMPR2, Encoding a TGF-β Receptor, Cause Familial Primary Pulmonary Hypertension.” *Nature Genetics* 26 (1): 81–84. https://doi.org/10.1038/79226.

Lang, Florian, Ralf Brandes, and Robert F. Schmidt, eds. 2019. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 32. korrigierte Auflage. Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer.

Leary, Peter J., Richard A. Kronmal, David A. Bluemke, Peter M. Buttrick, Kenneth L. Jones, David P. Kao, Steven M. Kawut, et al. 2018. “Histamine H2 Receptor Polymorphisms, Myocardial Transcripts, and Heart Failure (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Beta-Blocker Effect on Remodeling and Gene Expression Trial).” *The American Journal of Cardiology* 121 (2): 256–61. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.10.016.

Lee, Hsin-Ling, Chwen-Lih Chen, Steve T. Yeh, Jay L. Zweier, and Yeong-Renn Chen. 2012. “Biphasic Modulation of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Myocardial Ischemia and Reperfusion.” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 (7): H1410–22. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00731.2011.

Lee, Hyeon-Ju, Ji-One Kang, Sung-Moon Kim, Su-Min Ji, So-Yon Park, Marina E. Kim, Baigalmaa Jigden, et al. 2016. “Gene Silencing and Haploinsufficiency of Csk Increase Blood Pressure.” Edited by Zhanjun Jia. *PLOS ONE* 11 (1): e0146841. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146841.

Lemay, Sarah-Eve, Charifa Awada, Tsukasa Shimauchi, Wen-Hui Wu, Sébastien Bonnet, Steeve Provencher, and Olivier Boucherat. 2021. “Fetal Gene Reactivation in Pulmonary Arterial Hypertension: GOOD, BAD, or BOTH?” *Cells* 10 (6): 1473. https://doi.org/10.3390/cells10061473.

Li, Nianyu, Kathy Ragheb, Gretchen Lawler, Jennie Sturgis, Bartek Rajwa, J. Andres Melendez, and J. Paul Robinson. 2003. “Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8516–25. https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200.

Maggiorani, Damien, Nicola Manzella, Dale E. Edmondson, Andrea Mattevi, Angelo Parini, Claudia Binda, and Jeanne Mialet-Perez. 2017. “Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017:1–8. https://doi.org/10.1155/2017/3017947.

Magyar, K. 2004. “(−)-Deprenyl, A Selective MAO-B Inhibitor, with Apoptotic and Anti-Apoptotic Properties.” *NeuroToxicology* 25 (1–2): 233–42. https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00102-5.

Mamazhakypov, Argen, Christine Veith, Ralph Theo Schermuly, and Akylbek Sydykov. 2023. “Surgical Protocol for Pulmonary Artery Banding in Mice to Generate a Model of Pressure-Overload-Induced Right Ventricular Failure.” *STAR Protocols* 4 (4): 102660. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102660.

Manni, Maria Elena, Stefania Rigacci, Elisabetta Borchi, Valentina Bargelli, Caterina Miceli, Carla Giordano, Laura Raimondi, and Chiara Nediani. 2016. “Monoamine Oxidase Is Overactivated in Left and Right Ventricles from Ischemic Hearts: An Intriguing Therapeutic Target.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1–10. https://doi.org/10.1155/2016/4375418.

Maron, Bradley A. 2023. “Revised Definition of Pulmonary Hypertension and Approach to Management: A Clinical Primer.” *Journal of the American Heart Association* 12 (8): e029024. https://doi.org/10.1161/JAHA.122.029024.

Maron, Bradley A., Steven H. Abman, C. Greg Elliott, Robert P. Frantz, Rachel K. Hopper, Evelyn M. Horn, Mark R. Nicolls, et al. 2021. “Pulmonary Arterial Hypertension: Diagnosis, Treatment, and Novel Advances.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 203 (12): 1472–87. https://doi.org/10.1164/rccm.202012-4317SO.

Maron, Bradley A., and Nazzareno Galiè. 2016. “Diagnosis, Treatment, and Clinical Management of Pulmonary Arterial Hypertension in the Contemporary Era: A Review.” *JAMA Cardiology* 1 (9): 1056. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.4471.

