

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Humanmedizin

**Charakterisierung der zellulären Stressantwort in embryonalen im Vergleich zu
adulten Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nina Schraps

aus Hamburg

Gießen, 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Kinderherzzentrum und Zentrum für angeborene Herzfehler

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendheilkunde

Klinik für Pädiatrische Kardiologie, Intensivmedizin und angeborene Herzfehler

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Jux

2. Gutachter: PD Dr. med. Won-K. Kim

Tag der Disputation: 04.11.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mitochondrien und ihre Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen	
1	
1.2 Struktur und Funktion von Mitochondrien	3
1.2.1 Die mitochondriale Atmungskette und die Oxidative Phosphorylierung.....	5
1.2.2 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und oxidativem Stress.....	7
1.3 Zelluläre Strategien zum Schutz eukaryotischer Zellen	9
1.3.1 Antioxidative Mechanismen als zelluläre Schutzstrategie.....	10
1.3.2 Die Hitzeschockantwort und Qualitätskontrolle von Proteinen	12
1.3.3 Die <i>Integrated-Stress-Response</i> (ISR) und mitochondriale <i>Unfolded-Protein_Response</i> (UPR ^{mt})	14
1.4 Zelluläre Stressresistenz während der kardialen Entwicklung	18
2. Ziele der Arbeit	22
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Substanzen und Chemikalien	25
3.1.2 Substanzen der Zellkultur	26
3.1.3 Medien der Zellkultur.....	27
3.1.4 Puffer und Lösungen	28
3.1.5 Geräte	29
3.1.6 Software und Online Programme	31
3.1.7 Verbrauchsmaterial	31
3.1.8 Kits	32
3.1.9 Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz.....	33
3.1.10 Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz	34
3.1.11 Inhibitoren	35
3.1.12 Größenstandards Western Blot	35
3.1.13 Deckflüssigkeit Immunfluoreszenz	35
3.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur	35
3.3 Arbeiten mit H9c2-Zellen.....	36
3.3.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen	36
3.4 Primärzellen	36

3.4.1	Versuchstiere.....	36
3.4.2	Laminin-Beschichtung in Vorbereitung auf die Präparation der Primärzellen.....	37
3.4.3	Isolation und Kultivierung adulter Maus-Kardiomyozyten.....	37
3.4.4	Isolation und Kultivierung embryonaler und neonataler Maus-Kardiomyozyten	38
3.5	Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität.....	39
3.5.1	LDH-Assay	39
3.5.2	Bestimmung der Kontraktilität embryonaler Kardiomyozyten	41
3.5.3	MTT-Assay	42
3.6	Proteinbiochemische Untersuchungen	43
3.6.1	Proteinisolation	43
3.6.2	Proteinbestimmung nach Lowry	43
3.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	44
3.6.4	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot).....	45
3.6.5	Western Blot Analysen.....	45
3.6.6	„Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen.....	46
3.6.7	Densitometrische Quantifizierung von Proteinbanden	47
3.7	Immunfluoreszenz-Analyse	47
3.7.1	Vorbereitung und Fixierung der Zellen.....	47
3.7.2	Bindung der Antikörper.....	47
3.7.3	Kofärbung mit mehreren Primär-Antikörpern	48
3.7.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
3.7.5	Kardiomyozytenzählung und Bestimmung der Zellzyklusaktivität mittels Immunfluoreszenz	48
3.8	Detektion Reaktiver Sauerstoffverbindungen.....	49
3.8.1	Allgemeiner Versuchsaufbau zur Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen	49
3.8.2	TMRM-Assay.....	49
3.8.3	MitoSox™ Red.....	50
3.9	Statistische Methoden	50
4.	<i>Ergebnisse</i>.....	51
4.1	Charakteristika der H9c2-Zelllinie und Bedingungen der in-vitro-Experimente	51
4.1.1	Toleranz von H9c2-Zellen hinsichtlich der Inhibition von Komplex III der Atmungskette 52	
4.1.2	Aktivierung der ISR in H9c2-Zellen unter Antimycin A.....	54

4.2	Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten der Maus	56
4.2.1	Embryonale Kardiomyozyten zeigen eine hohe Toleranz gegenüber einer Inhibition von Komplex III der Atmungskette.....	57
4.2.2	Embryonale Kardiomyozyten zeigen keinen Verlust ihrer Zellzyklusaktivität unter Antimycin A.....	61
4.2.3	Embryonale Kardiomyozyten erhalten ihre Kontraktilität trotz einer Behandlung mit Antimycin A.....	63
4.2.4	Embryonale Kardiomyozyten aktivieren die ISR unter Antimycin A	64
4.2.5	Untersuchung der ER-Stress-Achse in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A	70
4.3	Untersuchung von oxidativem Stress und antioxidativen Mechanismen in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA.....	71
4.3.1	Die Inhibition von Komplex III der Atmungskette führt zu einer deutlichen Zunahme reaktiver Sauerstoffverbindungen	71
4.3.2	Embryonale Kardiomyozyten aktivieren antioxidative Mechanismen unter Antimycin A	75
4.3.3	Veränderung der Verteilungsmuster intramitochondrialer Proteine in embryonalen Kardiomyozyten nach Komplex-III-Inhibierung	79
4.4	Komplex-III-Inhibition in adulten Maus-Kardiomyozyten durch Antimycin A	83
4.4.1	Adulte Kardiomyozyten zeigen einen deutlichen Zellverlust bei Behandlung mit Antimycin A.....	83
4.4.2	Aktivierung der ISR in adulten im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition.....	84
4.5	Vergleich der Basisexpression stressrelevanter Proteine in embryonalen und adulten Kardiomyozyten bei einer Komplex-III-Inhibition	92
4.6	Inhibition der Atmungskette embryonaler Kardiomyozyten an Komplex I und V ..	97
4.6.1	H9c2-Zellen zeigen eine geringe Toleranz bei Behandlung mit Oligomycin und Rotenon	97
4.6.2	Embryonale Kardiomyozyten zeigen eine geringe Toleranz gegenüber einer Behandlung mit Oligomycin und Rotenon	98
4.6.3	Embryonale Kardiomyozyten aktivieren die ISR nach Behandlung mit Oligomycin ...	103
4.6.4	LDH-Freisetzung embryonaler Kardiomyozyten nach Inhibition verschiedener Komplexe der Atmungskette.....	105

4.7	Neonatale Kardiomyozyten zeigen ein ähnliches Verhalten wie embryonale Kardiomyozyten unter einer mitochondrialen Komplex-III-Inhibition	106
5.	<i>Diskussion</i>	110
5.1	Vergleich der Effekte einer mitochondrialen Komplex-III-Inhibition auf embryonale, neonatale und adulte Kardiomyozyten	110
5.2	Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition.....	114
5.3	Aktivierung der ER-Stress Achse in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition.....	118
5.3.1	Methodische Aspekte zur Quantifizierung der Zellzyklusaktivität in Kardiomyozyten 121	
5.4	Komplex-III-Inhibition in embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich mit dem in vivo Hccs-Modell und in vitro H9c2-Zellen	123
5.5	Intrazelluläre Umverteilung von HSP60 und SOD2 in embryonalen Kardiomyozyten nach AMA-Behandlung.....	128
5.6	Die unterschiedlichen Effekte einer Komplex-I-, -III- und -V-Inhibition der mitochondrialen Atmungskette auf embryonale Kardiomyozyten	130
5.7	LDH-Freisetzung bei Inhibition von Komplex I, III, und V in embryonalen Kardiomyozyten	134
5.8	Weitere Limitationen der Arbeit.....	135
5.9	Fazit und Ausblick	136
6.	<i>Zusammenfassung</i>	140
7.	<i>Summary</i>	141
8.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	142
9.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	145
10.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	148
11.	<i>Literaturverzeichnis</i>	149
12.	<i>Publikationsverzeichnis</i>	170
13.	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	171

14. Danksagung..... 172

1. Einleitung

1.1 Mitochondrien und ihre Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen

Während die Lebenserwartung der Menschen in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen hat, steigt die Zahl krankheitsfreier Jahre nicht in gleichem Maße an ¹. Stattdessen geht die höhere Lebenserwartung mit einer steigenden Prävalenz von Multimorbidität einher ². Eine wesentliche Rolle nehmen dabei kardiovaskuläre Erkrankungen ein, deren Inzidenz mit dem Alter zunimmt ³. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) sind kardiovaskuläre Erkrankungen mit fast 18 Millionen Toten jährlich auf Platz eins der weltweiten Todesursachen und entsprechen somit 32 % der globalen Todesfälle ⁴. Mit etwa 46,4 Milliarden Euro bzw. rund 13,7 % der gesamten Krankheitskosten in Deutschland entstehen im Bereich von Herz-Kreislauf-Erkrankungen somit auch die höchsten Kosten ⁵. Die Krankheitskosten umfassen dabei alle unmittelbar mit den medizinischen Leistungen im Rahmen der Behandlung verbundene Kosten, darunter auch Präventions- oder Rehabilitationskosten ⁵.

Im menschlichen Herzen stehen funktionsfähige Mitochondrien, die täglich bis zu 6 kg des zellulären Energieträgers ATP produzieren, in direkter Verbindung mit der Aufrechterhaltung einer normalen kardialen Funktion ^{6,7}. Auf zellulärer Ebene sind Mitochondrien, die im Herzen 30 % des Volumens kardialer Zellen in Anspruch nehmen, oftmals an der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen beteiligt ⁸. Eine mitochondriale Dysfunktion führt neben einem Mangel an ATP zu einer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), was unter anderem in einer Schädigung der mitochondrialen DNA resultiert ⁹. Der Großteil des mitochondrialen Proteoms ist nukleär kodiert, darunter auch die Untereinheiten von Komplex II der Atmungskette. Zu den in der mtDNA (mitochondriale DNA) kodierten Genen gehören die Untereinheiten von Komplex I, III und IV (siehe Abschnitt 1.2.1). Des Weiteren kodiert die mtDNA für die ATP-Synthase, 22 tRNAs und 2 rRNAs ¹⁰.

Mitochondrien sind dabei sehr anfällig gegenüber pathologischen Bedingungen, die unter anderem aufgrund eines nicht ausgereiften DNA-Reparatursystems und fehlender Introns schnell zu mitochondrialen DNA-Schädigungen führen ⁹. Die Mutationsrate der mitochondrialen DNA ist bis zu 10-mal höher als die der nukleären DNA und ihre Akkumulation ist mit einer Reihe kardialer Erkrankungen verbunden ⁹. Mutationen der mtDNA und damit einhergehende Veränderungen des mitochondrialen Metabolismus führen u. a. zu einem Energiedefizit der kardialen Zellen, was in einer Einschränkung der physiologischen kardialen Pumpfunktion resultieren kann ⁹. Eine besondere Rolle spielt die Akkumulation mitochondrialer DNA-Schäden und die vermehrte Bildung von ROS bei Alterungsprozessen des Herzens. So

äußert sich auf molekularer Ebene der Alterungsprozess des Herzens durch eine verminderte Kapazität zellprotektiver Mechanismen wie der verminderten Expression antioxidativer Mechanismen und Hitze-Schock-Proteinen (Chaperone) ³. Durch den stetigen Verlust eines Großteils ihrer kompensatorischen Fähigkeiten kommt es schließlich zur Ansammlung beschädigter oder fehlgefalteter Proteine ³.

Neben normalen Alterungsprozessen gibt es Erkrankungen, die mit einer defekten mitochondrialen Funktion einhergehen und dementsprechend als Mitochondriopathien bezeichnet werden. Erbliche Formen der Mitochondriopathien können aufgrund von Mutationen der mtDNA oder auch der nukleären DNA entstehen, da viele mitochondriale Proteine nukleär kodiert werden ¹⁰. Mutationen der mtDNA haben einen primär maternalen Erbgang, zeigen unterschiedliche Schweregrade und betreffen insbesondere das Nervensystem und das Herz, da diese auf eine hohe Produktion von ATP angewiesen sind ^{11,12}. Bekannte Beispiele für Mitochondriopathien, die auf Mutationen der mtDNA basieren, sind unter anderem Syndrome wie MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibres*) oder MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*). Dabei liegt meist eine sogenannte Heteroplasmie vor, die das gleichzeitige Vorliegen von mutierter und intakter mtDNA innerhalb einer Zelle bezeichnet ¹⁰. Mitochondriopathien wie MERRF oder MELAS verdeutlichen die Rolle, die eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion als essentieller Bestandteil der normalen Zellphysiologie spielt. Typische kardiale Manifestationen betreffen die Erregungsbildung und -leitung des Herzens. Hierbei kann es beispielsweise zu einem AV-Block, einem Schenkelblock sowie weiteren EKG-Veränderungen wie einer Verlängerung der QT-Zeit kommen. Des Weiteren betreffen die Mitochondriopathien häufig die Herzmuskulatur und führen daher zu einer Herzinsuffizienz ¹³.

Eine zentrale Rolle spielen Mitochondrien auch in der Vermittlung von Nebenwirkungen verschiedener Medikamente, was unter anderem in der Onkokardiologie von besonderer Bedeutung ist, die sich mit kardiovaskulären Komplikationen von Chemotherapeutika beschäftigt ¹⁴. Diese umfassen beispielsweise kardiale Arrhythmien, Hypertension oder Herzinsuffizienz ¹⁴. Zu einer der bekanntesten kardiotoxischen Medikamentengruppen zählen die Anthrazykline, mit Doxorubicin als einem ihrer wichtigsten Vertreter ¹⁴. Langzeitstudien haben gezeigt, dass Überlebende von Krebserkrankungen im Kindesalter, die mit Doxorubicin behandelt wurden, im Erwachsenenalter in bis zu 30 % der Fälle Anzeichen einer kardialen Funktionsstörung zeigten ^{14,15}. Als Ursache für die Kardiotoxizität der Anthrazykline wird die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die damit verbundene Zytotoxizität vermutet (siehe Abschnitt 1.2.2). Zudem sind neben der vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies Transkriptionsfaktoren vermindert, die für die mitochondriale Biogenese relevant sind ¹⁴.

Ein häufiger Grund für Hospitalisierungen in Deutschland ist das akute Koronarsyndrom mit Verschluss oder flussrelevanter Stenosierung einer Herzkranzarterie und drohendem Myokardinfarkt^{16,17}. Entscheidend für diese Patienten ist insbesondere eine zeitnahe Reperfusion^{18,19}. Die Wiedereröffnung eines bei einem ischämischen Myokardinfarkt verschlossenen Gefäßes kann jedoch zu einem sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden führen. Die Reperfusion führt unter anderem zu einem deutlichen Anstieg gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren. U. a. schwellen hierbei Mitochondrien innerhalb des reperfundierten Myokards an und verlieren ihre Integrität und Funktion²⁰. Die Folge ist ein Verlust von Kardiomyozyten und somit eine Funktionsstörung des Myokards^{20,21}. Mitochondriopathien und die Bedeutung von Mitochondrien in der Onkokardiologie sowie auch in der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens verdeutlichen den Zusammenhang zwischen mitochondrialer und kardialer Funktion und dessen klinische Bedeutung.

1.2 Struktur und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle eukaryotische Zellorganellen. Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer Morphologie 1898 von Dr. Carl Benda (gr. „Mitos“ = Faden und „Chondros“ = Körnchen)²². Eine Theorie für die Genese der Mitochondrien wurde 1967 erstmals mittels der sogenannten Endosymbiontentheorie aufgestellt. Mithilfe dieser ließen sich morphologische Besonderheiten, wie die Doppelmembran der Zellorganelle, erklären²³. Demnach entstanden die Mitochondrien aus einem endosymbiontischen Alphaproteobakterium, aufgenommen durch eine Zelle verwandt mit Asgard-Archaeen²⁴. Die zelluläre Integration des Proteobakteriums war ein entscheidender Schritt bei der Anpassung der Wirtszelle an einen steigenden Sauerstoffgehalt der Umgebung²⁵. Der durch Diffusion in die Zelle gelangende Sauerstoff konnte durch das Bakterium genutzt und an die ATP-Synthese und die Bildung verschiedener Metabolite gekoppelt werden²⁵. Der Energiestoffwechsel der Zellorganelle generiert mithilfe der Atmungskette metabolische Energie in Form von ATP (siehe Abschnitt 1.2.1)²⁶. Im Laufe der Zeit wurden jedoch immer mehr Funktionen der semiautonomen Zellorganelle entdeckt. So sind die Mitochondrien unter anderem eingebunden in die Synthese von Phospholipiden und Häm, in den Metabolismus von Aminosäuren, die Calcium-Homöostase sowie der Regulation von Apoptose, dem programmierten Zelltod. Ein weiterer, in der mitochondrialen Matrix lokalisierter, essentieller Stoffwechselweg ist außerdem der sogenannte Citrat-Zyklus^{11,24}.

Nachdem 1952 die ersten hochauflösenden, elektronenmikroskopischen Bilder der Mitochondrien entstanden, entwickelten sich zwei Modelle der Ultrastruktur der Mitochondrien^{22,27}. Palade und Sjostrand definierten mithilfe der Elektronenmikroskopie zum ersten Mal die mitochondriale Doppelmembran, bestehend aus einer inneren und einer äußeren Membran

^{28,29}. Die äußere Membran grenzt das Mitochondrium als eigenständige Zellorganelle vom Zytoplasma ab und ist im Gegensatz zur inneren Membran für kleine Moleküle bis zu einer Größe von 6000 Dalton frei permeabel. Die Permeabilität entsteht hierbei durch sogenannte Porine. Dies sind Proteine, die als Kanäle den Durchtritt von Molekülen durch die äußere Mitochondrienmembran ermöglichen ^{30,31}. Die innere, mitochondriale Membran grenzt den durch die beiden Membranen gebildeten Intermembranraum von der mitochondrialen Matrix ab (siehe Abbildung 1) ^{30,32}. Sie enthält für den Elektronentransport und die ATP-Synthese essentielle Enzyme und ist durch sogenannte Cristae charakterisiert, die eine starke Oberflächenvergrößerung der Membran bewirken ^{30,31}. Um den notwendigen Protonengradienten aufrechtzuerhalten, der essentiell für die oxidative Phosphorylierung ist, ist die innere Membran im Gegensatz zur äußeren Membran für die meisten Ionen und kleineren Moleküle impermeabel. Auch der Intermembranraum selbst enthält für die oxidative Phosphorylierung wichtige Proteine. Hierzu zählen zum einen das Cytochrom C, einen wasserlöslichen Elektronenüberträger und zum anderen die Adenylatkinase, welche AMP der oxidativen Phosphorylierung zuführt ³⁰. Die mitochondriale Matrix beinhaltet das mitochondriale Genom und Enzyme, die oxidative Reaktionen von Nahrungsbestandteilen katalysieren ^{30,31}. Als nahezu einzige Zellorganelle tragen die Mitochondrien ihr eigenes, zirkulär organisiertes und maternal vererbtes Genom ³³. In etwa 99 % der ca. 1.000 verschiedenen mitochondrialen Proteine werden im Zellkern kodiert und müssen ins Mitochondrium importiert werden, was eine koordinierte Kommunikation zwischen Kern und Mitochondrium erforderlich macht ³⁴.

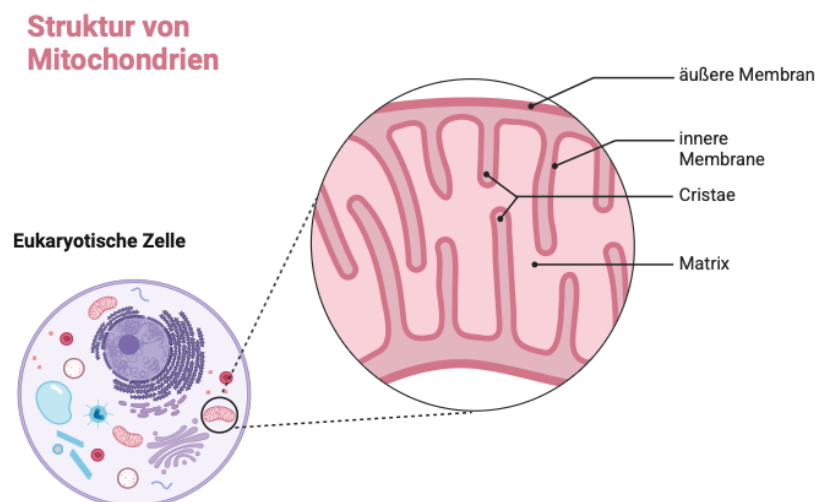


Abbildung 1: Die mitochondriale Ultrastruktur

Grafische Darstellung der mitochondrialen Doppelmembran, bestehend aus innerer und äußerer Membran. Die äußere Membran grenzt die eigenständige Zellorganelle gegenüber dem Zytoplasma ab. Die innere Membran grenzt die mitochondriale Matrix von dem Intermembranraum ab und trägt wichtige Enzyme der mitochondrialen Atmungskette. Durch die sogenannten Cristae wird eine starke

Oberflächenvergrößerung der Zellorganelle erreicht. (BioRender (2020). Modifiziert von „Mitochondria Structure Animal Cell.“, Bezogen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>).

Heute weitgehend anerkannt ist das Modell der Cristae-Junctions. Diesem Modell nach bestehen Cristae nicht nur aus einfachen Einstülpungen, sondern stellen ein komplexes Netzwerk aus lamellären und tubulären Strukturen dar, die durch die sogenannten Cristae-Junctions mit der inneren Membran verbunden sind^{35,36}.

Durch diese neue Sichtweise auf die innere Mitochondrienmembran entstand eine neue Einteilung der Kompartimente. So ergab sich neben dem Intermembranraum auch der Intercristae-Raum zwischen Cristae-Membran und innerer mitochondrialer Membran³⁷. Mithilfe der Elektronenmikroskopie konnten des Weiteren die direkte Nähe, teilweise sogar die direkten Kontaktstellen zwischen dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) und der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden. Diese Nähe von ER und Mitochondrien dient unter anderem der Mediation von Lipiden, Autophagie und Apoptose. Eine Dysfunktion solcher Kontaktstellen ist unter anderem assoziiert mit humanen Erkrankungen³².

1.2.1 Die mitochondriale Atmungskette und die Oxidative Phosphorylierung

Der mitochondriale Energiestoffwechsel dient der Bildung von ATP mittels einer Reihe von exergonen Redoxprozessen, entlang der inneren Mitochondrienmembran²⁶. An der Produktion des ATP ist zum einen die Elektronentransport- oder Atmungskette als eine Reihe von vier Multi-Enzym-Komplexen in der inneren Mitochondrienmembran beteiligt und zum anderen die F₁F₀-ATPase (auch ATP-Synthase genannt)^{26,30,38,39}. Wasserstoff, der durch die β -Oxidation von Fettsäuren, die Glykolyse und den Citratzyklus entsteht, wird als sogenanntes Reduktionsäquivalent in Form von NADH (Nikotinamidadenindinukleotid) und FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid) zwischengespeichert³⁰. Der Transport entlang der Redoxsysteme der Atmungskette, der mit der Übertragung der Elektronen von NADH auf Sauerstoff endet, dient dabei dem Aufbau eines Protonengradienten³⁰. Der Protonengradient entsteht durch den Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum durch Komplex I, III und IV der Atmungskette²⁶. Die sogenannte protonenmotorische Kraft, die durch den Protonengradienten entsteht, kann letzten Endes genutzt werden, um über die ATP-Synthase und damit den Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) ADP (Adenosindiphosphat) in ATP umzuwandeln²⁶. Die Atmungskette besteht aus insgesamt 4 Untereinheiten⁴⁰. Durch die Oxidation von NADH durch den Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette werden die Elektronen über das Coenzym Flavinmononukleotid (FMN) und 8 Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon übertragen. Im Rahmen dieser Redoxreaktion werden pro oxidiertem NADH-Molekül vier Protonen über die innere mitochondriale Membran aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert (siehe Abbildung 2)^{26,30}. Komplex II der Atmungskette (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase)

entspricht in seinen hydrophilen Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, wodurch das dort gebildete FADH_2 seine Elektronen direkt weiter auf Ubichinon überträgt³⁰. Somit nimmt Komplex II nicht aktiv am Protonentransport teil, ermöglicht durch die Reduktion von Ubichinon jedoch die Übertragung von Elektronen auf Komplex III²⁶. Ubichinon gehört neben Cytochrom C zu den mobilen Substraten, die eine Elektronenübertragung zwischen den einzelnen Komplexen ermöglichen. Ubichinon kann zwei Elektronen durch den Wechsel zwischen oxidiertem Chinon- und reduzierter Hydrochinonform aufnehmen³⁰. Durch Komplex III der Atmungskette (Ubihydrochinon:Cytochrom-C-Oxidoreduktase) wird Ubihydrochinon reoxidiert³⁰. Der Mechanismus von Komplex III wird auch als Q-Zyklus bezeichnet, der erstmals 1975 von Peter Mitchell beschrieben wurde und durch zwei aktive Zentren des Komplexes vermittelt wird^{41,42}. Durch Komplex III der Atmungskette werden die Elektronen von Ubihydrochinon in einem zweiphasigen Prozess auf Cytochrom C übertragen. Das Cytochrom C, ein weiteres mobiles Substrat, trägt eine Häm-Gruppe, dessen zentrales Eisen es ihm ermöglicht, durch Redoxwechsel zwischen Fe^{3+} und Fe^{2+} ein Elektron aufzunehmen und wieder abzugeben. Es dient also der Übertragung eines Elektrons von Komplex III auf Komplex IV der Atmungskette³⁰. Ubichinon hingegen ist es möglich, 2 Elektronen aufzunehmen, weshalb sich der Prozess in zwei Stufen gliedert. Die zwei aktiven Zentren des Komplex III bestehen aus einem Ubihydrochinonoxidationszentrum auf der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Mitochondrienmembran und einem Ubichinonreduktionszentrum auf der Matrixseite. Ein vollständiger Zyklus führt zur Oxidation zweier Ubihydrochinone am Oxidationszentrum und der Reduktion eines Ubichinons an der Reduktionsseite^{43,44}. Während dieses Prozesses werden vier H^+ -Ionen in den Intermembranraum freigesetzt (Abbildung 2), wobei effektiv jedoch nur zwei der vier H^+ -Ionen aus dem Matrixraum über die Membran transportiert werden. Die anderen beiden Protonen werden von Ubihydrochinon in den Intermembranraum abgegeben²⁶.

Der Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom-C-Oxidase) überträgt die Elektronen von zwei Molekülen Cytochrom C auf ein Molekül Sauerstoff und führt somit zu der Bildung von Wasser und dem Transport von 4 Protonen in den Intermembranraum (s. Abbildung 2)³⁰. Die beim Rückfluss der Protonen in die mitochondriale Matrix entstehende protonenmotorische Kraft, wird verwendet, um durch die sogenannte ATP-Synthase den zellulären Energieträger ATP aus ADP und freiem Phosphat zu produzieren³⁰. Dieser auch als oxidative Phosphorylierung bezeichnete Prozess, ist somit maßgeblich für die Energiebereitstellung in eukaryontischen Zellen verantwortlich²⁶. Im Jahr 2000 entstand das Modell der sogenannten Respirasome, die auch als mitochondriale Superkomplexe bezeichnet werden. Demnach sind die Komplexe der Atmungskette nicht zufällig voneinander getrennt auf der inneren Mitochondrien-Membran verteilt, sondern liegen als Superkomplexe vor⁴⁵. So wurde für Mitochondrien aus Schweineherzen beispielsweise ein Superkomplex aus Komplex I, III und IV definiert⁴⁶.

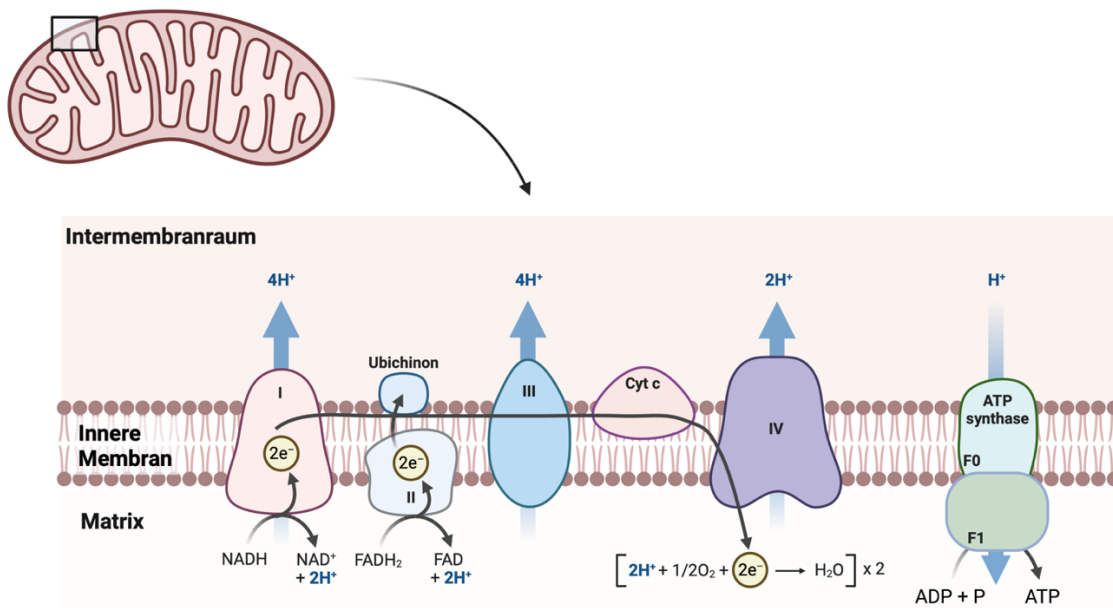


Abbildung 2: **Die mitochondriale Atmungskette**

Mittels einer Reihe von Redoxprozessen entlang der inneren Mitochondrienmembran werden Elektronen (e^-) unter der Bildung von Wasser auf Sauerstoff übertragen. Die Elektronen werden über NADH und $FADH_2$ in Komplex I und II der Atmungskette eingeschleust. Cytochrom C und Ubichinon bilden mobile Substrate, die eine Übertragung von Elektronen zwischen den einzelnen Komplexen ermöglichen. Im Verlauf wird durch Übertragung der Elektronen Sauerstoff zu Wasser reduziert. Am Aufbau des Protonengradienten beteiligt sind die Komplexe I, II und IV, die Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum pumpen. Der elektrochemische Protonengradient wird genutzt, um mithilfe der ATP-Synthase die Bildung von ATP aus ADP und Phosphat zu ermöglichen (BioRender (2020). Modifiziert von „Electron Transport Chain.“, Bezogen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>).

1.2.2 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und oxidativem Stress

Unter physiologischen Bedingungen fließt ein Großteil des Elektronentransfers der Atmungskette in die Produktion von ATP, wobei 1–2 % der Elektronen der Atmungskette entweichen und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen⁹. Zu oxidativem Stress kommt es, wenn die Atmungskette unter pathologischen Bedingungen von der Produktion von ATP entkoppelt wird⁹. Von oxidativem Stress spricht man daher bei einer Überproduktion von ROS, welche die antioxidativen Mechanismen der Zelle überschreiten⁴⁷. ROS bezeichnen eine Gruppe von hochreaktiven Oxidantien, die häufig als Nebenprodukt des mitochondrialen Metabolismus entstehen⁴⁸. Unter dem Begriff ROS werden zum einen Sauerstoffradikale wie $O_2^{\cdot-}$ (Hyperoxidanionen) oder $^{\circ}OH$ (Hydroxyl-Radikale) und zum anderen nichtradikalische Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zusammengefasst⁴⁸. ROS haben, basierend auf ihrer Signalfunktion, zum einen physiologische Aufgaben und induzieren zum anderen bei Überproduktion durch unkontrollierbare oxidative Reaktionen zelluläre Dysfunktionen und

bedingen damit eine Reihe von pathophysiologischen Prozessen ⁴⁹. Als Signalmolekül reagieren ROS mit den Cysteinresten verschiedener Tyrosinphosphatasen ²⁵. Durch die Inaktivierung der Phosphatasen wird die Kinaseaktivität unterschiedlicher Signalwege wie NF- κ B, MAPK oder JNK beeinflusst. So nehmen ROS als Signalmoleküle nicht nur Einfluss auf die Genexpression, sondern dienen unter anderem der Anpassung an hypoxische Zustände und sind am Prozess der Autophagie beteiligt ²⁵. Am besten beschrieben ist die Produktion von ROS in Komplex I und III der Atmungskette ⁵⁰. Das nicht radikalische Wasserstoffperoxid wird spontan oder in Folge einer enzymatischen Reaktion über Superoxiddismutasen (SOD) aus O_2^- gebildet (siehe Abschnitt 1.3.1) ⁴⁸. Normalerweise können die Mengen, die unter physiologischen Bedingungen durch die Elektronenlecks im Rahmen der Atmungskette gebildet werden, durch antioxidative Mechanismen unschädlich gemacht werden (siehe Abschnitt 1.3.1) ⁴⁷. Werden die antioxidativen Mechanismen der Zellkompartimente wie die der Mitochondrien überschritten, kommt es sowohl zu oxidativen Schäden und Mutationen der mtDNA als auch zu Schädigungen von Lipiden und Proteinen ²⁵. So kommt es unter anderem zu verschiedenen posttranslationalen Proteinmodifikationen, die in einer Aggregation, Destabilisierung oder dem Abbau von Proteinen resultieren können ⁵¹. Die mtDNA ist dabei unter anderem aufgrund eingeschränkter Reparatursysteme besonders anfällig für oxidative Schädigungen ³³. ROS können beispielsweise zu Veränderungen der DNA-Basen und zu Strangbrüchen führen und die mtDNA somit in ihrer Stabilität und Struktur beeinflussen ²⁵. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, kommt die klinische Bedeutung von oxidativem Stress bei der Pathophysiologie von verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zum tragen ⁴⁹. Eine vermehrte Produktion von ROS kann unter anderem in Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtet werden ⁴⁷. Eine besondere Rolle spielt der oxidative Stress dabei bei Vorgängen des kardialen Remodelings. So können ROS eine kardiale Hypertrophie induzieren und die Proliferation von Fibroblasten steigern, wodurch es zu einem Umbau mit Veränderungen von Form oder Struktur des Herzens kommt. Diese können zur Abnahme der kardialen Kontraktionsfähigkeit führen ⁴⁷. Auch im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens nach Wiedereröffnung eines stenosierenden Gefäßes (siehe Abschnitt 1.1), kommt es durch eine erhöhte Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten und in Folge zu einer vermehrten Produktion von ROS ⁹. Wie in Abschnitt 1.1 bereits erwähnt, spielt oxidativer Stress bei der Tumorbehandlung mit Doxorubicin aus der Gruppe der Anthrazykline eine zentrale Rolle bei der kardiotoxischen Wirkung des Medikamentes ⁴⁹. Doxorubicin sammelt sich in Mitochondrien an ⁵² und führt zu einer vermehrten Produktion von ROS und zum anderen zu einer verringerten Aktivität antioxidativer Mechanismen wie den SOD (siehe Abschnitt 1.3.1) ⁵³. Eine Erklärung für die vermehrte intramitochondriale Ansammlung und die Entstehung von ROS unter Doxorubicin kann die Bindung an Cardiolipin bieten. Während Cardiolipin als

Membranbestandteil unter physiologischen Bedingungen Proteine der Atmungskette bindet und deren regelrechte Funktion unterstützt, kommt es in Folge einer Bindung mit Doxorubicin zu einer Fehlfunktion dieser Proteine und damit auch der mitochondrialen Funktion. Resultat ist eine vermehrte Bildung von Superoxiden⁵⁴. Oxidativer Stress kann zudem einen apoptotischen Zellverlust auslösen⁵⁵. Apoptose bezeichnet einen regulierten, energieverbrauchenden Prozess des Zelltodes, induziert durch verschiedene Caspasen und Proteasen²⁰. Durch eine Reihe von Signalkaskaden entstehen dabei morphologische und molekulare Veränderungen, die den Zelltod induzieren. Als Ergebnis von unter anderem einer Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung entstehen Membran umhüllte Zell-Fragmente, die anschließend von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert werden können^{20,55}. ROS können über die Aktivierung von ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) zu der Induktion von MAP-Kinasen (*Mitogen-activated protein kinase*) wie JNK (*C-Jun-N-terminale Kinasen*) oder p38 führen und damit zu der Stimulation des Zelltodes durch Apoptose führen⁵⁵. Des Weiteren können ROS über posttranslationale Wechselwirkungen mit proteolytischen Enzymen zu deren Aktivierung führen, die wiederum wichtige Komponenten der Proliferation und Apoptose bilden⁴⁷.

1.3 Zelluläre Strategien zum Schutz eukaryotischer Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, sind Mitochondrien an der Pathophysiologie einer Reihe von kardialen Erkrankungen beteiligt. Durch Elektronenlecks im Rahmen der Atmungskette entstehen immer wieder reaktive Sauerstoffspezies, die das Mitochondrium und die Zellintegrität stören (siehe Abschnitt 1.2.2)⁹. Des Weiteren bilden Mitochondrien nur einen Bruchteil ihrer benötigten Proteine selbst, sodass der Rest der nukleär kodierten Proteine außerhalb der Zellorganelle gebildet und im Rahmen eines streng regulierten Import-Prozesses in das Mitochondrium transportiert werden müssen²⁵. Um die Funktionalität der Zelle zu erhalten, existieren somit eine Reihe von Schutzmechanismen, die versuchen, die Zelle durch antioxidative Mechanismen (siehe Abschnitt 1.3.1) vor einer Überproduktion von ROS oder durch verschiedene stressreaktive Signalwege vor einer Ansammlung fehlgefalteter Proteine zu schützen²⁵. Sowohl die Mitochondrien als auch das Zytosol und das Endoplasmatische Retikulum sind auf die strenge Kontrolle der Proteinfaltung angewiesen, um eine toxische Aggregation von defekten Proteinen zu verhindern. Je nach zellulärem Kompartiment sind verschiedene Mechanismen entstanden, die eine korrekte Faltung von Proteinen überwachen und kontrollieren. Zu diesen protektiven Mechanismen zählen unter anderem die *Heat-Shock-Response* (siehe Abschnitt 1.3.2) oder ein als *Unfolded-Protein-Response* (siehe Abschnitt 1.3.3) bezeichneter Signalweg, spezifisch für das Endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrium²⁵.

1.3.1 Antioxidative Mechanismen als zelluläre Schutzstrategie

Um oxidativen Stress zu vermeiden, existieren in Säugerzellen eine Reihe von antioxidativen Mechanismen zur Neutralisierung von ROS (siehe Abschnitt 1.2.2). Eine grobe Einteilung kann dabei nach enzymatischen und nicht enzymatischen Mechanismen erfolgen. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien zählen Glutathion (GSH), Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (α -Tocopherol). Die beiden antioxidativen Vitamine dienen durch das Abfangen von ROS wie den Hydroxyl-Radikalen ($^{\circ}\text{OH}$) als direkter Mechanismus der ersten Schadensbegrenzung⁴⁷. Glutathion hingegen wirkt antioxidativ durch die Reduktion von ROS. Das Glutathion selbst wird dabei an der Sulfhydrylgruppe (-SH) seines Cysteins oxidiert. Die Regeneration von Glutathion erfolgt im Anschluss durch die Glutathion-Reduktase (GSR)⁵⁶. Zu den enzymatischen antioxidativen Mechanismen zählen unter anderem die sogenannten Superoxiddismutasen (SOD) sowie verschiedene Glutathion-Peroxidasen (GPX), die Katalase (CAT), Peroxiredoxine (PRDX) und Thioredoxin (Trx)⁴⁷.

Eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von mitochondrialen Hyperoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) spielen die Superoxiddismutasen⁵⁸. In Säugern sind die drei verschiedene Formen SOD1, SOD2 und SOD3 näher charakterisiert. Das Homodimer SOD1 befindet sich fast ausschließlich intrazellulär im Zytoplasma, während SOD2, ein Tetramer, auf das Mitochondrium beschränkt ist. SOD3 ist ebenfalls ein Tetramer und befindet sich im Extrazellularraum⁵⁸. Superoxiddismutasen katalysieren die Umwandlung von Hyperoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) (siehe Abbildung 3). Das entstandene Wasserstoffperoxid kann wiederum durch die Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgewandelt und somit unschädlich gemacht werden³⁰.

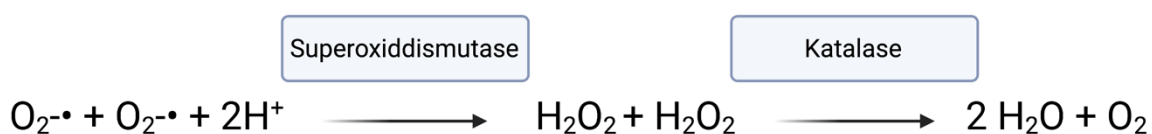


Abbildung 3: **Reaktionen der Superoxiddismutasen und Katalasen**

Superoxiddismutasen katalysieren die Umwandlung von Hyperoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches dann durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt werden kann. (erstellt mit BioRender.com)

Ebenfalls der Gruppe der enzymatischen Antioxidantien angehörig sind die sogenannten Peroxiredoxine (PRDX). Wie auch die Katalasen, sind sie für die Kontrolle der H_2O_2 -Konzentration verantwortlich (siehe Abbildung 4). Die Reaktion führt dabei zur reversiblen Oxidation des Peroxiredoxins. Für die Regeneration entscheidend ist das Thioredoxin, welches zur Reduktion und somit zur Wiederherstellung des Ausgangszustandes des

Peroxiredoxins führt (siehe Abbildung 4) ⁵⁹. Thioredoxine besitzen ein Cysteinzentrum und können über die eigene Oxidation unter Ausbildung von Disulfidbrücken zur Reduktion der Peroxiredoxine führen ⁶⁰.

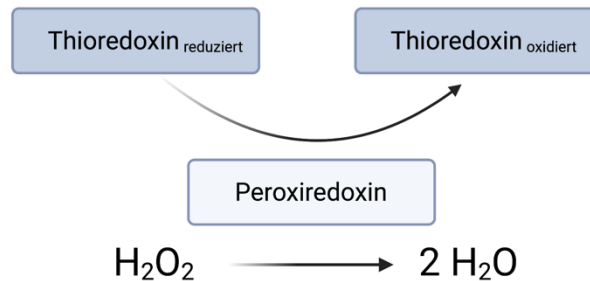


Abbildung 4: **Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O durch Peroxiredoxine**

Über einen nukleophilen Angriff katalysieren Peroxiredoxine die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Zur Wiederherstellung seiner antioxidativen Eigenschaften führt Thioredoxin zur Reduktion des Peroxiredoxin und stellt damit dessen Ausgangszustand wieder her. (erstellt mit BioRender.com)

Ein weiteres enzymatisches Antioxidans ist die sogenannte Hämoxxygenase-1 (HO-1), welche durch Hypoxie, oxidativen Stress oder auch einen Anstieg verschiedener Zytokine induziert wird ⁶¹. Die antioxidativen Eigenschaften von HO-1 entstehen durch seine Aufgabe beim Häm-Abbau. Als Nebenprodukte des Häm-Abbaus entstehen Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid (CO), denen antioxidative und antientzündliche Eigenschaften zugesprochen werden ⁶¹. Durch die entzündungshemmende Wirkung von CO in Kombination mit den antioxidativen Eigenschaften des Bilirubins entstehen zytoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften. An der Regulation der HO-1-Expression sind dabei eine Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 (*nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*) beteiligt ⁶¹.

Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle in der Regulation eines großen Teils der antioxidativen Enzyme einnimmt ⁶². Er reguliert Gene, die ARE-Sequenzen (*antioxidant response elements*) in ihrer Promoterregion enthalten. Dadurch führt Nrf2 zu einer gesteigerten Expression und Synthese des oben genannten Glutathions, einer vermehrten Aktivierung des Peroxiredoxin-Systems und zur Expression von HO-1, SOD1 und der Katalase ⁶². Nrf2 selbst wird durch die Bindung an Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein 1*) im Zytoplasma reguliert. Nrf2 hat unter physiologischen Bedingungen nur eine sehr kurze Halbwertszeit von 10–15 Minuten. Bedingt wird dieser frühzeitige, proteasomale Abbau von Nrf2 durch seine Bindung mit Keap1, das die Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors bewirkt ⁶². Unter oxidativem Stress löst sich Keap1 von Nrf2, sodass dieser in den Zellkern wandern kann und dort die vermehrte Expression antioxidativer Gene bewirkt ⁶³.