Maulik, Subir Kumar, and Santosh Kumar. 2012. “Oxidative Stress and Cardiac Hypertrophy: A Review.” *Toxicology Mechanisms and Methods* 22 (5): 359–66. https://doi.org/10.3109/15376516.2012.666650.

Mialet-Perez, J., P. Bianchi, O. Kunduzova, and A. Parini. 2007. “New Insights on Receptor-Dependent and Monoamine Oxidase-Dependent Effects of Serotonin in the Heart.” *Journal of Neural Transmission* 114 (6): 823–27. https://doi.org/10.1007/s00702-007-0695-7.

Misra, Mithilesh K., Maryam Sarwat, Pushpa Bhakuni, Renu Tuteja, and Narendra Tuteja. 2009. “Oxidative Stress and Ischemic Myocardial Syndromes.” *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 15 (10): RA209-219.

Mizuno, Yoshikuni, Nobutaka Hattori, Tomoyoshi Kondo, Masahiro Nomoto, Hideki Origasa, Ryosuke Takahashi, Mitsutoshi Yamamoto, and Nobuo Yanagisawa. 2017. “A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase III Trial of Selegiline Monotherapy for Early Parkinson Disease.” *Clinical Neuropharmacology* 40 (5): 201–7. https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000239.

Moldogazieva, N. T., I. M. Mokhosoev, N. B. Feldman, and S. V. Lutsenko. 2018. “ROS and RNS Signalling: Adaptive Redox Switches through Oxidative/Nitrosative Protein Modifications.” *Free Radical Research* 52 (5): 507–43. https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217.

Moore, Jacob J., and Abdolreza Saadabadi. 2024. “Selegiline.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526094/.

Mukherjee, P., S. Roy, D. Ghosh, and S. K. Nandi. 2022. “Role of Animal Models in Biomedical Research: A Review.” *Laboratory Animal Research* 38 (1): 18. https://doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1.

Murakami, Hidetomo, Tomotaka Shiraishi, Tadashi Umehara, Shusaku Omoto, and Yasuyuki Iguchi. 2023. “Recent Advances in Drug Therapy for Parkinson’s Disease.” *Internal Medicine* 62 (1): 33–42. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8940-21.

Murphy, Michael P. 2009. “How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species.” *Biochemical Journal* 417 (1): 1–13. https://doi.org/10.1042/BJ20081386.

Naeije, Robert, and Alessandra Manes. 2014. “The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension.” *European Respiratory Review* 23 (134): 476–87. https://doi.org/10.1183/09059180.00007414.

Neumann, Joachim, Juliane M. Grobe, Jacqueline Weisgut, Hubert G. Schwelberger, Wieslawa Agnieszka Fogel, Margaréta Marušáková, Hartmut Wache, et al. 2021. “Histamine Can Be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart.” *Frontiers in Pharmacology* 12 (May):582916. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.582916.

Nichols, William C., Daniel L. Koller, Bonnie Slovis, Tatiana Foroud, Valeri H. Terry, Nathan D. Arnold, David R. Siemieniak, et al. 1997. “Localization of the Gene for Familial Primary Pulmonary Hypertension to Chromosome 2q31–32.” *Nature Genetics* 15 (3): 277–80. https://doi.org/10.1038/ng0397-277.

Nickel, Alexander, Joachim Löffler, and Christoph Maack. 2013. “Myocardial Energetics in Heart Failure.” *Basic Research in Cardiology* 108 (4): 358. https://doi.org/10.1007/s00395-013-0358-9.

Nordberg, Jonas, and Elias S.J. Arnér. 2001. “Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System1 1This Review Is Based on the Licentiate Thesis ‘Thioredoxin Reductase—Interactions with the Redox Active Compounds 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene and Lipoic Acid’ by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4.” *Free Radical Biology and Medicine* 31 (11): 1287–1312. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9.

Obreztchikova, Maria, Hasnae Elouardighi, Mengfei Ho, Brenda A. Wilson, Zoya Gertsberg, and Susan F. Steinberg. 2006. “Distinct Signaling Functions for Shc Isoforms in the Heart.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (29): 20197–204. https://doi.org/10.1074/jbc.M601859200.

Omura, Junichi, Karima Habbout, Tsukasa Shimauchi, Wen-Hui Wu, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, et al. 2020. “Identification of Long Noncoding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension.” *Circulation* 142 (15): 1464–84. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047626.