1.3.2 Die Hitzeschockantwort und Qualitätskontrolle von Proteinen

Als fester Bestandteil der zellulären Homöostase ist die Aufrechterhaltung der funktionalen Integrität des Proteoms der Mitochondrien und anderer Zellkompartimente essentiell. Um dies zu gewährleisten, unterliegen die mitochondrialen Proteine einer strengen Qualitätskontrolle (*Protein quality control* = PQC) ⁶⁴. Die PQC umfasst Prozesse, die zur Korrektur oder Beseitigung fehlgefalteter Proteine beitragen. Diese regelrechte Proteinhomöostase kann auf unterschiedliche Art und Weise während des Imports oder innerhalb des Mitochondriums gestört werden. Eine Schädigung der Proteine kann dadurch mit deren Konformationsänderung oder Funktionsverlust einhergehen. Zu einer Fehlfaltung der Proteine kann es unter anderem durch einen starken Temperaturanstieg oder durch Belastungsfaktoren wie eine vermehrte Produktion von ROS kommen (siehe Abschnitt 1.2.2). Eine fehlerhafte Faltung von Proteinen führt dann durch hydrophobe Interaktionen zu der vermehrten Bildung zelltoxischer Protein-Aggregate ⁶⁴. Die wichtigsten Elemente bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase sind Chaperone und ATP-abhängige Proteasen ^{30,64}. Proteasen bezeichnen ein Netzwerk an Enzymen, die für den Abbau terminal geschädigter Proteine verantwortlich sind. Dazu werden in einer meist ATP-abhängigen Reaktion abzubauen Proteine in einen, durch die Proteasen gebildeten, ringförmigen Komplex eingeschlossen. Fehlgefaltete Proteine, die nicht neu gefaltet werden können, werden durch eine weitere enzymatische Funktion der Proteasen denaturiert ⁶⁴. Chaperone werden auch als Faltungshelfer bezeichnet. Zu ihren Aufgaben gehören unter anderem das Erkennen und Binden an freigelegte hydrophobe Aminosäure-Segmente fehlgefalteter Proteine und die Faltung neu synthetisierter Proteine ^{30,64}. Neben ihrer Funktion als Faltungshelfer dienen sie auch der Unterstützung intrazellulärer Transportvorgänge und helfen beim Abbau von Proteinen ⁶⁵. Hierbei können Chaperone anhand von Molekulargewicht und Sequenzhomologien in verschiedene Familien eingeteilt werden. Zu ihnen gehören die Heat-Shock-Proteine (HSP) der HSP100-, HSP90-, HSP70- und HSP60-Familie, sowie die kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) ⁶⁶. Zu den beiden wichtigsten mitochondrialen Chaperonen zählen das HSP60 und das HSP70 ⁶⁴. HSP70 kommt in verschiedenen Kompartimenten der Zelle wie dem Zytosol, dem Nucleus, dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien vor. Als Faltungshelfer verhindert die HSP70-Familie die Aggregation von Proteinen, unterstützt eine korrekte Faltung der Proteine und bedingt die Löslichkeit von Proteinaggregaten. Unter physiologischen Bedingungen sind sie an der Faltung neu synthetisierter Proteine beteiligt ⁶⁷. Das mitochondriale Chaperon HSP60 ist durch Faltung von Präproteinen an der Proteinbiogenese innerhalb der Mitochondrien beteiligt ⁶⁴. Die Chaperone sind außerdem die Hauptakteure der sogenannten *Heat-Shock-Response* (Hitzeschockantwort). Hierbei können eine Reihe von Auslösern zellulären Stresses wie zum Beispiel Hitze, oxidativer Stress (siehe Abschnitt 1.2.2) oder Hypoxie die Hitzeschockantwort

auslösen. Der Signalweg umfasst eine Reihe an Genen, die die Zelle unter anderem vor einer durch zellulären Stress ausgelösten Proteinaggregation schützen sollen ⁶⁵. Die Gene, die während der Stressantwort induziert werden, beruhen auf der Aktivität einer Reihe von *Heat-Shock*-Transkriptionsfaktoren (HSF) ⁶⁵. Einer der Hauptakteure bei der Qualitätskontrolle von Proteinen ist HSF1 (*Heat shock factor 1*) ⁶⁸. Unter normalen Bedingungen liegt HSF1 in einem Komplex mit HSP90 und HSP70 im Zytoplasma vor (siehe Abbildung 5). Kommt es zu einer Ansammlung fehlgefalteter Proteine, entlassen HSP90 und HSP70 den HSF1, um ihrer Funktion als Faltungshelfer nachzukommen ⁶⁶. HSF1 trimerisiert, transloziert dann in den Zellkern und kann somit an die sogenannten Heat-Shock-Elements (HSE) in der Promoterregion der Zielgene binden ⁶⁵. HSE beschreiben eine Reihe von DNA-Promoter-Elementen, welche durch kurze 5'-nGAAn-3' Sequenzen charakterisiert sind ⁶⁹. Durch Bildung von Heterotrimeren aktiviert HSF1 die Transkription von Genen, die für die Hitze-Schock-Antwort verantwortlich sind ⁶⁵. Eine Aktivierung von HSF1, als Hauptmediator der Heat-Shock-Response auf transkriptioneller Ebene, erfolgt jedoch auch bei einer mitochondrialen Dysfunktion, bei der HSF1 für die Induktion verschiedener mitochondrialer Chaperone verantwortlich ist ⁷⁰.

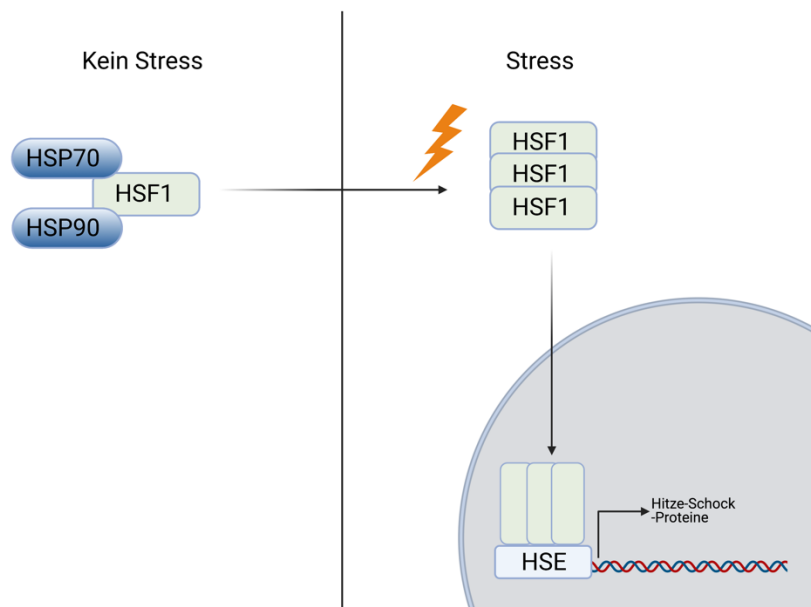


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Hitzeschock-Antwort (Heat Shock Response)

Im Normalzustand liegt HSF1 gebunden an die Chaperone HSP70 und HSP90 im Zytoplasma vor. Kommt es zu zellulärem Stress, dissoziieren HSP70 und HSP90, um mit entstandenen fehlgefalteten Proteinen zu interagieren. Das nun freigelegte HSF1 bildet ein Trimer und gelangt in den Zellkern, in dem es an *Heat-Shock-Elements* (HSE) bindet und zur Transkription verschiedener Hitze-Schock-Proteine führt (erstellt mit BioRender.com).

1.3.3 Die *Integrated-Stress-Response* (ISR) und mitochondriale *Unfolded-Protein-Response* (UPR^{mt})

Eine Ansammlung fehlgefalteter Proteine, die die Kapazität der Protein-Qualitätskontrolle eines Zellkompartiments überschreitet, führt zu zellulärem Stress (*proteotoxic stress*, proteotoxischer Stress). Diese Akkumulation fehlgefalteter Proteine speziell in Mitochondrien kann zu Defekten der Elektronentransportkette (ETC) und der vermehrten Bildung von ROS führen. In Folge kommt es zu einer Dysfunktion der Mitochondrien mit ATP-Mangel und oxidativem Stress ⁷¹. Um die Proteinhomöostase und Funktion der Mitochondrien aufrechtzuerhalten, besitzen eukaryotische Zellen eine zellorganellspezifische, protektive Stressantwort – die mitochondriale *Unfolded-Protein-Response* (UPR^{mt}) ⁷². Im Rahmen der Stressantwort erfolgt die Expression verschiedener im Zellkern kodierter, mitochondrialer Chaperone wie HSP60, HSP10 und Proteasen wie ClpP (siehe Abschnitt 1.3.2). Stressinduzierte Proteine des Zytosols oder des Endoplasmatischen Retikulums bleiben dabei unbeeinflusst. Dies legte die Induktion einer zellorganell-spezifischen, protektiven Stressantwort in Mitochondrien nahe ²⁵.

Die UPR^{mt} beruht dabei auf der Möglichkeit der Kommunikation zwischen Zellkern und Mitochondrium. Zuerst identifiziert wurde die UPR^{mt} als Antwort auf mitochondrialen Stress in Säugern ⁷³. Eine nähere Charakterisierung der molekularen Hintergründe erfolgte anhand von Studien mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ⁷⁴. Studien an *C. elegans* haben dabei gezeigt, dass die UPR^{mt} im Wurm durch den Transkriptionsfaktor ATFS-1 reguliert wird. ATFS-1 trägt eine mitochondriale Zielsequenz (MTS, engl. *mitochondrial targeting sequence*) und eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS, engl. *nuclear localization sequence*) und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Kommunikation zwischen Kern und Mitochondrium ⁷⁵. Unter physiologischen Bedingungen wird ATFS-1 ins Mitochondrium importiert, wo es akkumuliert, um dort anschließend durch die Protease Lon abgebaut zu werden. Im Falle von mitochondrialem Stress ist die Importkapazität der Zellorganelle und somit auch der Import von ATFS-1 vermindert. Akkumuliert es jedoch im Zytosol, wird ATFS-1 in den Zellkern transportiert, wo es im *C. elegans* die Aktivierung einer transkriptionellen Antwort zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion, der UPR^{mt}, bedingt ^{72,76}. In Säugern, in denen die UPR^{mt} erstmals entdeckt wurde, hat sich die *Integrated-Stress-Response* (ISR) als eines der Hauptelemente für die Induktion des Signalweges herauskristallisiert (siehe Abbildung 6) ⁷⁷. Die ISR stellt ein durch verschiedene Kinasen und die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2a (eIF2 α , *eukaryotic translation initiation factor 2A*) aktiviertes Programm als Antwort auf zellulären Stress dar. Zunächst wurde die ISR vor allem im Zusammenhang mit ER-Stress beschrieben, obwohl sie auch als Reaktion auf mitochondrialen Stress aktiviert wird ⁷⁸. Eine im Rahmen von ER-Stress für die Phosphorylierung von eIF2 α verantwortliche Kinase ist hierbei PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) ⁷⁹. PERK gehört neben IRE1,

ATF6 und BiP (*ER chaperone-binding immunoglobulin protein*) zu den Hauptmediatoren der UPR^{er}. Während für PERK jedoch auch eine Funktion bei der Aktivierung der UPR^{mt} gezeigt wurde, scheinen IRE1, ATF6 und BiP spezifisch für den ER-Stress zu sein ²⁵. Neben PERK sind drei weitere Kinasen für die Initiierung der ISR verantwortlich (siehe Abbildung 6) ⁷⁸: Die PKR (*Protein Kinase R*) bei zytosolischer doppelsträngiger RNA, HRI (*heme-regulated inhibitor*) bei Depletion von Häm und GCN2 (*general control nonderepressible 2*), unter anderem aktiviert bei mitochondrialem Stress, Aminosäuredepletion und der Ansammlung von ROS ^{71,80}. Alle Kinasen haben gemein, dass ihre Aktivität mit mitochondrialem Stress in Zusammenhang gebracht werden konnte ⁷⁷. Eine wichtige Schnittstelle zwischen einer mitochondrialen Fehlfunktion und der Aktivierung der zytosolischen ISR als wichtiger Bestandteil der UPR^{mt} konnte an humanen Zellen durch eine Beteiligung des mitochondrialen Proteins DELE1 (*DAP3 binding cell death enhancer 1*) identifiziert werden. Eine Spaltung von DELE1 durch die Protease OMA1 (*OMA1 zinc metalloproteinase*) bedingt die zytosolische Ansammlung von DELE1, wo es über die Bindung an HRI zu dessen Aktivierung führt. Als eine der Kinasen der ISR führt HRI zu der Phosphorylierung von eIF2 α und einer Aktivierung von ISR und UPR^{mt} ^{81–83}.

In Abhängigkeit von der Aktivierung der ISR und der damit im Zusammenhang stehenden Phosphorylierung des eIF2 α stehen die zentralen Komponenten der UPR^{mt}, die Transkriptionsfaktoren ATF4, ATF5 und CHOP (*C/EBP homology protein*) ^{84,85}. Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zu einer vermehrten Translation von mRNAs mit *upstream Open Reading Frames* (uORFs) in der 5' untranslatierten Region (UTR) – darunter ATF4, ATF5 und CHOP (siehe Abbildung 6) ⁷². uORFs dienen der Regulation der Translation und bewirken in der Regel eine Inhibition der nachgeschalteten, kodierenden Bereiche. Insbesondere als Reaktion auf zellulären Stress können die uORFs jedoch auch translationsfördernd wirken. Während bestimmte mRNAs als Reaktion auf zellulären Stress bei Phosphorylierung von eIF2 α bevorzugt translatiert werden, kommt es global zu einer reduzierten Proteinsynthese. Dadurch sollen die Ressourcen der Zelle geschont werden und die Translation auf mRNAs umgestellt werden, die der Anpassung der Zelle an Stress dienen ⁸⁶.

Der Transkriptionsfaktor ATF5 wurde dabei in Säugern als Analogon zu ATFS-1 im *C. elegans* identifiziert ⁸⁷. Reguliert wird ATF5 wie auch ATFS-1 über mitochondriale Zielsequenzen. Kommt es aufgrund einer mitochondrialen Dysfunktion zu einer verminderten Importkapazität der Zellorganelle, führt dies zu einer Akkumulation der Transkriptionsfaktoren im Zytosol und der vermehrten Lokalisation in den Zellkern ^{87,88}. Die Expression von ATF5 führt im ATFS-1-defizienten *C. elegans* ebenfalls zur Aktivierung der UPR^{mt}, fördert bei mitochondrialer Dysfunktion das Zellwachstum und induziert verschiedene Proteasen und Chaperone ⁸⁷. Neben seiner Schlüsselrolle im Rahmen der UPR^{mt} wird ATF5 auch eine antiapoptotische

Funktion durch die Induktion des Proteins BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) zugeschrieben⁸⁹. Neben ATF5 wurden zwei weitere, für die Aktivierung der UPR^{mt} bedeutende Transkriptionsfaktoren identifiziert, ATF4 und CHOP⁷². CHOP war einer der ersten Faktoren, der als Regulator der UPR^{mt} identifiziert wurde. Es zeigte sich, dass CHOP bestimmte Bindungsstellen in Promoterregionen mitochondrialer Chaperone und Proteasen wie HSP60 und CLpP besitzt^{90,91}. Neben seiner Induktion über die *Integrated-Stress-Response* kommt es zu einer vermehrten Expression von CHOP über den Transkriptionsfaktor c-Jun als Reaktion auf mitochondrialen Stress. Nach Phosphorylierung von c-Jun durch die stressregulierte Kinase JNK2 (c-Jun N-terminal kinase) bindet der Transkriptionsfaktor an das *AP-1-Element* (*activator protein-1*) im CHOP Promoter, wodurch die Transkription von CHOP induziert wird⁹². Die daraufhin folgende Expression von CHOP führt zur transkriptionellen Induktion entsprechender Ziel-Gene der UPR^{mt}²⁵. CHOP kann als Reaktion auf zellulären Stress bei Hypoxie, ER-Stress, DNA-Schäden oder anderen Stressfaktoren aktiviert werden. Als Reaktion auf die vermehrte Aktivität von CHOP kann es zum einen zur Apoptose der Zellen kommen. Zum anderen kann der Transkriptionsfaktor aber auch das Überleben und Wachstum der Zellen fördern⁹³. ATF4 konnte, neben seiner ursprünglich beschriebenen Rolle bei ER-Stress, auch als einer der Schlüsselfaktoren bei mitochondrialem Stress identifiziert werden. Durch die transkriptionelle Induktion zytoprotektiver Gene aktiviert ATF4 die ISR und beeinflusst damit den zellulären Metabolismus⁹⁴.

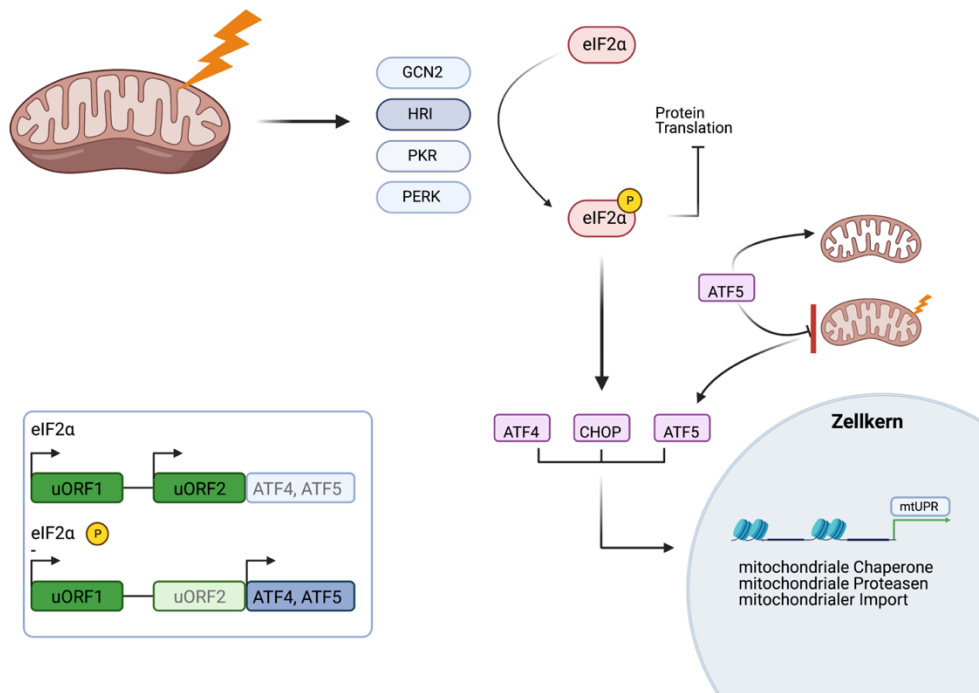


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Integrated-Stress-Response und ihrer Verbindung zu der mitochondrialen Unfolded-Protein-Response

Die durch verschiedene Kinasen bedingte Phosphorylierung von eIF2α führt zu einer global verminderten Proteinsynthese bei gleichzeitig vermehrter Translation von mRNAs mit *Upstream Open Reading Frames* (uORFs) in der 5' untranslatierten Region (UTR), darunter ATF4, ATF5 und CHOP. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren führt im Zellkern zur vermehrten Expression verschiedener Chaperone und Proteasen und beeinflusst den mitochondrialen Protein-Import. ATF5 wird unter anderem durch den mitochondrialen Import beeinflusst. Wird es unter Normalbedingungen ins Mitochondrium transportiert, erfolgt unter zellulärem Stress ein verminderter Import des Transkriptionsfaktors. Es kommt zur Akkumulation von ATF5 im Zytosol, was zu einem vermehrten Import in den Zellkern führt. (Darstellung angelehnt an: Melber and Haynes, 2018, erstellt mit BioRender.com)

Die mitochondriale Stressreaktion und der Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren zueinander bleibt in vielen Teilen jedoch noch unverstanden⁷².

Kommt es zu einer mitochondrialen Funktionsstörung, ist unter anderem die Interaktion zwischen CHOP und ATF4 von wesentlicher Bedeutung. Eine durch Überexpression von ATF4 vermittelte dauerhafte Aktivierung der ISR kann zu einer Dysfunktion der Atmungskette mit resultierendem Energiemangel und Zelltod führen und somit kardiotoxisch wirken⁹³. CHOP hingegen verhindert die Überaktivität von ATF4 und ist somit ein wichtiger Faktor in der Regulation und Feinabstimmung der ISR. Kontrolliert wird die ATF4-Aktivität durch die Dimerisierung von CHOP mit dem Transkriptionsfaktor C/EBPβ. Fehlt CHOP, so kommt es zu der Dimerisierung von C/EBPβ mit ATF4, resultierend in einer weiteren, überschießenden Induktion der ISR⁹³.

Ein Ende der zellulären Stressreaktion durch p-eIF2 α erfolgt unter anderem durch die Aktivierung von GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*). GADD34 bedingt die Dephosphorylierung von eIF2 α . Dadurch wird ein negativer Feedback-Mechanismus gebildet, der die Inhibierung der globalen Translation durch das phosphorylierte eIF2 α stoppt und somit die Zellfunktion schützt⁸⁰.