Ono, Koh, and Jiahuai Han. 2000. “The P38 Signal Transduction Pathway Activation and Function.” *Cellular Signalling* 12 (1): 1–13. https://doi.org/10.1016/S0898-6568(99)00071-6.

Orsini, Francesca, Maurizio Moroni, Cristina Contursi, Masato Yano, PierGiuseppe Pelicci, Marco Giorgio, and Enrica Migliaccio. 2006. “Regulatory Effects of the Mitochondrial

Energetic Status on Mitochondrial p66Shc." *Biological Chemistry* 387 (10/11). https://doi.org/10.1515/BC.2006.176.

Pak, Oleg, Susan Scheibe, Azadeh Esfandiary, Mareike Gierhardt, Akylbek Sydykov, Angela Logan, Athanasios Fysikopoulos, et al. 2018. "Impact of the Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ on Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension." *The European Respiratory Journal*, February, 1701024. https://doi.org/10.1183/13993003.01024-2017.

Papaconstantinou, John. 2019. "The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease." *Cells* 8 (11): 1383. https://doi.org/10.3390/cells8111383.

Peoples, Jessica N., Anita Saraf, Nasab Ghazal, Tyler T. Pham, and Jennifer Q. Kwong. 2019. "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease." *Experimental & Molecular Medicine* 51 (12): 1–13. https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7.

Piao, Lin, Glenn Marsboom, and Stephen L. Archer. 2010. "Mitochondrial Metabolic Adaptation in Right Ventricular Hypertrophy and Failure." *Journal of Molecular Medicine* 88 (10): 1011–20. https://doi.org/10.1007/s00109-010-0679-1.

Pino, R., P. Failli, L. Mazzetti, and F. Buffoni. 1997. "Monoamine Oxidase and Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Activities in Isolated Cardiomyocytes of Spontaneously Hypertensive Rats." *Biochemical and Molecular Medicine* 62 (2): 188–96. https://doi.org/10.1006/bmme.1997.2633.

Potnuri, Ajay Godwin, Lingesh Allakonda, Arulvelan Appavoo, Sherin Saheera, and Renuka R. Nair. 2018. "Association of Histamine with Hypertension-Induced Cardiac Remodeling and Reduction of Hypertrophy with the Histamine-2-Receptor Antagonist Famotidine Compared with the Beta-Blocker Metoprolol." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 41 (12): 1023–35. https://doi.org/10.1038/s41440-018-0109-2.

Qian, Xinling, Yuqian Li, Xiaotian Liu, Runqi Tu, Zhongyan Tian, Haiqing Zhang, Xia Zhang, et al. 2018. "C-Src Tyrosine Kinase Gene Rs1378942 Polymorphism and Hypertension in Asians: Review and Meta-Analysis." *Clinica Chimica Acta* 487 (December):202–9. https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.003.

Qin, Bo, and Junlan Zhou. 2015. "Src Family Kinases (SFK) Mediate Angiotensin II-Induced Myosin Light Chain Phosphorylation and Hypertension." Edited by Yaoliang Tang. *PLOS ONE* 10 (5): e0127891. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127891.

Qin, Fuzhong, Junya Shite, Weike Mao, and Chang-seng Liang. 2003. "Selegiline Attenuates Cardiac Oxidative Stress and Apoptosis in Heart Failure: Association with Improvement

of Cardiac Function." *European Journal of Pharmacology* 461 (2–3): 149–58. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01306-2.

Qipshidze, Natia, Neetu Tyagi, Naira Metreveli, David Lominadze, and Suresh C. Tyagi. 2012. "Autophagy Mechanism of Right Ventricular Remodeling in Murine Model of Pulmonary Artery Constriction." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 (3): H688–96. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00777.2011.

Reddy, Sushma, and Daniel Bernstein. 2015. "Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure." *Circulation* 132 (18): 1734–42. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012975.

Rodriguez, Carmen, Juan C. Mayo, Rosa M. Sainz, Isaac Antolin, Federico Herrera, Vanesa Martin, and Russel J. Reiter. 2004. "Regulation of Antioxidant Enzymes: A Significant Role for Melatonin." *Journal of Pineal Research* 36 (1): 1–9. https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x.

Rodríguez, Manuel J., Josep Saura, Ellen E. Billett, Cheryl C. Finch, and Nicole Mahy. 2001. "Cellular Localization of Monoamine Oxidase A and B in Human Tissues Outside of the Central Nervous System." *Cell and Tissue Research* 304 (2): 215–20. https://doi.org/10.1007/s004410100361.

Rossano, Flavia, Claudio Caiazza, Andrea Sobrino, Niccolò Solini, Alessandro Vellucci, Nicolas Zotti, Michele Fornaro, et al. 2023. "Efficacy and Safety of Selegiline across Different Psychiatric Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Oral and Transdermal Formulations." *European Neuropsychopharmacology* 72 (July):60–78. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2023.03.012.

Ryan, John J., and Stephen L. Archer. 2014. "The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension: Disorders of Metabolism, Angiogenesis and Adrenergic Signaling in Right Ventricular Failure." *Circulation Research* 115 (1): 176–88. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301129.

Sabri, Abdelkarim, Hoyt H. Hughie, and Pamela A. Lucchesi. 2003. "Regulation of Hypertrophic and Apoptotic Signaling Pathways by Reactive Oxygen Species in Cardiac Myocytes." *Antioxidants & Redox Signaling* 5 (6): 731–40. https://doi.org/10.1089/152308603770380034.

Saheera, Sherin, Ajay Godwin Potnuri, Ashrith Guha, Suresh S. Palaniyandi, and Rajarajan A. Thandavarayan. 2022. "Histamine 2 Receptors in Cardiovascular Biology: A Friend for the Heart." *Drug Discovery Today* 27 (1): 234–45. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.008.

Saura, J., E. Nadal, B. van den Berg, M. Vila, J.A. Bombi, and N. Mahy. 1996. “Localization of Monoamine Oxidases in Human Peripheral Tissues.” *Life Sciences* 59 (16): 1341–49. https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00459-6.

Sawyer, Douglas B., Deborah A. Siwik, Lei Xiao, David R. Pimentel, Krishna Singh, and Wilson S. Colucci. 2002. “Role of Oxidative Stress in Myocardial Hypertrophy and Failure.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (4): 379–88. https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1526.

Schaper, J, E Meiser, and G Stämmler. 1985. “Ultrastructural Morphometric Analysis of Myocardium from Dogs, Rats, Hamsters, Mice, and from Human Hearts.” *Circulation Research* 56 (3): 377–91. https://doi.org/10.1161/01.RES.56.3.377.

Schartl, Manfred, Manfred Gessler, Arnold von Eckardstein, and Michael Arand, eds. 2009. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen: große Falttafel mit Stoffwechselübersicht*. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Schulz, Rainer, and Klaus-Dieter Schlüter. 2023. “Importance of Mitochondria in Cardiac Pathologies: Focus on Uncoupling Proteins and Monoamine Oxidases.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (7): 6459. https://doi.org/10.3390/ijms24076459.

Seko, Yoshinori, Naoyuki Takahashi, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, and Yoshio Yazaki. 1997. “Hypoxia and Hypoxia/Reoxygenation Activate p65PAK, p38Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), and Stress-Activated Protein Kinase (SAPK) in Cultured Rat Cardiac Myocytes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 (3): 840–44. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7570.

Sharma, Kavita, and David A. Kass. 2014. “Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Mechanisms, Clinical Features, and Therapies.” *Circulation Research* 115 (1): 79–96. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.302922.

Shi, Qian, Hamza Malik, Rachel M. Crawford, Jennifer Streeter, Jinxi Wang, Ran Huo, Jean C. Shih, et al. 2024. “Cardiac MAO-A Inhibition Protects against Catecholamine-Induced Ventricular Arrhythmias via Enhanced Diastolic Calcium Control.” *Cardiovascular Research*, January, cvae012. https://doi.org/10.1093/cvr/cvae012.

Sivasubramaniam, S. D., C. C. Finch, M. J. Rodriguez, N. Mahy, and E. E. Billett. 2003. “A Comparative Study of the Expression of Monoamine Oxidase-A and -B mRNA and Protein in Non-CNS Human Tissues.” *Cell and Tissue Research* 313 (3): 291–300. https://doi.org/10.1007/s00441-003-0765-6.