1.4 Zelluläre Stressresistenz während der kardialen Entwicklung

Das Herz ist bei Säugetieren das erste funktionale Organ während der embryonalen Entwicklung⁹⁵. Hierbei haben embryonale Kardiomyozyten eine hohe Proliferationskapazität, wodurch ein Gewebeschaden und Zellverlust durch Proliferation der verbleibenden Zellen ausgeglichen und regeneriert werden kann⁹⁶. Während der intrauterinen Entwicklungsstadien benötigen Kardiomyozyten, trotz ihrer schnellen Proliferation, verhältnismäßig wenig ATP, das durch Glykolyse bereitgestellt werden kann⁹⁵. Durch die starke Abnahme der Proliferationskapazität der Kardiomyozyten postnatal, wird das Wachstum des adulten Herzens nahezu vollständig durch eine Größenzunahme (Hypertrophie) der bestehenden Kardiomyozyten bedingt⁹⁶. In humanen Kardiomyozyten ist dabei ein Zellumsatz von weniger als 1 % pro Jahr beschrieben⁹⁷. Dieser postnatale Verlust der Proliferationskapazität geht auch mit einem Verlust der myokardialen Regenerationsfähigkeit nach Gewebeschäden wie bei einem akuten Myokardinfarkt einher⁹⁶. Ein herzspezifischer Knockout der Holoocytochrom C Synthase (*Hccs*) in der Maus konnte eine hohe Regenerationskapazität des embryonalen Herzens und gleichzeitig eine hohe Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber einer mitochondrialen Dysfunktion zeigen⁹⁸. Die Holoocytochrom C Synthase katalysiert die kovalente Bindung von Häm und Cytochrom C bzw. C1. Das Enzym bindet Häm und das Vorläuferprotein Apocytochrom C und entlässt (Holo-)Cytochrom C und C1 als essentielle Bestandteile des Komplex III der Atmungskette⁹⁹. Die Analyse verschiedener Stadien der embryonalen Entwicklung heterozygoter Weibchen zeigte, bedingt durch eine deutliche Reduktion des *Hccs* und Cytochrom C-Proteins, die zu erwartende, signifikante Reduktion der Aktivität von Komplex III im Herzen⁹⁸. Weibliche Säugetiere haben zwei X-Chromosome pro Zelle, wohingegen männliche Säuger ein X- und ein Y-Chromosom besitzen. Um eine doppelte Menge an Genprodukten weiblicher Säuger zu vermeiden, kommt es in jeder Zelle zu einer zufälligen Inaktivierung entweder des paternalen oder des maternalen X-Chromosoms¹⁰⁰. Die Holoocytochrom C Synthase ist X-chromosomal lokalisiert, sodass es zu einer solchen zufälligen x-chromosomal Inaktivierung kommt, aus der die Entstehung eines Gewebemosaiks resultiert. Bei heterozygoten *Hccs*-Knockout-Weibchen besteht somit in der Embryonalphase nach der Hälfte der intrauterinen Entwicklung (Tag 10,5 bei der Maus) ein 50:50-Verhältnis gesunder Kardiomyozyten zu Kardiomyozyten mit mitochondrialer Dysfunktion im Herzen. Für hemizygoten Männchen und homozygote Weibchen ist der

herzspezifische *Hccs*-Knockout bereits intrauterin letal. Heterozygote Weibchen überleben trotz des myokardialen Gewebemosaiks bis ins Erwachsenenalter und zeigen zu allen Zeitpunkten nur geringe histologische Veränderungen der kardialen Morphologie oder Gewebemöostase. Während der Anteil an HCCS-defizienten Kardiomyozyten in der Mitte der intrauterinen Entwicklung (Tag 10,5) in etwa 50 % betrug, reduzierte dieser sich im Laufe der nachfolgenden Gestationsperiode bis zur Geburt auf 10 %. 90 % des Myokards im Herzen neugeborener *Hccs*-Knockout-Weibchen werden somit durch die normale Kardiomyozyten-Population gebildet. Diese relative Reduktion HCCS-defizienter Zellen beruhte dabei auf einer kompensatorischen Hyper-Proliferation der gesunden Herzmuskelzellen, die eine deutlich höhere Teilungsrates im Vergleich zu einem Wildtyp-Herzen desselben Entwicklungsstadiums zeigen. Vermehrte Apoptose der HCCS-defizienten Zellen zeigte sich keine. Die defekten Zellen blieben daher auch im postnatalen und adulten Herzen heterozygoter *Hccs*-Knockout-Weibchen noch nachweisbar ⁹⁸. Weiterführende Untersuchungen von HCCS-defizienten Kardiomyozyten im embryonalen Herzen zeigten eine Induktion verschiedener Stress-induzierter Signalwege. Es zeigten sich eine gesteigerte Aktivität von Signalwegen wie der ISR und der UPR^{mt}, die der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase dienen, sowie eine Induktion antioxidativer Mechanismen und Mechanismen der Regulation bzw. der Inhibierung des programmierten Zelltods (Apoptose). Nicht nachweisbar dagegen war ein Anstieg spezifischer ER-Stress-Marker ¹⁰¹. Diese in-vivo-Daten mit Hilfe des herzspezifischen *Hccs*-Knockouts in der Maus legen eine hohe Stressresistenz embryonaler Kardiomyozyten unter mitochondrialer Dysfunktion nahe. Gegebenenfalls auf Grundlage verschiedener protektiver Signalwege und Mechanismen, deren vermehrte Aktivität bei HCCS-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnten, überleben die embryonalen Kardiomyozyten so bis ins Erwachsenenalter ¹⁰¹. Die genauere Charakterisierung der zellulären Stressantwort undifferenzierter Kardiomyozyten im Gegensatz zu differenzierten Kardiomyozyten in vitro erfolgte in einer nachfolgenden Studie der Arbeitsgruppe anhand kardialer H9c2- und HL-1-Zelllinien ¹⁰². Während H9c2-Zellen als undifferenzierte Kardiomyoblasten der Ratte embryonalen Kardiomyozyten ähneln, entsprechen HL-1-Zellen (adulte Vorhof-Kardiomyozyten der Maus) in ihren Eigenschaften eher den adulten Kardiomyozyten ^{103,104}. Die Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion erfolgte dabei mithilfe von Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette. Wie auch der *Hccs*-Knockout greift Antimycin A an Komplex III der Atmungskette an und inhibiert den Elektronentransport zwischen Komplex III und IV. Die Behandlung mit Antimycin A zeigte nur einen geringen Einfluss auf das Überleben von H9c2-Zellen ¹⁰². Während die Proliferation von H9c2-Zellen durch Antimycin A nicht beeinträchtigt war, induzierte die Komplex-III-Inhibition in einem geringen Ausmaß einen Caspase-unabhängigen Zelltod. Im Gegensatz dazu führte Rotenon, ein Inhibitor von Komplex I der Atmungskette, nahezu zu einem kompletten Zellzyklus-Arrest und der Induktion einer

Caspase-vermittelten Apoptose¹⁰². In beiden Fällen zeigte sich ein deutlicher und vergleichbarer Anstieg von ROS, der bei Behandlung mit Antimycin A im Gegensatz zu Rotenon jedoch deutlich besser toleriert wurde. Dabei zeigten sich verschiedene antioxidative Enzyme und Proteine wie SOD2, HO-1 und PRDX3 induziert¹⁰². Wie auch die in-vivo-Studien mittels des *Hccs*-Knockouts, zeigten mit Antimycin A und Rotenon behandelte H9c2-Zellen eine Induktion zellulärer, stress-assoziiertes Signalwege wie der ISR und der UPR^{mt}¹⁰². Western-Blot-Analysen zeigten die Induktion klassischer Marker wie ATF4 und dessen Zielgen *GADD34*. Ebenfalls konnte ein Anstieg des Transkriptionsfaktors CHOP nachgewiesen werden, der Bestandteil von ISR und auch UPR^{mt} ist (siehe Abschnitt 1.3.3). Die differenzierten HL-1-Zellen wiesen eine deutlich geringere Toleranz auf gegenüber Antimycin A, nachweisbar in Form eines Zellzyklus-Arrests und Zelluntergangs¹⁰². Dabei zeigten sie auch Unterschiede in der Aktivität der stressreaktiven Signalwege. ATF4 und CHOP wurden in HL-1-Zellen wie auch in H9c2-Zellen als Reaktion auf eine Antimycin-A-Behandlung induziert. Andere an der UPR^{mt} beteiligte Proteine wie HSP60, ClpP oder das an der Hitzeschockantwort beteiligte HSF1 wurden in mit DMSO behandelten HL-1-Zellen im Vergleich zu einer Antimycin-A-Behandlung nicht verstärkt exprimiert. Unterschiede wurden jedoch im Vergleich mit H9c2-Zellen bezüglich der Basisexpression von ATF4 und CHOP sichtbar, die in HL-1-Zellen deutlich geringer war. Weitere Unterschiede in der Basisexpression zeigte sich in HL-1 Zellen insbesondere in der verstärkten Expression antioxidativer Proteine und Enzyme wie SOD2, SOD1 und PRDX3. Während bei Betrachtung von ISR und UPR^{mt} keine Unterschiede in der Phosphorylierung von eIF2 α nachgewiesen wurden, kam es außerdem zu einer erhöhten Expression von *GADD34* und der mitochondrialen Protease ClpP. Auch HSF1 und die Chaperone HSP70 und HSP60 zeigen eine vermehrte Basisexpression in HL-1-Zellen im Vergleich zu H9c2-Zellen. Die Daten belegen damit Unterschiede nicht nur in Bezug auf das Überleben von HL-1-Zellen im Vergleich zu H9c2-Zellen, sondern auch in Bezug auf die Stressreaktion bei Behandlung mit Antimycin A. Wesentliche Unterschiede zeigten sich außerdem insbesondere bei der Basisexpression verschiedener antioxidativer Mechanismen, sowie Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase wie der ISR/ UPR^{mt}¹⁰². Neben derzeit gängigen therapeutischen Strategien bietet auch das Konzept der Kardioprotektion Wege zur Reduktion der hohen Hospitalisierungs- und Mortalitätsraten, die durch kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen. Hierbei werden unter dem Begriff Kardioprotektion eine Reihe von Maßnahmen, Eingriffen und Interventionen verstanden, die Schäden an der Herzmuskulatur mindern oder verhindern und somit zum Erhalt einer regelrechten, kardialen Funktion beitragen. In der Definition mit inbegriffen sind somit sowohl therapeutische Strategien kardialer Erkrankungen als auch physiologische Kompensationsmechanismen und Anpassungsvorgänge des Herzens, die zu dessen Erhalt beisteuern¹⁰⁵. Im klinischen Alltag verfolgen kardioprotektive Ansätze in der Regel das Ziel,

pharmakologisch oder durch Interventionen eine Aktivierung oder Anregung protektiver endogener Mechanismen zu bewirken. Viele Ansätze für eine medikamentöse Kardioprotektion blieben bisher jedoch ohne Erfolg, sodass ein genaueres Verständnis der möglichen kardioprotektiven Signalwege erforderlich ist ¹⁰⁶. Als wichtiger Bestandteil der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen stellen Mitochondrien dabei einen wichtigen Ansatzpunkt solcher Strategien dar ¹⁰⁶. Neben kardioprotektiven Ansätzen im adulten Herzen ergibt sich zudem die Frage, inwieweit die hohe Stresstoleranz und Plastizität der embryonalen Kardiomyozyten einen Einfluss auf die pränatale Herzentwicklung haben ¹⁰⁷. Von Bedeutung sind dabei während der intrauterinen Entwicklung unter anderem die Nutrition, die Sauerstoffversorgung sowie maternale und fetale Hormone ¹⁰⁸.

Der Einfluss der sich ständig ändernden intrauterinen Bedingungen beschränkt sich dabei nicht nur auf die Entwicklung des Kindes im Uterus, sondern beeinflusst auch das Risiko für die Entwicklung verschiedener Erkrankungen im Erwachsenenalter, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen und Risikofaktoren wie Hypertension, Diabetes mellitus Typ 2 und koronare Herzerkrankung ¹⁰⁸. Beispielsweise führt eine chronische Hypoxie, wie sie unter anderem bei Gestationsdiabetes, Präeklampsie oder entzündlichen Erkrankungen vorkommt, in bestimmten Perioden der kardialen Entwicklung zur Apoptose der Kardiomyozyten. Dies kann nicht nur einen direkten Einfluss auf das Herz haben, sondern auch im Erwachsenenalter zu einer geringeren Widerstandsfähigkeit gegenüber Ischämien des Myokards führen ¹⁰⁹.

2. Ziele der Arbeit

Mit zunehmendem Alter kommt es in Säugerzellen zur Akkumulation mitochondrialer Mutationen⁹⁵. Eine Einschränkung der mitochondrialen Funktion, die unter anderem mit einem Mangel an ATP und der gesteigerten Bildung von ROS einhergeht¹¹⁰, kann in den Kardiomyozyten zu einer kontraktile Dysfunktion sowie apoptotischem oder nekrotischem Zelltod führen¹¹¹. Derartige Zellverluste können durch eine lediglich eingeschränkte Regenerationsfähigkeit im adulten Herzen nicht kompensiert werden, was in kardialen Erkrankungen und Herzversagen resultiert (siehe Abschnitt 1.4)⁹⁶. Trotz vieler Untersuchungen zum Thema Kardioprotektion, ist die Anwendung im klinischen Alltag bisher erfolglos¹¹². Um kardioprotektive Therapie-Ansätze zu etablieren, ist ein näheres Verständnis der molekularen Mechanismen erforderlich, die über das Ausmaß der Stresstoleranz und damit das Überleben der Kardiomyozyten entscheiden. Als zentrale Komponente zellulärer Stressreaktionen könnten Mitochondrien ein vielversprechendes Ziel solcher Strategien sein. Einen möglichen Ansatz kann dabei die hohe Stress-Toleranz der embryonalen Kardiomyozyten bieten, die im Rahmen des *Hccs*-Knockout-Modells und durch die in-vitro-Daten in kardialen Zelllinien gezeigt werden konnten (siehe Abschnitt 1.4).

In vivo-Versuche mit Hilfe des *Hccs*-Knockout-Modells in der Maus zeigten eine hohe Resistenz gegenüber einer metabolischen Dysfunktion durch eine mitochondriale Funktionsstörung (siehe Abschnitt 1.4). Dabei kam es zu der Aktivierung verschiedener zellulärer Schutzmechanismen als antioxidativer Schutz und zum Erhalt der Proteinhomöostase¹⁰¹.

In-vitro-Versuche in kardialen Zelllinien zeigten, dass H9c2-Zellen eine mitochondriale Dysfunktion bei der Inhibierung des Komplex III besser tolerieren als HL-1-Zellen¹⁰². H9c2-Zellen ähneln dabei als undifferenzierte Myoblasten embryonalen Kardiomyozyten, während HL-1-Zellen phänotypische Charakteristika adulter Kardiomyozyten besitzen. Bei Letzteren kam es hingegen infolge einer mitochondrialen Dysfunktion zu massivem Zelluntergang.

Auch wenn H9c2-Zellen viele phänotypische Eigenschaften embryonaler Kardiomyozyten besitzen, ist die Übertragbarkeit auf primäre Kardiomyozyten dennoch begrenzt. Die dem ventrikulären Rattenherzen entsprungenen Zellen, weisen verglichen zu primären Kardiomyozyten einige Unterschiede auf. Die Eigenschaften der H9c2-Zellen entsprechen in Morphologie und Genexpression, insbesondere bei häufiger Passage, zunehmend denen der Skelettmuskulatur. Zudem haben H9c2-Zellen ihre Kontraktilität im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten verloren, was Auswirkungen auf den zellulären Metabolismus haben kann. H9c2-Zellen weisen weder *gap junctions* auf, noch zeigen sich Caveolae, T-Tubuli oder Mikrofibrillen mit einer organisierten Sarkomerstruktur, welche typische Eigenschaften primärer Kardiomyozyten darstellen¹⁰⁴. Diese Einschränkungen und Unterschiede müssen bei der Interpretation von Daten aus H9c2-Zellen berücksichtigt werden. Eine weitere häufig

verwendete Zelllinie sind die immortalisierten und spontan kontrahierenden HL-1-Zellen aus einem atrialen Tumor der Maus und aufgrund dessen bereits nicht direkt mit ventrikulären Kardiomyozyten vergleichbar. HL-1-Zellen hingegen entsprechen phänotypisch eher adulten Kardiomyozyten und sind aufgrund der gentechnischen Veränderung zu einer ständigen Proliferation in der Lage^{103,113}. Adulte Kardiomyozyten hingegen proliferieren nicht, da dieser ‚proliferative Stress‘ die Reaktion der HL-1-Zellen auf eine mitochondriale Dysfunktion verändern könnte. Des Weiteren kann Beta Tubulin II, vermutlich aufgrund ihres Ursprungs aus einem kardialen Tumor, in HL-1-Zellen nicht nachgewiesen werden. Ein Fehlen des zytoskelettalen Proteins, welches für die mitochondriale Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle relevant ist, kann zu einem abweichenden Verhalten in der Regulation der mitochondrialen Atmung führen¹¹⁴. Die Untersuchungen legen nahe, dass embryonale Kardiomyozyten über protektive Mechanismen verfügen, die bei fortschreitender Differenzierung der Zellen verloren gehen und dadurch zu einer verminderten Stresstoleranz adulter Kardiomyozyten führen. Nichtsdestotrotz bleibt das Problem der Übertragbarkeit bisheriger Versuche an Zelllinien, die sich in vielen Punkten von Primärzellen unterscheiden, bestehen¹¹⁵.

Diesem Projekt liegt folgende Hypothese zugrunde:

- 1.) Embryonale Kardiomyozyten besitzen im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten eine hohe Stresstoleranz gegenüber mitochondrialem und oxidativem Stress.
- 2.) Die unterschiedliche Reaktion auf Stress beruht dabei auf unterschiedlichen zellulären Schutzmechanismen, die in terminal differenzierten Herzmuskelzellen verloren gehen.

Basierend darauf sollen unter anderem die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1.) Gibt es signifikante Unterschiede in Hinblick auf das Zellüberleben primärer embryonaler und adulter Kardiomyozyten nach Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion?
- 2.) Welche molekularbiologischen Mechanismen könnten für mögliche Unterschiede verantwortlich sein?

Ziel des Projektes ist es, die Stressantwort und den Zelltod in isolierten, kultivierten primären embryonalen und adulten Kardiomyozyten der Maus zu untersuchen.

Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, erfolgen nach der Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion durch Inhibitoren der Atmungskette Untersuchungen hinsichtlich Zellmorphologie und -überleben, Kontraktilität, der Produktion von ROS und molekularen Stressantworten. Ein besonderes Augenmerk wird dabei, basierend auf vorausgegangenen Untersuchungen, auf die Untersuchung der UPR^{mt} und ihrer Downstream-Targets wie ATF4 und CHOP gelegt. Neben der UPR^{mt} werden zudem die *Heat-Shock-Response* und die antioxidativen Mechanismen zur Neutralisierung reaktiver Sauerstoffe untersucht.

Eine genauere Charakterisierung der Unterschiede von zellprotektiven Mechanismen zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten könnte therapeutische Angriffspunkte für eine verbesserte Stresstoleranz adulter Zellen bieten. Eine Reaktivierung solcher protektiven, embryonalen Mechanismen könnte als langfristiges Ziel das Überleben adulter Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen verbessern und somit die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen verhindern oder deren Verlauf verbessern. Die erworbenen Erkenntnisse bieten zudem einen Einstieg in die Frage, welchen Einfluss die hohe Stresstoleranz und Plastizität der embryonalen Kardiomyozyten auf die pränatale Herzentwicklung und die Entstehung von kindlichen Herzerkrankungen oder angeborenen Herzfehlern haben. So könnte die hohe Stressresistenz des embryonalen Herzens erforderlich sein, um sich an wechselnde intrauterine Bedingungen anzupassen und so eine regelrechte kardiale Entwicklung zu ermöglichen. Dementsprechend könnten bestimmte pathologische Bedingungen bei einer Überschreitung der zellulären Stressresistenz zu der Entwicklung kindlicher Herzerkrankungen führen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen und Chemikalien

Tabelle 1: Substanzen und Chemikalien

Substanzen/ Chemikalien	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid, 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua Spüllösung	B. Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α -D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin, 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCL), 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES (CCT-Medium)	Roche, Rotkreuz, Schweiz
KCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Luminol 97%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol, >99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgSO ₄ (7H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ziegenserum (<i>Normal-Goat-Serum</i> , NGS)	Jackson ImmunoResearch USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roche, Mannheim
Natrium dodecyl sulfate (SDS), 99,5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethanchlorid (Tris-HCL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X® 100	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.2 Substanzen der Zellkultur

Tabelle 2: Substanzen der Zellkultur

Substanzen	Hersteller
Antimycin A (Kat.-Nr.: A8674)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Creatin (Kat.-Nr.: C3630)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Carnitin (Kat.-Nr.: C9500)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl ₂ -Dihydrat (Kat.-Nr.: C5670)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase Type 2 (Kat.-Nr.: LS004177)	Worthington, Kalifornien, USA
Cytosin-Arabinofuranosid (ARA-C) (Kat.- Nr.: C1768)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligomycin (Kat. Nr.: O4876)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,05% Trypsin-EDTA (Kat.-Nr.: 23500)	Gibco life technologies, USA
Taurin (Kat.-Nr.: T0625)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau-Lösung, 0,4% (Kat.-Nr.: 15250061)	Gibco life technologies, USA
Rotenon (Kat.-Nr.: R8875)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM Non-essential Amino Acid Solution (x100) (Kat.-Nr.: M7145)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM (Egle's w/HBSS) (Kat. Nr.: BE12- 127F)	Lonza Group, Basel, Schweiz
Na-Pyruvat (Kat.-Nr.: P5280)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Laminin (Kat.-Nr.: L2020)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin (Kat.-Nr.: G7513)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
B&S Pen-Strep-Mix (BS.A 2213)	Bio&Sell GmbH, Feucht
Penicillin-Streptomycin (Kat.-Nr.: 15070- 063)	Gibco life technologies, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Kat.-Nr.: 14190)	Gibco life technologies, USA

PBS Tabletten (Kat.-Nr.: 18912-014)	Gibco life technologies, USA
Dulbecco's Modified Eagle's medium – high Glucose (DMEM) (Kat.-Nr.: D6429)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) (Kat.-Nr.: A3672)	PanReac AppliChem, ITW Reagents
Fetal Bovine Serum (FBS) (Kat.-Nr.: F7524)	Sigma Aldrich, Steinheim

3.1.3 Medien der Zellkultur

Tabelle 3: Medien der Zellkultur

H9C2-Zellen		
Zellkulturmedium	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
	Fetales Kälberserum (FBS)	10% (v/v)
	In DMEM	
Adulte Kardiomyozyten		
Ausplattiermedium	CaCl ₂ -Dihydrat	2,5 mmol/L
	NaCL	118 mmol/L
	Na-Pyruvat	1,9 mmol/L
	Glukose monohydrat D+	5 mmol/L
	Hepes	10 mmol/L
	MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,8 mmol/L
	KCL	4,7 mmol/L
	KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/L
Perfusionsmedium	NaCL	100 mmol/L
	Glukose monohydrat D+	10 mmol/L
	Hepes	25 mmol/L
	MgSO ₄ (7H ₂ O)	1,2 mmol/L
	KCL	2,5 mmol/L
	KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/L
Embryonale Kardiomyozyten		
Kulturmedium	FBS	10% (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
	Nicht-essentielle Aminosäuren	0,09% (v/v)
	In DMEM	