Smith, Paul, J. M. Kay, and Donald Heath. 1970. “Hypertensive Pulmonary Vascular Disease in Rats after Prolonged Feeding with *Crotalaria Spectabilis* Seeds.” *The Journal of Pathology* 102 (2): 97–106. https://doi.org/10.1002/path.1711020205.

Sommer, Natascha, and Rainer Schulz. 2021. “Mitochondrial Monoamine Oxidase: Another Player in Pulmonary Hypertension?” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 64 (3): 277–78. https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0523ED.

Spruijt, Onno A., Frances S. de Man, Herman Groepenhoff, Frank Oosterveer, Nico Westerhof, Anton Vonk-Noordegraaf, and Harm-Jan Bogaard. 2015. “The Effects of Exercise on Right Ventricular Contractility and Right Ventricular-Arterial Coupling in Pulmonary Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (9): 1050–57. https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2271OC.

Srivastava, Deepak, and Eric N. Olson. 2000. “A Genetic Blueprint for Cardiac Development.” *Nature* 407 (6801): 221–26. https://doi.org/10.1038/35025190.

Strange, Geoff, Simon Stewart, David S. Celermajer, David Prior, Gregory M. Scalia, Thomas H. Marwick, Eli Gabbay, et al. 2019. “Threshold of Pulmonary Hypertension Associated With Increased Mortality.” *Journal of the American College of Cardiology* 73 (21): 2660–72. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.03.482.

Sturza, Adrian, Oana M. Duicu, Adrian Vaduva, Maria D. Dănilă, Lavinia Noveanu, András Varró, and Danina M. Muntean. 2015. “Monoamine Oxidases Are Novel Sources of Cardiovascular Oxidative Stress in Experimental Diabetes.” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 93 (7): 555–61. https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0544.

Sun, Xiao-Qing, Eva L. Peters, Ingrid Schalij, Julie Birkmose Axelsen, Stine Andersen, Kondababu Kurakula, Maria Catalina Gomez-Puerto, et al. 2021. “Increased MAO-A Activity Promotes Progression of Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 64 (3): 331–43. https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0105OC.

Sztrymf, B., R. Souza, L. Bertoletti, X. Jais, O. Sitbon, L. C. Price, G. Simonneau, and M. Humbert. 2010. “Prognostic Factors of Acute Heart Failure in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension.” *European Respiratory Journal* 35 (6): 1286–93. https://doi.org/10.1183/09031936.00070209.

Tanijiri, H. 1975. “Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats.” *Japanese Heart Journal* 16 (2): 174–88. https://doi.org/10.1536/ihj.16.174.

Thum, Thomas, Carina Gross, Jan Fiedler, Thomas Fischer, Stephan Kissler, Markus Bussen, Paolo Galuppo, et al. 2008. “MicroRNA-21 Contributes to Myocardial Disease by Stimulating MAP Kinase Signalling in Fibroblasts.” *Nature* 456 (7224): 980–84. https://doi.org/10.1038/nature07511.

Tsutsui, Hiroyuki, Shintaro Kinugawa, and Shouji Matsushima. 2011. “Oxidative Stress and Heart Failure.” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 (6): H2181–90. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011.

Tu, Victoria C., Joe J. Bahl, and Qin M. Chen. 2003. “Distinct Roles of P42/P44^{ERK} and P38 MAPK in Oxidant-Induced AP-1 Activation and Cardiomyocyte Hypertrophy.” *Cardiovascular Toxicology* 3 (2): 119–34. https://doi.org/10.1385/CT:3:2:119.

Turrens, Julio F. 1997. “Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain.” *Bioscience Reports* 17 (1): 3–8. https://doi.org/10.1023/A:1027374931887.

Ukita, Rei, John W. Stokes, W. Kelly Wu, Jennifer Talackine, Nancy Cardwell, Yatrik Patel, Clayne Benson, et al. 2021. “A Large Animal Model for Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure: Left Pulmonary Artery Ligation and Progressive Main Pulmonary Artery Banding in Sheep.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 173 (July), 62694. https://doi.org/10.3791/62694.

Umbarkar, Prachi, Sarojini Singh, Silpa Arkat, S.L. Bodhankar, Sathiyanarayanan Lohidasan, and Sandhya L. Sitasawad. 2015. “Monoamine Oxidase-A Is an Important Source of Oxidative Stress and Promotes Cardiac Dysfunction, Apoptosis, and Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy.” *Free Radical Biology and Medicine* 87 (October):263–73. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.025.