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Western Blot		
10% APS	APS in H ₂ O	10% (w/v)
5% BSA	BSA In 1x TBST-T	5% (w/v)
ECL Lösung A	Cumarinsäure Luminol In 0,1M Tris-HCL pH 8,8	0,4mM 2,5mM
ECL Lösung B	H ₂ O ₂ (30%) In 0,1M Tris-HCL pH 8,8	0,018% (v/v)
5x SDS-Probenpuffer	Tris/HCl (pH 6,8) Glycerol (87%) SDS β-Mercaptoethanol Bromphenolblau in 10ml H ₂ O	50mM 43,5% (v/v) 3% (w/v) 3% (v/v) 0,003% (w/v)
5% Milch	Milchpulver In 1x TBS-T	5% (w/v)
10% SDS	SDS in ddH ₂ O	10% (w/v)
SDS-Laufpuffer	Tris Base Glycin SDS in ddH ₂ O	25mM 192mM 0,1% (w/v)
<i>Stripping</i> -Puffer	Tris-HCL pH 6,8 SDS β-Mercaptoethanol in 100ml ddH ₂ O	62,5 mM 2% (w/v) 0,7% (v/v)
1xTBS	Tris NaCl in ddH ₂ O (pH7,6)	50mM 150mM
1x TBS-T	Tween-20	0,1% (v/v)

	In 1x TBS	
Transferpuffer (Western Blot)	Tris Glycin Methanol In ddH ₂ O	48mM 39mM 20% (v/v)
Tris-HCL pH 6,8/8,8	Tris-HCl In ddH ₂ O, Einstellung des pH 6,8/8,8 mit HCL	1M
Immunfluoreszenz		
Antikörperlösung	BSA Triton-X-100 Tween-20 In 1x TBS	1% (w/v) 0,1% (v/v) 0,05% (v/v)
Blocking-Lösung	NGS In Antikörperlösung	5% (v/v)
4% PFA	PFA In 1x PBS	4% (w/v)
LDH-Assay (Tabelle 8)		
LDH <i>Reaction</i> <i>Solution</i>	NAD ⁺ Milchsäure INT Rekonstituierte Diaphorase In 9,6ml <i>Assay Buffer</i>	1% (v/v) 1% (v/v) 1% (v/v) 1% (v/v)

3.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Geräte	Hersteller
Airflow Controller AC3	Waldner, Wangen
Axio Observer Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Kamera AxioCam 503 mono	
Kamera AxioCam 305 color	
Beleuchtungseinrichtung HXP 120 V	
N-Achroplan 10x/0,25 Ph1 M27	
LD A-Plan 20x/0,35 Ph1	
Plan-Apochromat 20x/0.8 M27	
N-Achroplan 40x/0,65 M27	
	Sanyo, Moriguchi

Zellkultur- Brutschrank Sanyo MCO-20AIC CO ₂ Fusion Solo S Imaging System FiveEasy pH-Meter F20 Gefrierschrank GSS3201/56 (-20°C) HERAFreeze HFU700TV (Gefrierschrank - 80°C) Inkubator BD 115 Integra Pipetboy 2 Kühlschrank RIU6092AW (Lagerung Objektträger Immunfluoreszenzen) Kühlschrank iQ300 (Proteinanalysen, Western Blot) Langendorff-Apparatur Safe Aspiration Station gentleMacs™ Octo Dissociater with Heaters (#130-096-427) IKA® Rocker 2D digital (Wippschüttler) IKA® MS 3 basic (Kleinschüttler) NanoPhotometer® NP80 Präzisionswaage PCB 3500-2 Pipetus® Pioneer Feinwaage Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000, 5000ul) Powerpac™ Basic Mikro 22R, Tisch-Zentrifuge Mini Protean® Tetra Cell System Magnetrührer MR Hei-Standard ThermoMixer C ThermoMixer F1.5	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich Mettler Toledo, Columbus, USA Robert Bosch GmbH, München, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA Fa. Binder GmbH, Tuttlingen Integra Biosciences, Zizers, Schweiz Gorenje, Velenje, Slowenien BSH Hausgeräte GmbH, München, Deutschland Eigenanfertigung in der Glasbläserei des Institutes für Anorganische und analytische Chemie, Gießen, Deutschland Gilson, Middleton, USA Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach IKA, Staufen, Deutschland IKA, Staufen, Deutschland IMPLEN, Westlake Village, USA Kern & Sohn, GmbH Balingen, Deutschland Hirschmann Laborgeräte GmbH, Stuttgart Ohaus, Parsippany, USA Gilson, Middleton, USA Bio-rad Laboratories, Hercules, USA Hettich, Tuttlingen, Deutschland Bio-rad Laboratories, Hercules, USA Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
--	---

Thermostatschrank TC 135 S	Tintometer GmbH, Dortmund, Deutschland
Thriller Thermomixer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Olympus SZX7 Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Rotina 38 Zentrifuge	Hettich, Tüttlingen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo transfer System	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific, USA
VarioMAG® Elektronikrührer	HP Labortechnik, Oberschleißheim
VMSA-A Magnetrührer mit Heizplatte	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad TW2.03	ELMI, Riga
Waage SAC 62	Scaltec, Göttingen, Deutschland

3.1.6 Software und Online Programme

Tabelle 6: Software und Online Programme

Software	Entwickler
Adobe Illustrator CS6 16.0	Adobe Systems, San José, USA
Adobe Photoshop 2022 23.0	Adobe Systems, San José, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Canada
Excel 16.71	Microsoft, Redmond, USA
Capture Edge	Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich
Image J	Wayne Rasband (NIH)
ZEN 2.3 Blue Software	Carl Zeiss Microscopy, Jena,

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 5ml	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus, Winson, Deutschland
Cellstar® Tubes, 50ml, 15ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Nunc Lab-Tek Kammerobjektträger-System 8-Well	Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA
Deckgläser, 24 x 50 mm	Carl-Roth, Karlsruhe
Einmal-Küvetten 1,5ml	

<p>Falcon™ Stabpipetten 1ml gentleMACS C Tubes MACS SmartStrainers, 70µm Micro-Amp® 96-Well Platten Costar® Assay-Platten, Klare Boden (96-Well) <i>Kimtech Präzisionswischtücher</i></p> <p>Nitrocellulose Membran, Porengröße 45µm Nunc™ Kryoröhrchen</p> <p><i>Parafilm® Verschlussfolie</i> <i>Reaktionsgefäße 0,5ml, 1ml, 2ml</i> SafeSeal Reaktionsgefäße, 1,5ml, 2ml, 5ml Serologische Pipette, steril, 5ml, 10ml, 25ml <i>Schlauchfolie</i> <i>Skalpelle</i> <i>Stabpipetten 10ml, 25ml</i></p> <p>Siebgewebe aus PA 6.6 (Polyamid 6.6, Nylon) Maschenweite 30µm, 20 x 29cm Vasco® Nitril Handschuhe Whatman® Chromatographie Papier Zellkulturflasche 75cm² Zellkultur Multiwell-Platten, 6-Well Zellkultur Multiwell-Platten, 12-Well Zellschaber S</p>	<p>BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland Thermo Scientific, Waltham, USA Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Applied Biosystems, Waltham, USA Corning, USA</p> <p>Kimberly-Clark® Professional, Dallas, USA GE Healthcare, München Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA Bemis Company, Neenah, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland Greiner bio-one, Frickenhausen Greiner bio-one, Frickenhausen Th. Greyer, Renningen, Deutschland B. Braun, Melsungen, Deutschland Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria Reichert Chemotechnik GmbH, Deutschland B. Braun, Melsungen, Deutschland GE Healthcare, München Greiner bio-one, Frickenhausen Greiner bio-one, Frickenhausen Greiner bio-one, Frickenhausen TPP, Schweiz</p>
--	---

3.1.8 Kits

Tabelle 8: Kits

Kit	Hersteller
DC Protein Assay II (Kat.Nr.:500-0112)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (Kat.Nr.: M36008)	Life Technologies, USA Thermo Fisher Scientific, USA

MitoProbe™ TMRM Assay-Kit (Kat. Nr.: M20036)	Cayman Chemical, USA Miltenyi Biotec Thermo Fisher Scientific, USA
LDH Cytotoxicity Assay Kit (Kat.-Nr.: 601170)	
Neonatal Heart Dissociation Kit, mouse & rat (Kat.-Nr.: 130-098-373)	
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Kat. Nr.: 34095)	

3.1.9 Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Kat.-Nr.	Spezies	Western Blot		Immunfluoreszenz
				Verdünnung	BSA/Milch	Verdünnung
α-Actinin	Sigma	A7811	Mouse			1:800
ATF4	Cell signaling	11815	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBST	1:200
ATF5	abcam	Ab184923	Rabbit	1:2000	5%Milch/TBST	1:500
BiP (GRP78)	Cell Signaling	3177	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBST	
CHOP	Cell signaling	5554	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBST	
CLpP	Sigma	WH0008192M1	Mouse	1:1000	5%Milch/TBST	
Cox IV	Cell Signaling	11967	Mouse	1:1000	5%BSA/TBST	
eIF2α	Cell Signaling	2103	Mouse	1:1000	5%BSA/TBST	
p-eIF2α (Ser51)	Cell Signaling	3398	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBST	
GADD 153 (CHOP)	Santa Cruz	sc-575	Rabbit			1:200
GADD 34	Santa Cruz	sc-8327	Rabbit	1:000	5%Milch/TBST	
GAPDH	Thermo Fisher	MA16757	Mouse	1:50.000	5%Milch/TBST	
Ho-1	Abcam	AB13243	Rabbit	1:2000	5%Milch/TBST	

HSF1	Cell Signaling	4356	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBS T	1:500
HSP60	Cell Signaling	4870	Rabbit	1:20.000	5%BSA/TBS T	1:1000
Nkx2.5	Santa Cruz	Sc-14033	Rabbit			1:500
NRF2	Santa Cruz	sc-722	Rabbit	1:500	5%Milch/TB ST	1:200
Ki67	ThermoFisher	14-5698-82	Rat			1:500
p38 MAPK	Cell Signaling	8690	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBS T	
p-p38 MAPK	Cell Signaling	4511	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBS T	1:1600
PMPCB	Proteintech	16064-1-AP	Rabbit	1:1000	5%Milch/TB ST	
PRDX3	Proteintech	10664-1-AP	Rabbit	1:5000	5%Milch/TB ST	
PRDX-SO3	Abcam	Ab16830	Rabbit	1:2000	5%Milch/TB ST	
SOD2	Proteintech	24127-1-AP	Rabbit	1:5000	5%Milch/TB ST	1:200
Tubulin	Sigma	T9026	Mouse	1:5000	5%Milch/TB ST	
Vinculin	Sigma	V9131	Mouse	1:5000	5%Milch/TB ST	
YME1L1	Proteintech	11510-1-AP	Rabbit	1:1000	5%BSA/TBS T	

3.1.10 Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Hersteller und Katalognummer
Western Blot		
Anti-Mouse IgG, HRP linked	1:2000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling Technology , 7076S
Anti-Rabbit IgG, HRP linked	1:2000 in 5% Milch/TBST	Cell Signaling Technology, 7074S

Immunfluoreszenz		
Alexa Fluor® 488 goat Anti-Mouse	1:500	Life Technologies, A11029
Alexa Fluor® 555 goat Anti-Rabbit	1:500	Invitrogen, A21428
Alexa Fluor™ Plus 555 goat Anti-Rabbit	1:500	Invitrogen, A32732
Alexa Fluor® 488 goat Anti-Rabbit	1:500	Invitrogen, A11008
Alexa Fluor® 555 goat Anti-Rat	1:500	Invitrogen, A21434
DAPI	1:100	Carl Roth, 6335.1

3.1.11 Inhibitoren

Tabelle 11: Inhibitoren

Material	Hersteller
cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Rotkreuz, Schweiz
phosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz

3.1.12 Größenstandards Western Blot

Tabelle 12: Größenstandards Western Blot

Größenstandard	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.13 Deckflüssigkeit Immunfluoreszenz

Tabelle 13: Deckflüssigkeit Immunfluoreszenz

Material	Hersteller
Prolong™ Gold Antifade Mountant	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontamination wurden alle Schritte zur Kultivierung der Zelllinien und primär Zellen an einer sterilen Sicherheits-Werkbank mit sterilen Medien, Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Inkubation der embryonalen Kardiomyozyten und der Zelllinien erfolgte unter konstanten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂. Eine Ausnahme stellten einige Schritte bei der Inkubation adulter Kardiomyozyten dar, und diese werden in Punkt 3.4.1 beschrieben.

3.3 Arbeiten mit H9c2-Zellen

3.3.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Verwendet wurden die aus der Ratte stammenden H9c2 Kardiomyoblasten von ATCC (American Type Culture Collection, Virginia, USA, Kat. Nr. CRL-1446). Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um dies zu ermöglichen wurde dem Kulturmedium DMSO (Dimethylsulfoxid) als Frostschutzmittel beigefügt. Um Diffusion des DMSO in die Zellen zu gewährleisten und seine Zytotoxizität zu verhindern, wurden diese langsam und schrittweise gekühlt. Durch das Eindringen des DMSO in die Zellen werden die Gefriereigenschaften verändert und damit die Bildung von Eiskristallen minimiert. Die Zellen wurden 7 Minuten lang bei 22°C und 1250 rpm zentrifugiert und im Anschluss in 1ml DMEM mit Zusatz von 5% DMSO resuspendiert. Es erfolgte zunächst das Einfrieren bei -80°C worauf eine Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) in Kryoröhrchen folgte.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zunächst aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, zügig bei 37°C aufgetaut und anschließend in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss für 7 Minuten bei Raumtemperatur und 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Es folgte die Überführung in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium und die Kultur bei 37°C und 5% CO₂.

Nach 2 bis 3 Tagen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturflasche einmalig mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 0,05%igem Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37°C wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 in der Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop. Die Aussaat in eine neue Zellkulturflasche erfolgte nach Zellzählung mit $1,5 \times 10^6$ Zellen in 15 ml Zellkulturmedium. In Vorbereitung auf Versuche wurden die Zellen nach Trypsin-Ablösung auf die entsprechenden Zellkultur-Formate überführt. Für eine 12 Well Platte mit einer Wachstumsfläche von 3,9 cm² pro Well wurden 5×10^4 Zellen ausgesät.

3.4 Primärzellen

3.4.1 Versuchstiere

Zur Isolation embryonaler und neonataler Kardiomyozyten wurden Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6J bezogen von Charles River verwendet. Die Haltung erfolgte in der Versuchstierhaltung des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität. Gehalten wurden die Tiere in einer offenen Haltung in Filter-Topnin-Käfigen zur Reduktion von Pathogen-Exposition. Die Haltungsbedingung der Mäuse umfasste einen Tag-Nacht Rhythmus von 14/10 Stunden. Futter und Wasser war jederzeit frei zugänglich. Die Verpaarung erfolgte im Alter der Weibchen von 2-6 Monaten im Verhältnis 1 Weibchen und 1 Männchen für 3 Nächte. Die Mäuse lebten in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig, die

verpaarten und potentiell trächtigen Weibchen wurden nach Verpaarung einzeln gehalten. 10 Tage nach Trennung der Verpaarung wurde die Trächtigkeit mittels äußerer Inspektion und Tastbefund ermittelt. Die Präparation von insgesamt 285 Embryonen und Föten (4-10 pro Muttertier) erfolgte am 12.0-14.0 Tag nach Befruchtung.

Die Präparation der Embryonen im letzten Drittel der Trächtigkeit ist laut Tierschutzgesetz genehmigungspflichtig und wurde vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/12 Nr. G 49/2017 und V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/12 Nr. G 47/2020 genehmigt. Die Präparation neonataler Kardiomyozyten von insgesamt 14 Versuchstieren erfolgte 1-2 Tage nach der Geburt. Für die Generierung adulter Kardiomyozyten wurden 12 Wildtyp Mäuse vom Stamm C57BL/6J von Charles River im Alter von im Schnitt etwa 6-10 Monaten verwendet, die als Eigenaufzucht in der Tierhaltung des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität aufgezogen wurden. Die Entnahme der Organe/Herzen neonataler und adulter Mäuse wurde zu wissenschaftlichen Zwecken durch interne Tötungsanzeige bei den Tierschutzbeauftragten der JLU angezeigt (JLU Nr. 702 M).

3.4.2 Laminin-Beschichtung in Vorbereitung auf die Präparation der Primärzellen

In Vorbereitung auf die Präparation embryonaler, neonataler und adulter Kardiomyozyten erfolgte 24 Stunden vor Aussaat der Zellen auf die entsprechenden Wachstumsflächen die Beschichtung mit Laminin. 48 µl Laminin (Sigma L2020) wurde mit 4 ml PBS aliquotiert und bei -20° gelagert. Das Auftauen von Laminin erfolgte langsam auf Eis. Die Beschichtung erfolgte in einer Konzentration von 12 µl/ml in 1x PBS. Die Arbeitsvolumina entsprachen 1 ml bei einer 6-Well Platte, 500 µl bei einer 12-Well Platte und 250 µl bei der Verwendung eines Kammerobjektträgers.

3.4.3 Isolation und Kultivierung adulter Maus-Kardiomyozyten

Die Isolation adulter Kardiomyozyten erfolgte in Kooperation mit dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität. Angewandt wurde die Methode nach Piper et al., 1982 zur Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten. In Vorbereitung auf die Präparation wurde das Ausplattiermedium im Brutschrank bei 37°C erwärmt. Die Präparation erfolgte mit Hilfe der Langendorff-Perfusionsanlage die zunächst mit Perfusionsmedium gespült, luftblasenfrei aufgefüllt und auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Tötung der 3 bis 6 Monate alten Tiere erfolgte nach deren Betäubung mit Isofluran per zervikaler Dislokation. Zur Entfernung des Herzens aus der Brusthöhle wurde der Thorax innerhalb von 3 Minuten eröffnet und das Herz in 4°C kalte isotonische NaCl-Lösung gebracht. Es folgte die Entfernung von Geweberesten umliegender Strukturen. Die Aorta wurde kanüliert und in die Langendorff-Perfusionsanlage eingebunden. Um Rückstände von Blut zu entfernen, erfolgte zunächst die Spülung mit 5ml

Perfusionsmedium. Im Anschluss folgte die Perfusion mit rezirkulierendem Perfusionsmedium mit 2.4 mg/ml Kollagenase für 25 Minuten bei 37°C. Das Herz wurde anschließend oberhalb der Ventrikel abgesetzt, so dass Vorhöfe und Ausflusstrakt entfernt wurden und somit von der Langendorff-Aparatur entfernt. Das manuell mit Hilfe von Skalpellern zerkleinerte Gewebe wurde erneut für fünf Minuten im kollagenasehalten Perfusionspuffer bei 37°C inkubiert. Mechanisch wurde der Verdau durch das resuspendieren mit einer Pipette unterstützt. Die Suspension wurde durch ein Nylonnetz der Porengröße 200 µm gefiltert und danach für eine Minute bei 20 x g zentrifugiert. Danach folgten 4 Inkubations- und Zentrifugationsschritte mit schrittweise Erhöhung der Calciumkonzentration, um die Zellen so langsam an die Calciumkonzentration des Ausplattiermediums zu gewöhnen. Der Überstand wurde dafür nach jedem Zentrifugations-Schritt abgesaugt und die Zellen in Perfusionsmedium in aufsteigenden Konzentrationen mit 125 µM, 250 µM, 500 µM und 1 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in Ausplattiermedium resuspendiert, auf Laminin-beschichtete Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt und bei 37°C und 5,5% CO₂ inkubiert. Die Behandlung mit Antimycin A und die entsprechenden Versuche erfolgte noch am selben Tag, anderthalb Stunden nach dem ausplattieren.

3.4.4 Isolation und Kultivierung embryonaler und neonataler Maus-Kardiomyozyten

Die Präparation der embryonalen und neonatalen Kardiomyoyten erfolgte anhand eines standardisierten Protokolls mit dem gentleMACS™ Octo Dissociaters und dem Neonatal Heart Dissociation Kit (Miltenyi Biotec). In Vorbereitung auf die Präparation wurden Zellkulturplatten 24 Stunden zuvor mit Laminin beschichtet (Siehe Abschnitt 3.4.2) und bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Die Präparation von Embryonen und Föten erfolgte am 11.5-14.0 Tag nach Befruchtung. Die Tötung des Muttertieres erfolgte durch zervikale Dislokation. Im Anschluss wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Embryonen freigelegt. Die Entnahme der Herzen der Embryonen erfolgte in 4°C kaltem PBS. Die Präparation der embryonalen Herzen erfolgte unter Entfernung der Vorhöfe und des Ausflusstraktes, sodass nur das ventrikuläre Myokard für die Zellisolation genutzt wurde. Die Präparation neonataler Mäuse erfolgte 1-2 Tage nach der Geburt durch Dekapitation. Wie auch bei den embryonalen Kardiomyozyten erfolgte die entnahme der Herzen in 4°C kaltem PBS unter Entfernung der Vorhöfe und des Ausflusstraktes. Die bereits entnommenen Herzen wurden bis zum Ende der letzten Präparation in kaltem 1xPBS gelagert und anschließend alle zusammen mit 2,5 ml eines Enzym-Gemisches (entsprechend des Neonatal Heart Dissociation Kit, Miltenyi) in ein gentleMACS C-Tube (Miltenyi) gegeben. Während einer Isolation wurden so 4 bis 10 Herzen zusammen verdaut. Das Tube wurde in den „Dissociater“ zur zusätzlichen mechanischen Zerkleinerung eingespannt und das standardisierte Programm 37C_mr_NHDK1 ausgewählt. Während der mechanischen und enzymatischen Dissoziation wurde die Temperatur der

Suspension durch ein Heiz-Aggregat konstant auf 37°C gehalten. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurden nach dem Ende des Programms 7,5ml vorgewärmtes Kulturmedium (siehe Tabelle 3) zur Zellsuspension gegeben. Nach dem Mischen der Suspension wurde diese mit dem Smartstrainer (Porengröße 70µm, Miltenyi), um unverdaute Gewebereste zu entfernen und in ein neues Gefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 600 RCF wurde der Überstand entnommen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Es erfolgte das Ausplattieren auf Laminin beschichteten Platten. Die Zellen wurden bei 37°C bei 5% CO₂ kultiviert und nach 24 Stunden mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt.

3.5 Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität

Mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie und des Axio Observer 7 Mikroskopes (Zeiss) erfolgte zunächst eine Beurteilung von Konfluenz, Zelldichte, Adhärenz, Morphologie und Kontraktion. Dies diente einer ersten Einschätzung von Zellviabilität und Toxizität der verwendeten Inhibitoren. Als mögliche Anzeichen für einen Untergang der Zellen wurde auf eine verminderte Konfluenz bzw. Zelldichte, schwimmende, nicht mehr adhärente und abgerundete Zellen, sowie eine Abnahme der Kontraktion geachtet. Zu weiteren Objektivierung erfolgten die nachfolgenden Untersuchungen.

3.5.1 LDH-Assay

Beim Verlust der Zellintegrität wird das zytosolische Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) freigesetzt, welches die Reaktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert. Kommt es zur Permeabilisierung der Zellmembran, wird es somit in das Kulturmedium freigesetzt, wo es eine Beurteilung des Umfangs des Zellunterganges zulässt. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde das LDH Cytotoxicity Assay Kit entsprechend des Protokolls des Herstellers (Cayman Chemical) verwendet. In Vorbereitung auf die Untersuchung erfolgte zunächst das Lösen der Assay Buffer Tablette (Cayman Chemical, Kat. Nr. 10009322) in 100ml destilliertem Wasser. Die enthaltene LDH-Diaphorase (Cayman Chemical, Kat. Nr. 10009318) wurde in 150µl Wasser gelöst. Die Reaktion beruht auf zwei Schritten. Zunächst katalysiert LDH die Reduktion von NAD⁺ zu NADH und H⁺ durch die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Danach wird das entstandene NADH und H⁺ von der LDH-Diaphorase genutzt, um die Reduktion von Tetrazolium Salz (INT) zu Formazan zu katalysieren (Siehe Abbildung 7).

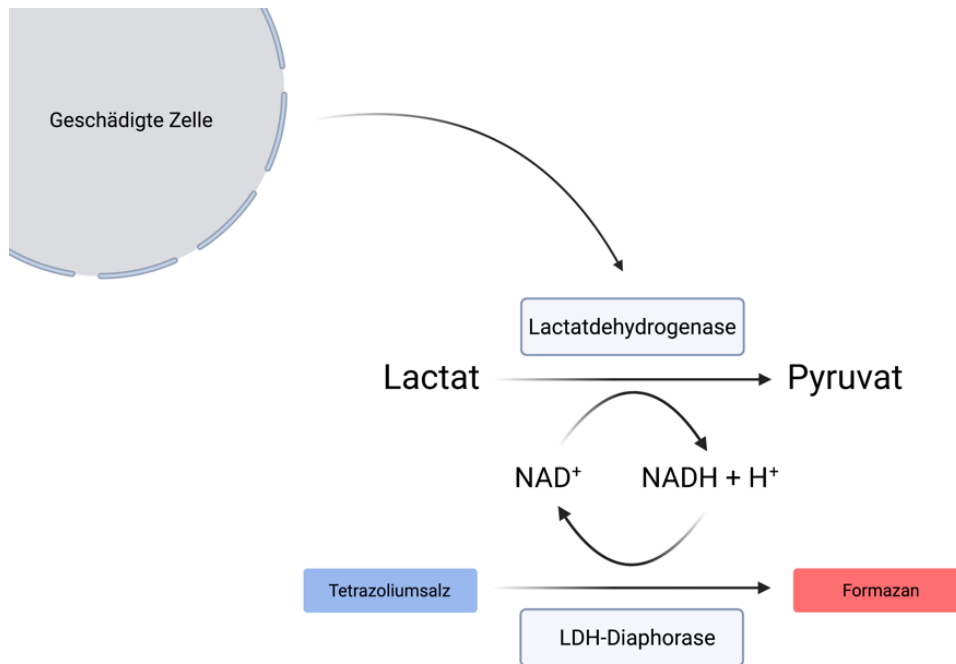


Abbildung 7: **LDH-Assay zur Beurteilung von Zellviabilität und Zytotoxizität**

Zur Beurteilung der Zellviabilität und Zytotoxizität verschiedener Inhibitoren der Atmungskette wurde ein LDH-Assay verwendet. Das bei der durch die Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion entstandene $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird von der LDH-Diaphorase zur Umwandlung von Tetrazoliumsalz zu Formazan genutzt. Die Absorption des Formazan kann im Anschluss bei 490nm gemessen werden (erstellt mit BioRender.com).

Die Absorption von Formazan lässt sich bei einer Wellenlänge von 490nm messen. Die Höhe der Absorption korreliert dabei mit der Höhe der LDH-Aktivität im Zellkultur-Überstand und damit mit der Freisetzung aus den Zellen. Die zu untersuchenden Proben entstammen dem Zellkulturüberstand embryonaler Kardiomyozyten behandelt mit Rotenon ($10 \mu\text{M}$), Oligomycin ($5 \mu\text{M}$), Antimycin A ($50 \mu\text{M}$) und der Trägersubstanz DMSO in äquivalenten Volumina als Kontrollgruppe über 24 Stunden ausgesät auf 8-Well Kammerobjektträgern mit einem Arbeitsvolumen von $250 \mu\text{l}$. Der Überstand wurde bis zur Messung bei -80°C gelagert. Das aufgetaute Kulturmedium wurde zunächst bei $400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert, um schwimmende Zellen zu pelletieren und aus der Messung zu entfernen. Im Anschluss wurden je $100 \mu\text{l}$ der Proben in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. In 2 Wells erfolgte das pipettieren von Kulturmedium ohne Zellkontakt zur Hintergrundkontrolle, sowie 2 Wells mit einer im Kit enthaltenen LDH-Positivkontrolle. In zwei Wells erfolgte zudem die Zugabe von $20 \mu\text{l}$ des zytotoxischen 10% Triton X-100 für eine maximale Freisetzung von LDH. Es erfolgte die Zugabe von je $100 \mu\text{l}$ der LDH *reaction solution* (Tabelle 4) des LDH *Cytotoxicity Assay Kit* (Cayman Chemical) pro Well. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C . Es erfolgte die Messung von 4 Proben je Inhibitor in Doppelbestimmung im Plate-Reader bei einer

Absorption von 490nm. Die gemessenen Werte der Hintergrundkontrolle (Kulturmedium ohne Zellkontakt) wurde von denen der Proben subtrahiert und im Anschluss der Mittelwert innerhalb der Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen gebildet.

Der entsprechende Mittelwert der Behandlungsgruppe wird als x-fache Änderung gegenüber der DMSO-Kontrollgruppe (definiert als 1) dargestellt.

3.5.2 Bestimmung der Kontraktilität embryonaler Kardiomyozyten

In Vorbereitung auf die Kontraktilitätsmessung wurden embryonale Kardiomyozyten auf Laminin beschichteten 8-Well Kammerobjektträgern, mit einer Wachstumsfläche von 0,8 cm², ausgesät. Über Nacht wurden die Zellen bei 37° und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 50µM Antimycin A und DMSO in äquimolarer Menge behandelt. Zur Beurteilung der Kontraktilität embryonaler Kardiomyozyten und damit einem Teil ihrer Funktionalität unter mitochondrialer Dysfunktion wurden Video-Aufnahmen mithilfe des Phasenkontrastmikroskops (Axio Observer, Zeiss) erstellt. Für die Videoaufnahmen wurde ein 10x Objektiv (0,25 NA) und die AxioCam 305 genutzt. Für die Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden die Zellen in jeweils 4 Kammern ausgesät. Pro Kammer wurden so 4 Videoaufnahmen von circa 20 Sekunden Dauer erstellt. In der ZEN 2.3 pro Software (Zeiss) konnten im Anschluss mithilfe eines Rasters von 10x10 die Anzahl kontraktiler Bereiche Antimycin A behandelter Zellen mit der DMSO-Kontrolle verglichen werden (Siehe Abbildung 8). Jedes Feld bzw. Quadrat wurde auf eine sichtbare Kontraktion hin untersucht und die Anzahl der kontraktilen Felder gezählt. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte als Mittelwert der kontraktilen Felder pro Well.

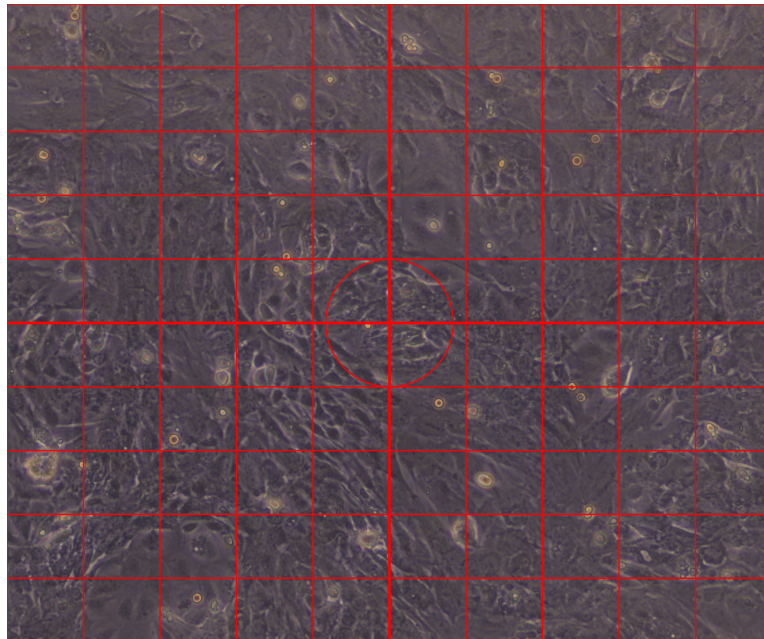


Abbildung 8: Beurteilung der Kontraktilität Antimycin A behandelter embrionaler Kardiomyozyten

Die Beurteilung der Kontraktilität embryonaler Kardiomyozyten erfolgte mithilfe der ZEN 2.3 pro Software (Zeiss). Auf zuvor erstellte Videoaufnahmen der kontrahierenden Zellen konnte ein Gitter aus 100 Feldern gelegt werden. Gezählt wurden im Anschluss alle Felder, die sichtbar kontrahierende Zellen zeigten.

3.5.3 MTT-Assay

Ein MTT-Assay ist eine kolorimetrische Reaktion und bietet eine indirekte Möglichkeit der Zellzahlbestimmung zur Messung von Wachstum und Zellüberleben. So kann unter anderem die Zytotoxizität verschiedener Inhibitoren bei in-vitro-Behandlung beurteilt werden ¹¹⁶. Das Assay basiert dabei auf MTT, dem sogenannten 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – ein Tetrazolium Salz das im Rahmen des Experimentes von lebenden Zellen in Formazan umgewandelt wird, der anhand eines blauen Farbumschlags messbar wird. Die Umwandlung von MTT zu MTT-Formazan kann durch mitochondriale Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen, sowie Elektronendonatoren wie NAD(P)H erfolgen ^{116,117}. Diese kolorimetrische Reaktion setzt eine metabolische Aktivität der Zellen voraus und kann indirekt einen Hinweis für die Viabilität und Anzahl der Zellen bieten ¹¹⁶.

Zur Durchführung eines MTT-Assays erfolgte die Aussaat der Zellen auf 12-Well-Platten. 24 Stunden nach Kultivierung der Zellen wurden diese mit der entsprechenden Konzentration der verschiedenen Inhibitoren oder der Trägersubstanz DMSO in äquivalenter Menge als Kontrollgruppe behandelt. Zum 24 und 48 Stunden Zeitpunkt wurde das alte Medium vorsichtig

abgesaugt und durch 450 µl neuen Mediums mit 50 µl MTT (5mg/ml in PBS) pro Well hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 1,5 Stunden bei 37°C. Nach Absaugen des Mediums zusammen mit dem MTT wurde 1ml MTT-Lysis-Puffer hinzugegeben. 5 Minuten später wurde die Lösung in Reaktions-Gefäße gegeben. Es folgte die Zentrifugation der Lösung für 2 Minuten bei 13.300 Umdrehungen/min. Die Messung der Extinktion des Überstandes erfolgte photometrisch bei 570nm mithilfe des NanoPhotometer® NP80. Die Aussaat erfolgte in Triplikaten deren Mittelwert bestimmt wurde.

3.6 Proteinbiochemische Untersuchungen

3.6.1 Proteinisolation

Für eine Proteinextraktion der H9c2-Zellen für Western Blot Analysen wurde eine 6-Well Platte mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm² und einer Aussaat von 2 x 10⁵ Zellen genutzt. Embryonale und adulte Kardiomyozyten wurden ebenfalls auf eine 6-Well Platte mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm² ausgesät, die Zellen einer Isolation wurden dazu in ihrem Medium resuspendiert und mit einem Arbeitsvolumen von 3 ml gleichmäßig auf die Wells verteilt. Zur Isolation von Proteinen der auf 6-Well Platten kultivierten Kardiomyozyten, wurden diese zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die anschließenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden mit 50µl Cell-lysis-Puffer (Cell Signaling Technologies) pro Well, versetzt mit einem Protease- und Phosphatase Inhibitor (Roche), behandelt und für 5 Minuten inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgetragen und das Lysat in gekühlte Reaktions-Gefäße überführt. Es erfolgte die Zentrifugation der Proben in einer zuvor auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 10 Minuten bei 14.000 rpm um Zellreste zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in neue Reaktions-Gefäße überführt. Die Proben wurden zur Langzeitlagerung bei -80°C eingefroren.

3.6.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration der Zell-Lysate, wurde die kolorimetrische Methode nach Lowry¹¹⁸ mit Hilfe des DCTM Protein Assays der Firma Bio-Rad angewandt. Während eines zweistufigen Prozesses kommt es in Abhängigkeit der vorhandenen Proteinmenge zu einer unterschiedliche starken, blauen Farbentwicklung, deren Extinktion photometrisch gemessen werden kann. Bei jeder Protein-Bestimmung wurde eine Standardreihe mit Bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt mit H₂O in Doppelbestimmung erstellt (siehe Tabelle 4). Die Proben aus H9c2-Zellen und embryonalen Kardiomyozyten, wurden 1:5 mit H₂O verdünnt. Das Gesamtvolumen der verdünnten Protein-Proben sowie der Standardreihe betrug 25µl.

Nach Verdünnung wurde 122,5 µl Reagenz A, sowie 2,5 µl Reagenz S (DCTM Protein Assay) zu den Proben gegeben und das Gemisch invertiert. Es erfolgt die Zugabe von 1ml Reagenz

B (DC™ Protein Assay), woraufhin das sofortige Mischen („vortexen“) der Proben erfolgte. Es folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 750nm im NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN) in 1ml Küvetten gemessen. Die entnommenen Extinktionswerte der BSA-Verdünnungsreihe, dienten der Erstellung einer Standardgeraden. Unter Hinzunahme der Geradengleichung und des Verdünnungsfaktors konnte die Proteinkonzentration der Proben anhand ihrer Extinktionen errechnet werden.

Tabelle 14: Pipettierschema der Standardreihe zur Proteinbestimmung mit BSA-Standard

BSA-Konzentrationen µg/ µl	Volumen BSA (2mg/ml) in µl	Volumen H ₂ O in µl
0	0	25
0,16	2	23
0,32	4	21
0,56	7	18
0,8	10	15
1	12,5	12,5
1,2	15	10

3.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-Page nach Laemmli ¹¹⁹ werden die zuvor denaturierten Proteine im elektrischen Feld ihrer Molekülmasse nach aufgetrennt. Das enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) dient dabei der Denaturierung der Proteine an die es sich im Anschluss anlagert. Durch die Sulfatgruppen entsteht eine negative Ladung des Komplexes, sodass die Proteine während der Elektrophorese im Gel vom Minus- zum Pluspol wandern. Gegossen wird das hierzu benötigte Acrylamid-Gel zwischen zwei 16x18cm großen Glasplatten mithilfe des Mini PROTEAN® Tetra Handcast System (Bio-Rad Laboratories). Die Dicke des Gels betrug dabei 1,5 mm. Die verwendeten Gele setzten sich zusammen aus einem Trenngel mit 12% Acrylamid und einem darüber liegenden 4%igen Sammelgel. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 5 dargestellt. Zunächst erfolgte das Eingießen des Trenngels gefolgt von Isopropanol, um den Kontakt zu Sauerstoff und die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Nach Polymerisation erfolgte das Eingießen des Sammelgels und einführen eines Kammes zur Bildung von Taschen für die Ladung mit den entsprechenden Proben. Die Probenmenge entsprach einer Proteinmenge von 20 µg. Auf ein Gel wurden immer einheitliche Proteinmengen geladen, um die Proben untereinander vergleichen zu können. Zur Vorbereitung der Proben, wurden diese vor der Elektrophorese mit einem 5x SDS-Ladepuffer (Laemmli) versetzt und anschließend bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und damit denaturiert. Nach vertikalem Einbringen der Gele im Mini PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad

Laboratories) wurde diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Es erfolgte das pipittieren der Proben in die entsprechenden Geltaschen. Als Orientierung der Molekülmassen dienten Proteinstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) von denen beidseits der Proben jeweils 10µl aufgetragen wurden. Das Einlaufen der Proben bei Raumtemperatur erfolgte je nach Höhe des Sammelgels für 15-30 Minuten bei 60 V, gefolgt vom durchlaufen des Trenngels für weitere 1-2 weiteren Stunden bei 90 V. Erreichte die Lauffront das untere Ende des Gels wurde die Elektrophorese gestoppt. Im Anschluss erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran zur weiteren Analyse.

Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel. Menge entspricht 2 Gelen.

Substanzen	Trenngel 12%, 1,5mm	Sammelgel 4%
Wasser (H ₂ O)	3,55 ml	7,26 ml
Acrylamid (30%)	6,8 ml	1,33 ml
1M Tris/HCL pH 8,8	6,38 ml	/
1M Tris/HCL pH 6,8	/	1,25 ml
10% SDS	170 µl	100 µl
10% APS	85 µl	50 µl
TEMED	17 µl	10 µl

*Menge entspricht 2 Gelen

3.6.4 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)

Die im Rahmen der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Durch die negative Ladung der Proteine wandern diese im elektrischen Feld aus dem Gel in Richtung Anode und werden so auf die Membran übertragen, an der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dafür wurden die Nitrocellulosemembran, Whatman®-Filterpapiere und das Gel für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Im Anschluss wurden drei getränkte Whatman-Filterpapiere, eine Membran, das SDS-Gel und abschließend drei weitere Filterpapiere als „Sandwich“ im direkten Kontakt zwischen Anode und Kathode eingebracht. Der Proteintransfer erfolgte im Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad) bei 25V und einer Stromstärke von 0,1A für 25 Minuten.

3.6.5 Western Blot Analysen

Mithilfe primärer und sekundärer Antikörper wurden die auf die Membran transferierten Proteine detektiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde zunächst für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 5% Milch/TBST geblockt, um so unspezifische Bindungen der Antikörper

zu minimieren. Die Membranen wurden im Anschluss an das Blocking horizontal anhand der Markerbanden auf unterschiedlichen Höhen geschnitten, um die Detektion mehrerer Antikörper zu ermöglichen. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für jeweils 5-10 Minuten, erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern, verdünnt in 5% Milch in 1x TBST oder 5% BSA in 1x TBST über Nacht bei 4°C auf einem Taumelschüttler. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang der Membran wie oben beschrieben (3x TBST für jeweils 10 Minuten), um ungebundene Primär-Antikörper zu entfernen. Die Zugabe von HRP-gekoppelten (Horseradish Peroxidase, Merrettichperoxidase), sekundären Antikörpern erfolgte für ein bis zwei Stunde in Abhängigkeit vom primären Antikörper mit Anti-Maus oder Anti-Kaninchen Antikörper in der Verdünnung 1:2000 in 5% Milch/TBST bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die Merrettichperoxidase dient dabei der späteren Oxidation von Luminol im Rahmen der Proteindarstellung mittels Chemilumineszenz-Reaktion. Nach erneutem Waschen der Membran (3x TBST für 10 Minuten) erfolgte die Darstellung der Proteine. Verwendet wurde dafür eine im Verhältnis 1:1 pipettierte Enhanced-Chemiluminescence (ECL) Mischung aus Lösung A und B (siehe Tabelle 4). Nach einer Minute Inkubationszeit der ECL-Lösung auf der Membran erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels des Fusion Solo S Imaging Systems (Vilber Lourmat), das die Proteinbanden mit Hilfe einer hochsensitiven Kamera anhand des emittierten Lichtes detektiert. Eine sensitivere Alternative zur Detektion mittels ECL bot das *SuperSignal™ West Femto Chemilumineszenz Kit* (Thermo Fisher Scientific), sodass sich die Auswahl des Mittels zur Detektion nach der Signalstärke des jeweiligen Proteins richtete.

3.6.6 „Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen

Für eine erneute Detektion von Antikörpern gleicher oder ähnlicher Molekülmasse auf einer bereits verwendeten Membran wurden die zuvor gebundenen Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt, um mögliche Überlagerungen bei Restaktivität des zuvor gebundenen Antikörpers zu vermeiden. Das lösen eines bereits gebundenen Antikörpers ist so unter anderem notwendig zur Quantifizierung phosphorylierter Proteine, bei denen auch die Darstellung des Gesamtproteins erforderlich ist. Zunächst wurden die Membranen dazu viermal für jeweils 5 Minuten in 1x TBST gewaschen. Im Anschluss wurden sie 30 Minuten in *Stripping*-Puffer (Siehe Tabelle 4) bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Die Membranen wurden hierzu eingeschweißt. Anschließend erfolgten 6 x 5-minütige Waschschrte in 1x TBST. Es erfolgte ein erneutes Blocking der Membranen in 1x 5% Milch/1xTBST für 30 Minuten und die anschließende Inkubation mit Primärantikörper wie oben beschrieben. Um einen Proteinverlust zu minimieren wurde jede Membran ein bis maximal zweimal gestrippt.

3.6.7 Densitometrische Quantifizierung von Proteinbanden

Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde die Fusion FX Software „Capture Edge“ (Vilber-Lourmat) verwendet. Als Ladekontrollen für jede auf die Membran geladene Ziel-Proteine dienten Vinculin und α -Tubulin derselben Probe und Membran. Phosphorylierte Proteine wurden ihren Gesamtproteinen gegenübergestellt. Dabei wurden die Densitometrie-Werte der entsprechenden Ziel-Banden durch die der Ladekontrollen dividiert, um so Unregelmäßigkeiten der aufgetragenen Proteinmengen auszugleichen. Aus den berechneten Quotienten aus Zielprotein/Ladekontrolle bzw. p-Protein/Gesamtprotein erfolgte die Bildung des Mittelwertes der in Triplikaten ausgesäten Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen. Der entsprechende Mittelwert der Behandlungsgruppe wird als x-fache Änderung gegenüber der DMSO-Kontrollgruppe (definiert als 1) dargestellt.