Van Der Feen, Diederik E., Kondababu Kurakula, Eve Tremblay, Olivier Boucherat, Guido P. L. Bossers, Robert Szulcek, Alice Bourgeois, et al. 2019. “Multicenter Preclinical Validation of BET Inhibition for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 200 (7): 910–20. https://doi.org/10.1164/rccm.201812-2275OC.

Vitali, Sally H., Georg Hansmann, Chase Rose, Angeles Fernandez-Gonzalez, Annette Scheid, S. Alex Mitsialis, and Stella Kourembanas. 2014. “The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Hypertension Revisited: Long-Term Follow-Up.” *Pulmonary Circulation* 4 (4): 619–29. https://doi.org/10.1086/678508.

Wang, Shu-Huei, Feng-Chiao Tsai, Heng-Huei Lin, Tse-Ya Yu, Chun-Heng Kuo, Hung-Yuan Li, and Mao-Shin Lin. 2023. “Inhibition of Monoamine Oxidase B Reduces Atherosclerosis and Fatty Liver in Mice.” *Clinical Science* 137 (1): 17–30. https://doi.org/10.1042/CS20220477.

Wang, Yanwen, Shunyao Wang, Ming Lei, Mark Boyett, Hoyee Tsui, Wei Liu, and Xin Wang. 2018. “The P21-activated Kinase 1 (Pak1) Signalling Pathway in Cardiac Disease: From Mechanistic Study to Therapeutic Exploration.” *British Journal of Pharmacology* 175 (8): 1362–74. https://doi.org/10.1111/bph.13872.

Wang, Yibin. 2007. “Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases.” *Circulation* 116 (12): 1413–23. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589.

Wang, Zhijie, David A. Schreier, Timothy A. Hacker, and Naomi C. Chesler. 2013. “Progressive Right Ventricular Functional and Structural Changes in a Mouse Model of Pulmonary Arterial Hypertension.” *Physiological Reports* 1 (7): e00184. https://doi.org/10.1002/phy2.184.

Weiss, Astrid, Moritz Christian Neubauer, Dinesh Yerabolu, Baktybek Kojonazarov, Beate Christiane Schlueter, Lavinia Neubert, Danny Jonigk, et al. 2019. “Targeting Cyclin-Dependent Kinases for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension.” *Nature Communications* 10 (1): 2204. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10135-x.

Wen, Yi, Ruohong Liu, Ning Lin, Hao Luo, Jiajia Tang, Qilin Huang, Hongyu Sun, and Lijun Tang. 2019. “NADPH Oxidase Hyperactivity Contributes to Cardiac Dysfunction and Apoptosis in Rats with Severe Experimental Pancreatitis through ROS-Mediated MAPK Signaling Pathway.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (May):1–18. https://doi.org/10.1155/2019/4578175.

West, James, Karen Fagan, Wolfgang Steudel, Brian Fouty, Kirk Lane, Julie Harral, Marloes Hoedt-Miller, et al. 2004. “Pulmonary Hypertension in Transgenic Mice Expressing a Dominant-Negative BMPRII Gene in Smooth Muscle.” *Circulation Research* 94 (8): 1109–14. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126047.82846.20.

Wu, Junzhen, Shijin Xia, Bill Kalionis, Wenbin Wan, and Tao Sun. 2014. “The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Aging.” *BioMed Research International* 2014:1–13. https://doi.org/10.1155/2014/615312.

Wu, Xueji, Wei Xie, Wenxuan Xie, Wenyi Wei, and Jianping Guo. 2022. “Beyond Controlling Cell Size: Functional Analyses of S6K in Tumorigenesis.” *Cell Death & Disease* 13 (7): 646. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05081-4.

Yerabolu, Dinesh, Astrid Weiss, Baktybek Kojonazarov, Mario Boehm, Beate Christiane Schlueter, Clemens Ruppert, Andreas Günther, et al. 2021. “Targeting Jak-Stat Signaling in Experimental Pulmonary Hypertension.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 64 (1): 100–114. https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0431OC.

Youdim, Moussa B H, and Y S Bakhle. 2006. “Monoamine Oxidase: Isoforms and Inhibitors in Parkinson’s Disease and Depressive Illness: Monoamine Oxidase.” *British Journal of Pharmacology* 147 (S1): S287–96. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706464.

Zhai, Yuhong, Jun Yang, Jing Zhang, Jian Yang, Qi Li, and Tao Zheng. 2021. “Src-Family Protein Tyrosine Kinases: A Promising Target for Treating Cardiovascular Diseases.” *International Journal of Medical Sciences* 18 (5): 1216–24. https://doi.org/10.7150/ijms.49241.

Zorov, Dmitry B., Charles R. Filburn, Lars-Oliver Klotz, Jay L. Zweier, and Steven J. Sollott. 2000. “Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release.” *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1001–14. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1001.

Zungu-Edmondson, Makhosazane, and Yuichiro J. Suzuki. 2016. “Differential Stress Response Mechanisms in Right and Left Ventricles.” *Journal of Rare Diseases Research & Treatment* 1 (2): 39–45.

Publikationen

Brosinsky P, Heger J, Sydykov A, Weiss A, Klatt S, Czech L, Kraut S, Schermuly RT, Schlüter KD, Schulz R. Does Cell-Type-Specific Silencing of Monoamine Oxidase B Interfere with the Development of Right Ventricle (RV) Hypertrophy or Right Ventricle Failure in Pulmonary Hypertension? Int J Mol Sci. 2024 Jun 5;25(11):6212. doi: 10.3390/ijms25116212. PMID: 38892401; PMCID: PMC11172614.

Heger J, Szabados T, Brosinsky P, Bencsik P, Ferdinandy P, Schulz R. Sex Difference in Cardioprotection against Acute Myocardial Infarction in MAO-B Knockout Mice In Vivo. Int J Mol Sci. 2023 Mar 29;24(7):6443. doi: 10.3390/ijms24076443. PMID: 37047416; PMCID: PMC10094730.

Brosinsky P, Bornbaum J, Warga B, Schulz L, Schlüter KD, Ghigo A, Hirsch E, Schulz R, Euler G, Heger J. PI3K as Mediator of Apoptosis and Contractile Dysfunction in TGFβ_1-Stimulated Cardiomyocytes. Biology (Basel). 2021 Jul 16;10(7):670. doi: 10.3390/biology10070670. PMID: 34356525; PMCID: PMC8301398.

Brosinsky P, Leister H, Cheng N, Varelas X, Visekruna A, Luu M. Verteporfin protects against Th17 cell-mediated EAE independently of YAP inhibition. Eur J Immunol. 2022 Sep;52(9):1523-1526. doi: 10.1002/eji.202149564. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35776890.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis beachtet, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ festgelegt sind.

Darüber hinaus sind alle Personen aufgeführt, die an der unmittelbaren Erstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Zeit dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Schulz bedanken. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern auch für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die notwendige Unterstützung bei auftretenden Problemen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD. Dr. Jacqueline Heger. Durch die enge Zusammenarbeit und ihre fachliche und methodische Expertise habe ich mich stets gut betreut gefühlt. Ich danke ihr dafür, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte.
Die zahlreichen fachlichen und menschlichen Gespräche sowie die uneingeschränkte Unterstützung haben mir immer wieder neue Motivation und Sicherheit gegeben.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Akylbek Sydykov herzlich danken. Durch seine Zuverlässigkeit konnten wir alle geplanten Echokardiographie- und Operationstermine einhalten, die zum Teil Monate im Voraus festgelegt werden mussten. Ich bedanke mich auch für seine Geduld und sein Vertrauen beim Erlernen dieser Techniken unter seiner Aufsicht.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Ivan Manzini für die Übernahme der internen Betreuung dieser Arbeit. Ohne ihn wäre die Anfertigung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Zudem möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die mich in verschiedenen Weisen bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders bedanken möchte ich mich für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Leidensgenossin und Büronachbarin Laureen Czech. Hier ist aus einer Kollegin eine geschätzte Freundin geworden, der ich für die stets lustige Atmosphäre im Büro (und privat sowieso) danken möchte.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in privater Hinsicht unterstützt haben. Hier sind insbesondere Felix, Maja, Karli und Scott zu nennen.