3.7 Immunfluoreszenz-Analyse

3.7.1 Vorbereitung und Fixierung der Zellen

In Vorbereitung auf die Immunfluoreszenz Analysen wurden die präparierten embryonale und neonatale Kardiomyozyten auf Laminin beschichteten 8-Well Kammerobjektträgern, mit einer Wachstumsfläche von 0,8 cm², gleichmäßig auf die einzelnen Wells ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden Inhibitor oder der Trägersubstanz DMSO in äquivalenten Volumina als Kontrollgruppe behandelt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 5 Minuten in 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen. Fixiert wurden im Anschluss mithilfe von 4% Paraformaldehyd in 1x PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten in 0,25% Triton-X-100 in 1x PBS inkubiert und die Zellmembran permeabilisiert, um die Antikörper Bindung an intrazellulären Strukturen zu ermöglichen. Im Anschluss erfolgten erneute Waschschrte 3x5 Minuten mit kaltem 2x PBS (4°C).

3.7.2 Bindung der Antikörper

Zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungen wurden die Zellen in 5% Ziegen Serum (Normal-Goat-Serum) in Antikörper-Lösung (Siehe Tabelle 4) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten primären Antikörper (siehe Tabelle 9) in Antikörperlösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit dem sekundären Antikörper bei lichtgeschützten Verhältnissen. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die Zellen zunächst 3x 5 Minuten mit 0,25% Triton-X-100/ 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörpers (Siehe Tabelle 10) entsprechend der Spezies des primären Antikörpers in der Verdünnung 1:500, sowie des Kernfarbstoffes DAPI in der Verdünnung 1:100 in Antikörperlösung für 2 Stunden bei

Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut 3 x 5 Minuten in 0,1% Triton-X-100/ 1x PBS (s.o.) gewaschen. Eingebettet wurden die Präparate in dem wässrigen Medium „Prolong Gold Antifade Reagent“ (Cell Signaling Technologies). Zum Trocknen wurden die Objektträger lichtgeschützt über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei 4°C gelagert.

3.7.3 Kofärbung mit mehreren Primär-Antikörpern

Nach Isolation der Kardiomyozyten aus dem Herzen erfolgte keine spezielle Aufreinigung, wodurch auch Nicht-Kardiomyozyten einen Teil des Zellverbundes bilden. Zu Lokalisation der Kardiomyozyten und Antikörper im Zellverbund wurde eine Doppelfärbung der Zielproteine mit α -Actinin oder Nkx2.5 durchgeführt. Durch die Vernetzung von Aktinfilamenten ist das Strukturprotein α -Actinin entscheidend an der Stabilität des Zytoskelettes beteiligt^{120,121}. Nkx2.5 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor der myokardialen Entwicklung und eignet sich durch seine spezifische Anfärbung von Kardiomyozytenkernen zur Identifizierung gegenüber Nicht-Kardiomyozyten im Zellverbund¹²². Wichtig ist dabei, dass die beiden Antigene von verschiedenen Fluochrom-gekoppelten Antikörper detektiert werden. Dazu wurde darauf geachtet, dass die primären Antikörper verschiedenen Spezies angehören, damit sie anschließend von verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpern detektiert werden können. Die Bedingungen der Doppelfärbung entsprechen denen der bereits in 3.7.2 erläuterten. Die primären und sekundären Antikörper wurden dabei zeitgleich in derselben Antikörperlösung verwendet.

3.7.4 Fluoreszenzmikroskopie

Ausgewertet wurden die Objektträger mittels eines inversen Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axio Observer 7). Das Imaging erfolgte mit folgenden Objektiven: mit einem 10x Plan-Apochromat (0,25 numerische Aperatur), 20x Plan-Apochromat (0,8 NA), einem 40x Plan-Apochromat (0,65 NA) oder einem 63x Plan-Apochromat mit Öl-Immersion (1,4 NA) Fotos aufgenommen. Die Bilder wurden mit Hilfe der monochromatischen Kamera AxioCam 503 mono und der ZEN 2.3 pro Software (Zeiss) aufgenommen.

3.7.5 Kardiomyozytenzählung und Bestimmung der Zellzyklusaktivität mittels Immunfluoreszenz

Zur Ermittlung des Kardiomyozytenanteils innerhalb des nicht aufgereinigten Zellverbundes erfolgte die Kofärbung des Sarkomerproteins α -Actinin und des kardialen Transkriptionsfaktors Nkx2.5 (siehe auch Abschnitt 3.7.3), der als Kernmarker embryonaler Kardiomyozyten diente. Die Zählung des Anteils embryonaler Kardiomyozyten an den Gesamtzellen erfolgte mittels ImageJ¹²³. Als Marker für die Zellzyklusaktivität embryonaler Kardiomyozyten wurde Ki67 in Kofärbung mit Nkx2.5 verwendet. Pro Well wurde mit Hilfe des

Axio Observer 7 Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) und dem 10x Plan-Apochromat Objektiv vier zufällige Bilder erstellt. Mithilfe der Funktion „*Find Maxima*“ der Software ImageJ wurden die DAPI gefärbten Zellkerne gezählt und bei Bedarf manuell korrigiert. Im Anschluss erfolgte eine manuelle Zählung der Nkx2.5 positiven Kerne innerhalb α -Actinin positiver Zellen. Zur Identifizierung des Kardiomyozyten-Anteils wurde die Anzahl der Nkx2.5 positiven Kerne von der durch DAPI identifizierten Gesamtzahl der Kerne subtrahiert. Gleichermaßen erfolgte die Ermittlung der Anzahl an Ki67/Nkx2.5-positiven Kernen durch manuelle Zählung zur Beurteilung der Zellzyklusaktivität, die im Anschluss von der Gesamtzahl der Ki67-Kerne subtrahiert wurden. Es erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils von Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl, sowie der Anteil der Ki67-positiven Kardiomyozyten und Nicht-Myozytenkerne pro Well. Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde in dreifacher Ausführung untersucht.

3.8 Detektion Reaktiver Sauerstoffverbindungen

3.8.1 Allgemeiner Versuchsaufbau zur Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen

Zum Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in embryonalen Kardiomyozyten wurden MitoProbe™ TMRM Assay Kit und MitoSOX™ Red von Thermo Fisher Scientific in der Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Die embryonalen Kardiomyozyten wurden dazu auf Kammerobjektträgern mit einer Fläche von 0,8cm²/ Well ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat der Herzen erfolgte in jeweils 2 Wells die Zugabe des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A (50 μ M) und die Zugabe von äquivalenten Volumina der Trägersubstanz DMSO als Kontrollgruppe. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte 24 Stunden nach Inhibitor-Behandlung mithilfe des Axio Observer 7 Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss).

3.8.2 TMRM-Assay

Mithilfe des MitoProbe™ TMRM Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) können mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials lebender Zellen detektiert werden. Im Falle intakter Mitochondrien gesunder Zellen akkumuliert TMRM in den Mitochondrien und ist als rote Fluoreszenz nachweisbar. Im Rahmen von mitochondrialem Stress oder auch eines Zelluntergangs, kommt es zur Depolarisation der Mitochondrien-Membran und damit zu einem verminderten Fluoreszenzsignal durch TMRM, welches nicht mehr innerhalb der Mitochondrien akkumulieren kann ^{124–126}. 24 Stunden nach der Behandlung mit Antimycin A wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 20 nM TMRM in DMEM mit einem Volumen von 500 μ l pro Well behandelt. Die Zellen inkubierten 30 Minuten bei 37°C. Die Lösung wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie der lebenden Zellen im Kammerobjektträger, für die 250 μ l 1xPBS

pro Well belassen wurden. Für das Imaging wurde ein 20x Objektiv (A-Plan, 0,35 NA), die monochromatische Kamera Axiocam 503 mono und die ZEN 2.3 pro Software (Zeiss) genutzt.

3.8.3 MitoSox™ Red

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen kann mithilfe des MitoSOX™ Red Reagenz die Bildung mitochondrialer Superoxide ($O_2\cdot^-$) dargestellt werden. Das membrangängige Reagenz sammelt sich aufgrund seiner positiven Ladung innerhalb der Mitochondrien an und wird in Anwesenheit von Superoxiden oxidiert. Es bindet dort an die mitochondrialen Nukleinsäuren und zeigt sich rot fluoreszierend ¹²⁷. Der MitoSOX™ Indikator wurde vor der Anwendung in DMSO gelöst und somit eine 5 mM MitoSOX™ Stock Lösung hergestellt. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit Antimycin A wurden die embryonalen Kardiomyozyten mit 5 μ M MitoSOX™ in 250 μ L Kulturmedium pro Well behandelt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden 250 μ l auf den Zellen belassen. Es folgte die Darstellung der lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wie oben für TMRM beschrieben.

3.9 Statistische Methoden

Die graphische Visualisierung und statistische Auswertung der Daten erfolgten mithilfe von Microsoft Excel 16.71. Die nachfolgenden Diagramme zeigen den errechneten Mittelwert \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt in Form von Balkendiagrammen mit SEM-Balken. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test bei ungleichen Varianzen durchgeführt. Angenommen wurde eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert unter 0,05. Im Rahmen der graphischen Darstellung markiert durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) bzw. *** ($p < 0,001$). Die Gruppengröße variierte in Abhängigkeit von dem jeweiligen Versuch und wird im Rahmen der Ergebnisse angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristika der H9c2-Zelllinie und Bedingungen der in-vitro-Experimente

Um der Frage nach dem Überleben undifferenzierter Kardiomyozyten unter einem mitochondrialen und oxidativen Stress weiter nachzugehen, wurden zunächst Versuche an der stabilen H9c2-Zelllinie (siehe Abschnitt 1.4) durchgeführt. Hierbei wurden zellbiologische Grundlagen für darauffolgende Untersuchungen Kardiomyozyten-spezifischer Mechanismen an embryonalen Kardiomyozyten untersucht. Es sollten unter anderem die Dosierung des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A (AMA), das Zellüberleben und die Aktivierung zellulärer Stressmechanismen geklärt und vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe (siehe Abschnitt 1.4) bestätigt werden. Aufgrund ihres kardialen Ursprungs werden H9c2-Zellen, als Myoblasten aus dem Rattenherzen, in der Literatur für Untersuchungen grundlegender Mechanismen der kardialen Zellbiologie verwendet, um somit Erkenntnisse für die Pathogenese kardialer Erkrankungen zu gewinnen. Als Subklon der aus dem embryonalen Rattenherz isolierten Originalzellen weisen sie zellbiologisch die größte Ähnlichkeit zu unreifen, embryonalen Kardiomyozyten auf. Morphologisch präsentieren sich die Zellen als polygonal bis spindelförmig. Ihre Fähigkeit zur Kontraktion haben sie verloren^{104,128}. Wie in Abschnitt 1.4 erläutert, beruhen viele Aspekte, die zur Hypothese des vorliegenden Projektes geführt haben, auf Ergebnissen des herzspezifischen *Hccs*-Knockout-Modells in der Maus^{98,101}. Da Cytochrom C ein wichtiger Bestandteil von Komplex III der Atmungskette ist, führt der *Hccs*-Knockout zu einer Dysfunktion des Komplexes¹²⁹. Zur Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion wurde im Verlauf des Projektes daher das aus Streptomyceten gewonnene Antibiotikum Antimycin A verwendet. Wie auch die Inaktivierung des *Hccs*-Gens bzw. der Verlust von Cytochrom C, führt Antimycin A zu einer Dysfunktion von Komplex III der Atmungskette^{44,130}. Im Rahmen der nachfolgenden Untersuchungen erfolgte die 24- bis 48-stündige Behandlung mit 50 µM Antimycin A oder der Trägersubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) in äquimolarer Menge. Die Behandlung von Zellen mit äquimolarer Menge DMSO diente als Kontrolle gegenüber des in DMSO gelösten Antimycin A, um mögliche Effekte der Trägersubstanz selbst zu korrigieren. 50 µM des Inhibitors stellen dabei eine in der Arbeitsgruppe etablierte und in der Literatur gängige Konzentration dar^{102,131}. Sowohl die Behandlung mit Antimycin A als auch die mitochondriale Dysfunktion durch den *Hccs*-Knockout stören somit die reguläre Funktion von Komplex III und damit den Elektronentransport zwischen Komplex III und IV der mitochondrialen Atmungskette. Aufgrund der Limitierungen der Zelllinie sollen die in den zunächst orientierenden Versuchen identifizierten Mechanismen im nächsten Schritt anhand von embryonalen Kardiomyozyten untersucht und so die Übertragbarkeit der Ergebnisse verbessert werden.

4.1.1 Toleranz von H9c2-Zellen hinsichtlich der Inhibition von Komplex III der Atmungskette

H9c2-Zellen als unreife Myoblasten aus dem embryonalen Rattenherzen können in gewissen Grenzen als Modell für embryonale und damit wenig differenzierte Kardiomyozyten herangezogen werden (siehe Abschnitt 2). Um den Einfluss einer Inhibition von Komplex III der Atmungskette auf H9c2-Zellen zu untersuchen, erfolgte u. a. eine Behandlung mit Antimycin A. Nach der Behandlung über 24 Stunden wurde die Morphologie der Zellen mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie beurteilt. Die morphologische Betrachtung der H9c2-Zellen zeigte keine offensichtlichen Unterschiede zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und den mit Antimycin A behandelten Zellen. In beiden Fällen zeigten sich die typischen, spindelförmigen H9c2-Zellen in einem konfluenten Zellrasen (Abbildung 9). Dabei zeigte sich keine ersichtliche Reduktion der Zellzahl bzw. -dichte oder einen Anhalt für übermäßigen Zelltod wie abgelöste, abgerundete, fragmentierte oder geschrumpfte Zellen. Die Analyse mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie ließ darauf schließen, dass die Behandlung mit dem Inhibitor von den Zellen gut toleriert wurde.

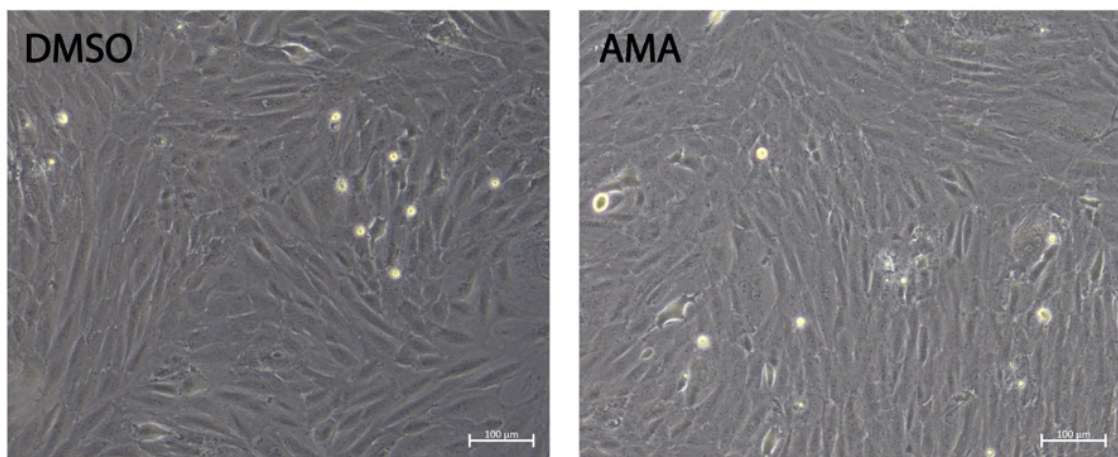


Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen von H9c2-Zellen unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A

Die repräsentativen Phasenkontrastbilder zeigen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 50 µM Antimycin A (AMA) behandelte H9c2-Zellen. Im Vergleich dargestellt ist die Kontrollgruppe mit DMSO in äquimolarer Menge. Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

Da in der Phasenkontrastmikroskopie morphologisch keine sichtbaren Veränderungen der H9c2-Zellen erfasst wurden, erfolgten Untersuchungen zur Beurteilung von Zellzahl und -wachstum, um so auch eine geringfügige Inhibierung des Zellzyklus oder Induktion von Zelltod zu detektieren. Dazu wurde ein MTT-Test jeweils nach 24 und 48 Stunden nach Zugabe von 50 µM Antimycin A verwendet. Der abgebildete t0-Wert entspricht dabei der Zellzahl zu Beginn

der Behandlung, sprich dem Zeitpunkt, zu dem den H9c2-Zellen DMSO oder Antimycin A zugegeben wird, wobei die Messung des t₀-Wert selbst an unbehandelten Zellen erfolgte. Ausgehend vom t₀-Wert erfolgt eine Beurteilung des Zellwachstums über 24 und 48 Stunden. Der MTT-Test von mit Antimycin A behandelten H9c2-Zellen zeigte im Vergleich zum Inhibitor einen signifikanten Effekt. Die Darstellung der Ergebnisse (Abbildung 10) verdeutlicht das konstante Wachstum der DMSO-Kontrollgruppe innerhalb des 24- und 48-stündigen Untersuchungszeitraumes. Hierbei zeigte sich jeweils eine Verdopplung der MTT-Werte in einem Wachstumszeitraum von 24 Stunden. Im Vergleich dazu kam es bei den mit Antimycin A behandelten H9c2-Zellen zwar ebenfalls zu einem konstanten Wachstum, das ebenfalls in etwa einer Verdopplung der MTT-Werte zwischen 24 und 48 Stunden entsprach, jedoch zeigten sich signifikant niedrigere Werte als in der DMSO-Kontrollgruppe. Die gemessenen Werte waren sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe deutlich reduziert.

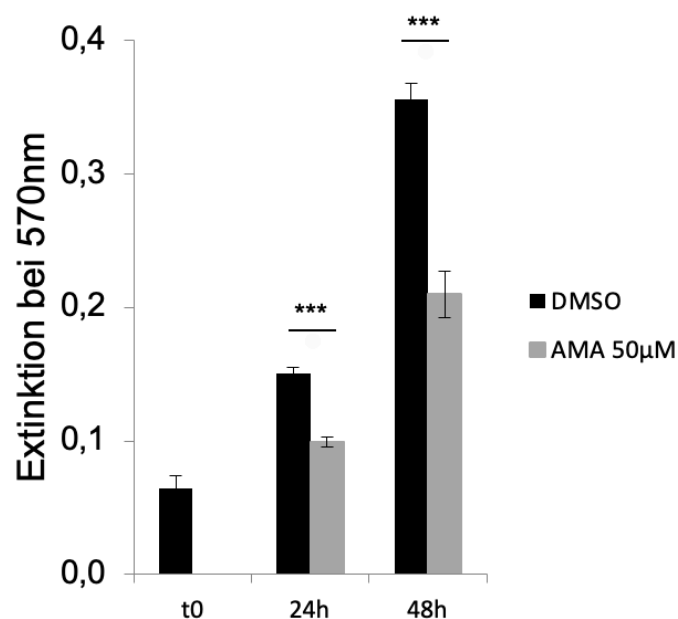


Abbildung 10 Wachstum von H9c2-Zellen unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A

Dargestellt ist die graphische Abbildung der Extinktionswerte eines MTT-Tests über 24 und 48 Stunden von mit DMSO bzw. Antimycin A (AMA) behandelter H9c2-Zellen in einer Konzentration von 50 µM. t₀ entspricht der Zellzahl unbehandelter H9c2-Zellen zu Behandlungsbeginn, 24 Stunden nach Aussaat. n = 4 Wells pro Behandlung; ***p < 0,001.

Während H9c2-Zellen in der Phasenkontrastmikroskopie keine erkennbaren morphologischen Veränderungen bei Behandlung mit 50 µM Antimycin A zeigten, zeigte sich ein deutlicher Effekt der Komplex-III-Inhibition auf das Wachstum der H9c2-Zellen.

4.1.2 Aktivierung der ISR in H9c2-Zellen unter Antimycin A

Zur möglichen Erklärung der hohen Toleranz von H9c2-Zellen gegenüber der Behandlung mit Antimycin A wurden die Zellen auf eine Aktivierung verschiedener Stress-reaktiver Signalwege untersucht. Die Untersuchungen sollten zudem einen Vergleich zu den embryonalen Kardiomyozyten des *Hccs*-Knockout-Modells sowie vorhergegangenen Studien der Arbeitsgruppe mit H9c2-Zellen ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die *Integrated-Stress-Response* (ISR) und die *mitochondriale Unfolded-Protein -Response* (UPR^{mt}) gelegt. Wie in Abschnitt 1.3.5 beschrieben, stellen ISR und UPR^{mt} Antworten auf eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine dar und dienen der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase. Die Analysen mittels Western Blot 24 und 48 Stunden nach Beginn der Behandlung mit Antimycin A und DMSO zeigten eine Induktion der Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP durch AMA (Abbildung 11), welche als typische Effektoren von ISR und UPR^{mt} gelten. Daneben wurde auch eine vermehrte Expression von GADD34 deutlich (Abbildung 11). Eine Aktivierung von GADD34 bedingt die Dephosphorylierung von eIF2 α . Dadurch wird ein negativer *Feedback*-Mechanismus aktiviert, der die Inhibierung der globalen Translation durch das phosphorylierte eIF2 α stoppt (siehe Abschnitt 1.3.3)¹³². Wie auch schon in veröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe¹⁰², konnte eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α in AMA-behandelten H9c2-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11). Im Rahmen von zellulärem Stress, wie beispielsweise oxidativem Stress, kann es neben ISR/UPR^{mt} zu einer Aktivierung der Hitzeschockantwort kommen, welche vor einer stressbedingten Proteinaggregationen schützen soll (siehe Abschnitt 1.3.2). Eine Induktion von HSF1 als repräsentativem Marker der Hitzeschock-Antwort in H9c2-Zellen nach 24- und 48-stündiger Behandlung mit Antimycin A im Vergleich zu DMSO nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11).

Bei der Phosphorylierung der stressinduzierten MAP-Kinase p38 zeigten sich Anzeichen für eine vermehrte Phosphorylierung, die statistisch jedoch nicht signifikant waren (Abbildung 11). Die MAP-Kinase p38 wird durch verschiedene Stresstimuli wie oxidativem Stress aktiviert und nimmt auf das Wachstum und die Differenzierung der Zellen Einfluss. Im Rahmen des Signalweges von p38 kommt es dabei zur Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, darunter auch CHOP¹³³.

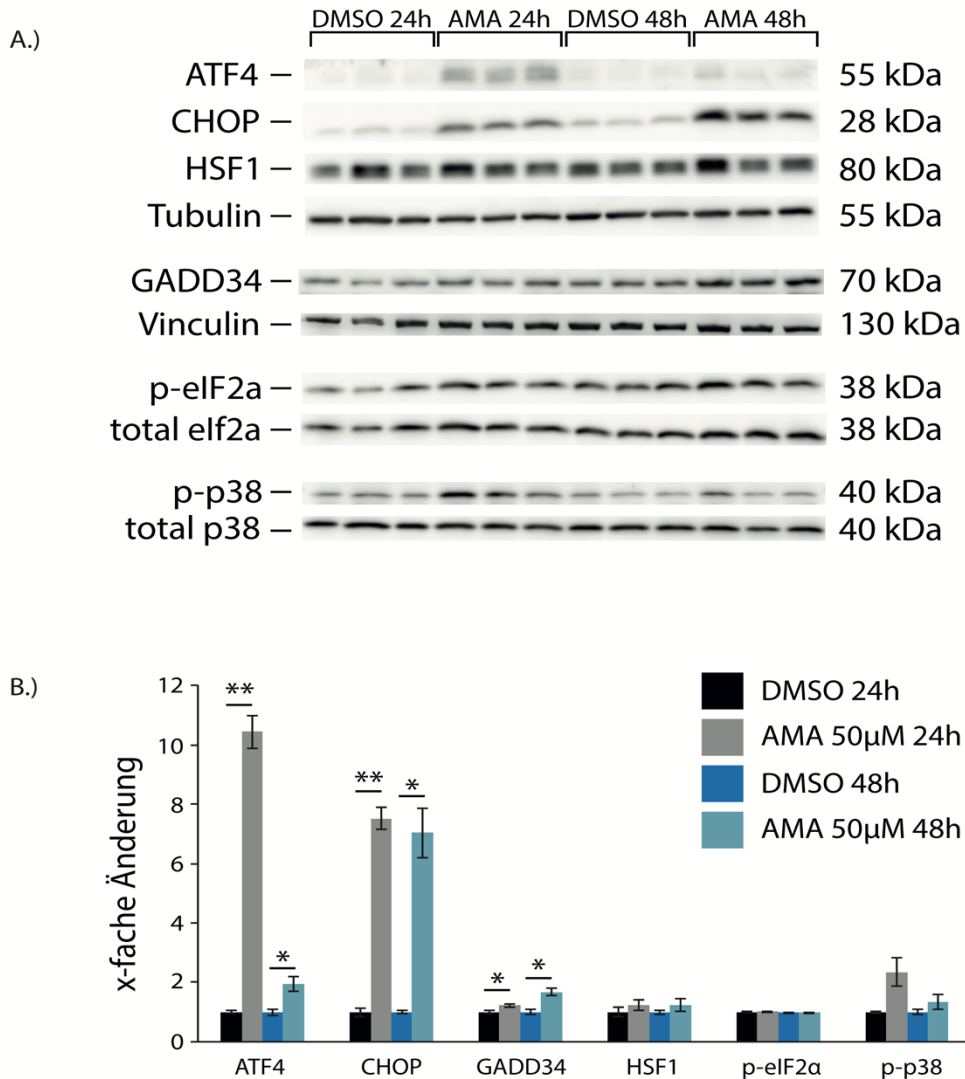


Abbildung 11 Grafische Darstellungen der Western-Blot-Analysen molekularer Stressantworten in H9c2-Zellen nach Behandlung mit AMA bzw. DMSO

A.) Western Blot-Analyse von H9c2-Zellen nach einer Behandlung über 24 und 48 Stunden mit Antimycin A (50 μ M) und DMSO. Dargestellt sind verschiedene Marker von ISR/UPR^{mt} (ATF4, CHOP, GADD34, p-eIF2 α), HSF1 als Marker der Hitzeschockantwort, sowie die stressinduzierte MAP-Kinase p38 (Thr180/Tyr182). Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Werte der DMSO-Proben nach 24 und 48 Stunden wurde jeweils als 1 definiert. Normalisiert wurden ATF4, CHOP und HSF1 auf Tubulin, GADD34 auf Vinculin. P-p38 und p-eIF2 α wurden jeweils auf das entsprechende total p38 und total eIF2 α normalisiert. N = 3 Wells pro Behandlung; *p < 0,05; **p < 0,01.

H9c2-Zellen schienen eine Behandlung mit dem mitochondrialen Komplex-III-Inhibitor Antimycin A gut zu tolerieren. In der Analyse mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich keine morphologischen Veränderungen, die auf einen Zellergang hindeuteten. Die

Ergebnisse der Western Blot-Analysen bestätigten vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe, die eine Induktion von ISR/UPR^{mt} in mit AMA behandelten H9c2-Zellen zeigten¹⁰². Die Aktivierung der *Integrated-Stress-Response* und der *mitochondrialen Unfolded-Protein-Response* als molekulare Stressantworten könnten eine mögliche Erklärung für die hohe Toleranz von H9c2-Zellen und embryonalen Kardiomyozyten gegenüber einer Komplex-III-Inhibition bieten. Nach Erhebung relevanter Vordaten, insbesondere in Bezug auf die Zellkultur-Bedingungen, Wirksamkeit und Dosis von Antimycin A und der Bestätigung vorausgehender Versuche der Arbeitsgruppe, sollte im nächsten Schritt unter anderem die Frage geklärt werden, inwiefern die Ergebnisse auch auf primäre embryonale Kardiomyozyten übertragbar sind.

4.2 Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten der Maus

Wie bereits in Abschnitt 2 beschrieben, ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von H9c2-Zellen auf primäre embryonale Kardiomyozyten nur begrenzt möglich. Trotz einiger phänotypischer und molekularbiologischer Eigenschaften von unreifen Kardiomyoblasten, unterscheiden sich die H9c2-Zellen aus dem embryonalen Rattenherzen in einigen Punkten grundlegend von den embryonalen Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 2), sowohl *in vivo* als auch *in vitro*¹³⁴. So führt die häufige Passage der Zelllinie dazu, dass die Zellen in Morphologie und Gen-Expression zunehmend denen der Skelettmuskulatur entsprechen. Die in H9c2-Zellen fehlende Fähigkeit zur Kontraktion kann den zellulären Metabolismus beeinflussen. Zudem weichen sie in einigen strukturellen und zellbiologischen Eigenschaften von Primärzellen ab (siehe Abschnitt 2)¹⁰⁴. Diese Einschränkungen und Unterschiede müssen bei der Interpretation von Daten aus H9c2-Zellen berücksichtigt werden, wenn dabei translationale Erkenntnisse zur Pathogenese kardialer Erkrankungen angestrebt werden. Die Isolation und Kultivierung von primären embryonalen Kardiomyozyten ermöglicht eine Betrachtung der Zellen außerhalb ihrer Umgebung im Gewebeverbund des Herzens¹³⁵. Dadurch werden *in vitro*-Versuche ermöglicht, die zwar nicht direkt auf ein *in vivo*-Szenario übertragbar sind, jedoch durch die Nutzung primärer Kardiomyozyten ein deutlich höheres translationales Potential bieten als herkömmliche Zelllinien. Unbehandelte embryonale Kardiomyozyten präsentieren sich in der Zellkultur als konfluenter, synchron schlagender Zellverbund mit der Fähigkeit zur Proliferation¹³⁵. Die embryonalen Kardiomyozyten wurden bis zu 48 Stunden in Kultur gehalten.

4.2.1 Embryonale Kardiomyozyten zeigen eine hohe Toleranz gegenüber einer Inhibition von Komplex III der Atmungskette

Mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie wurden die embryonalen Kardiomyozyten im Embryonalstadium 12,0 bis 14,0 dpc zunächst hinsichtlich ihrer Morphologie unter der Behandlung mit Antimycin A beurteilt. Dabei erfolgte die Isolation der embryonalen Kardiomyozyten nur aus den Ventrikeln und der Ausflusstrakt und die Vorhöfe wurden im Rahmen der Präparation entfernt. Die Dissoziation aller Herzen eines Wurfes erfolgte in eine Einzelzell-Suspension mit Ausplattieren des Zellgemisches inklusive der Nicht-Kardiomyozyten, da eine Aufreinigung der Kardiomyozyten nicht erfolgte. Embryonale Kardiomyozyten wurden, entsprechend den Voruntersuchungen an Zelllinien (siehe Abschnitt 4.1.1 bzw. Grün et al. 2022), 24 Stunden lang mit 50 μ M Antimycin A behandelt. Die Behandlung mit DMSO äquimolarer Menge diente auch hier als Kontrollgruppe. Die Phasenkontrastmikroskopie zeigte sowohl bei den mit DMSO behandelten als auch bei den mit AMA behandelten Zellen einen morphologisch nicht zu differenzierenden, kontraktilen und konfluenten Zellrasen (Abbildung 12). Es konnten keine Anzeichen für einen Zelltod, wie bspw. abgelöste oder abgerundete Zellen, nachgewiesen werden und die Zelldichte zeigte sich phasenkontrastmikroskopisch ohne sichtbare Unterschiede.

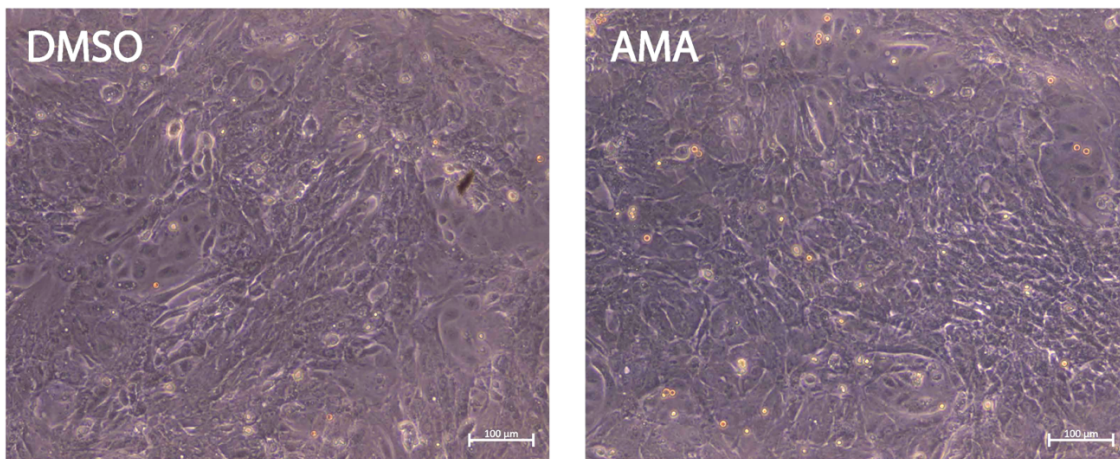


Abbildung 12 Phasenkontrastmikroskopie embryonaler Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit Antimycin A bzw. DMSO

Die repräsentativen Phasenkontrastbilder zeigen über 24 Stunden mit 50 μ M Antimycin A behandelte, embryonale Kardiomyozyten. Im Vergleich dargestellt ist die Kontrollgruppe mit DMSO-Behandlung in äquimolarer Menge. Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 100 μ m.

Um kleinere Veränderungen der Zellzahl und somit gegebenenfalls einen geringgradigen Zellbeziehungsweise Kardiomyozyten-Verlust unter Antimycin A zu detektieren, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Wie bereits zu Beginn des Abschnittes erwähnt, kommt es bei der angewandten Methode zur Isolation der Zellen immer zu einem Zellgemisch

aus Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten. Mithilfe der Immunfluoreszenz gelingt eine Darstellung von Kardiomyozyten innerhalb der Gesamtzellpopulation, sodass unter anderem eine Verschiebung der Zellzusammensetzung 24 Stunden nach AMA-Behandlung getestet werden kann, um so einen selektiven Verlust der Kardiomyozyten auszuschließen.

Zur Unterscheidung der Kardiomyozyten von anderen Zelltypen mithilfe der Immunfluoreszenz wurden zunächst verschiedene Antikörper getestet, die in die embryonale Entwicklung des Herzens involviert sind. Dabei testeten wir drei mögliche Kernmarker: GATA4, MEF2 und Nkx2.5 (Abbildung 13). Bei den getesteten Kernmarkern handelt es sich um von Kardiomyozyten exprimierte Transkriptionsfaktoren, die in kardialen Vorläuferzellen und unreifen Kardiomyozyten exprimiert werden und die Differenzierung der Zellen regulieren¹²².

Während der nachfolgenden Untersuchungen erfolgte die Co-Färbung von Nkx2.5 und α -Actinin (siehe Abschnitt 5.3.1). Hierdurch ist sowohl eine Identifizierung der Kardiomyozyten anhand einer Immunfluoreszenzfärbung der Sarkomerstruktur (in grün), als auch zusätzlich der Anfärbung der Kerne möglich (in rot) (Abbildung 13). Kerne von Nicht-Kardiomyozyten wurden lediglich durch eine Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angezeigt (in blau) (Abbildung 13). Als essentieller Transkriptionsfaktor myokardialer Entwicklung diente das im Kern lokalisierte Nkx2.5 neben dem Sarkomer-Protein α -Actinin der Unterscheidung von Kardiomyozyten innerhalb der verschiedenen Zellpopulationen. In einem dichten, konfluenten α -Actinin-Rasen und teilweise übereinander wachsenden Zellen können Kerne von Nicht-Kardiomyozyten und Kardiomyozyten sonst nicht sicher abgegrenzt werden. Insbesondere bei hoher Zelldichte wäre eine genaue Differenzierung von Kardiomyozyten rein anhand von α -Actinin nur eingeschränkt möglich. In der mittleren bis späten Trächtigkeit wird Nkx2.5 spezifisch für Kardiomyozyten und eignet sich damit für die optische Trennung der Kardiomyozytenkerne¹²².

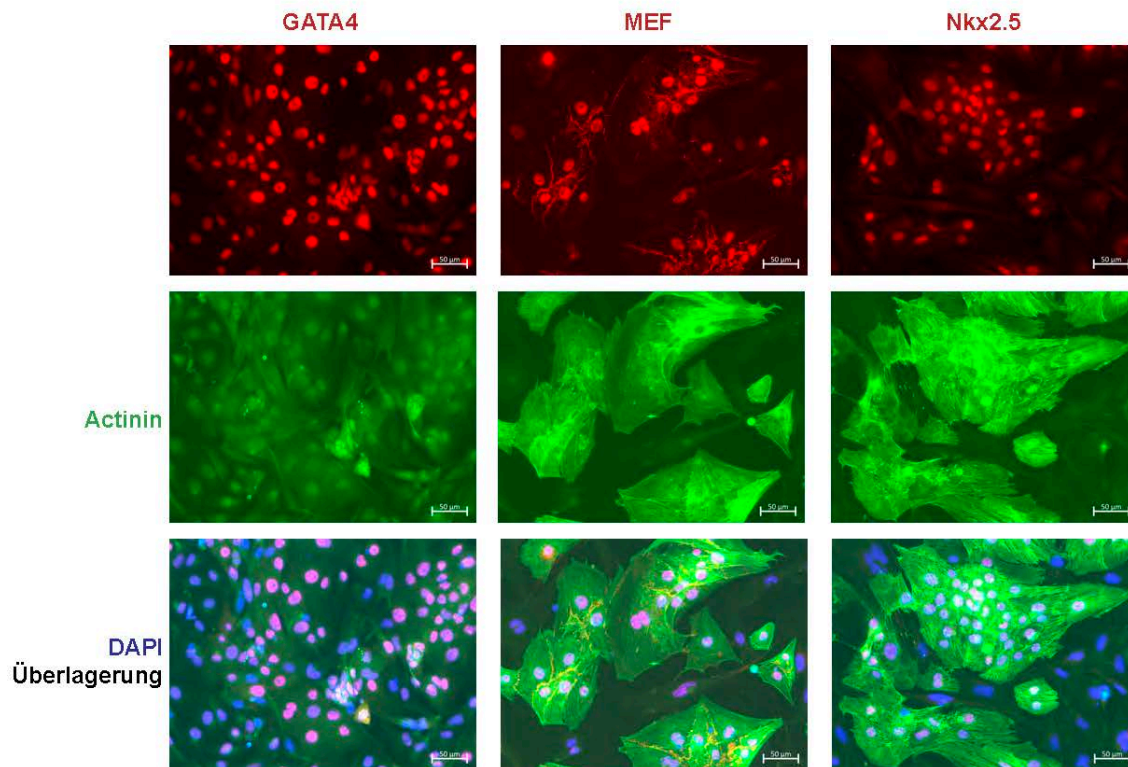
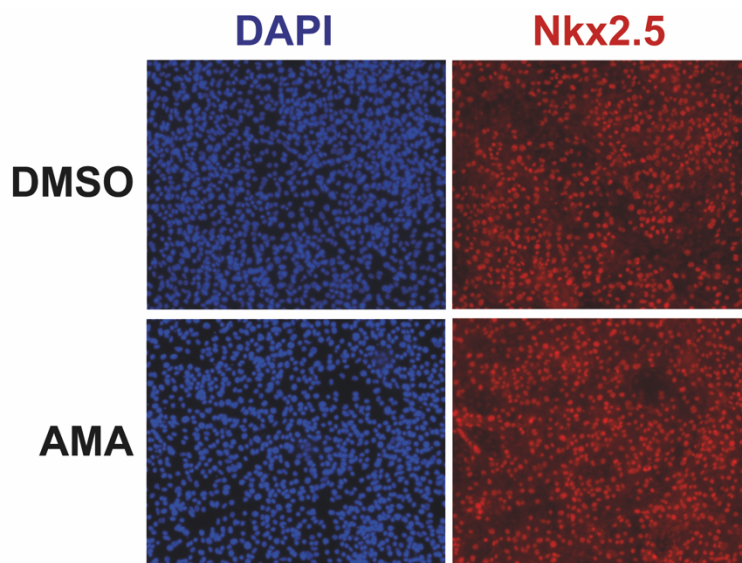


Abbildung 13 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung embryonaler Kardiomyozyten in Kultur

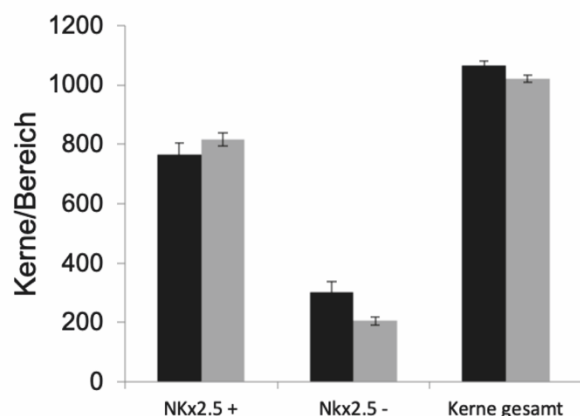
Immunfluoreszenzfärbungen der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4, MEF2 und Nkx2.5 (in rot) zusammen mit dem Sarkomer-Protein α -Actinin (in grün) zur Identifizierung embryonaler Kardiomyozyten innerhalb der gemischten Zellpopulation des embryonalen Herzens 24 Stunden nach Aussaat. In blau dargestellt sind die Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 50 μ m.

24 Stunden nach Behandlung mit Antimycin A zeigte die Zählung der Zellkerne anhand von Nkx2.5 keine Abnahme der Kernanzahl pro Fläche bzw. Bildausschnitt zwischen der DMSO-Kontrolle und einer Komplex-III-Inhibition (Abbildung 14 B). Der Anteil Nkx2.5-positiver Kardiomyozytenkerne an der gesamten Zellpopulation betrug dabei zwischen 60 % und 80 % und blieb auch unter Antimycin-A-Behandlung unverändert zur Kontrollgruppe (Abbildung 14 C). Aus den Daten ergab sich kein Anhalt für einen AMA-induzierten Zellverlust der Kardiomyozyten. Die Nicht-Kardiomyozyten zeigten eine leichte, wenn auch nicht signifikante Reduktion der Zellzahl.

A.)



B.)



C.)

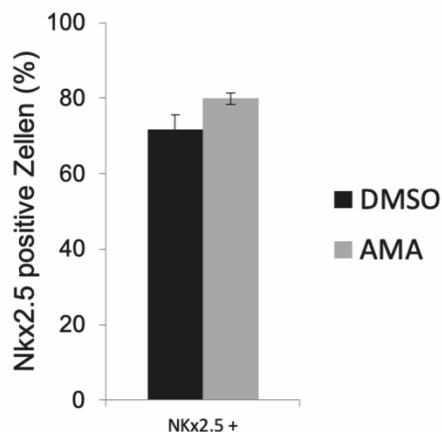


Abbildung 14 Kernzahl embryonaler Kardiomyozyten unter der Behandlung mit Antimycin A

A.) Beispielhafte Darstellung einer Immunfluoreszenzanalyse in 10x-Vergrößerung zur Ermittlung der Kernzahl embryonaler Kardiomyozyten, durch eine Färbung des Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (in rot). In Blau dargestellt sind die Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI.

B.) Zellkerne embryonaler Kardiomyozyten pro Bildausschnitt nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μ M Antimycin A und DMSO-Kontrolle. n = 4 Wells pro Behandlung.

C.) Prozentualer Anteil von Nkx2.5-positiven embryonalen Kardiomyozytenkernen an der Gesamtzahl aller Kerne nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μ M Antimycin A und DMSO-Kontrolle. n = 4 Wells pro Behandlung.

In der Analyse embryonaler Kardiomyozyten nach einer 24-stündigen Behandlung mit 50 μ M Antimycin A mittels Phasenkontrastmikroskopie ließen sich keine wesentlichen Veränderungen der Zellmorphologie oder Zelldichte und kein Anhalt für Zelltod erkennen. Die

Kernzahl und der prozentuale Anteil embryonaler Kardiomyozytenkerne an der Gesamtzahl blieb im Vergleich zu der Kontrollgruppe nach Behandlung mit Antimycin A unverändert.

4.2.2 Embryonale Kardiomyozyten zeigen keinen Verlust ihrer Zellzyklusaktivität unter Antimycin A

Um den Einfluss von Antimycin A auf die Zellzyklusaktivität der Zellen aus dem embryonalen Herzen in Kultur beurteilen zu können, wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen der Anteil der für den nukleären Proliferationsmarker Ki67 positiven Zellen bestimmt. Zur Identifikation der Kardiomyozytenkerne erfolgten auch hier die Untersuchungen in Co-Färbung mit Nkx2.5. Der Antikörper gegen Ki67 wird als Marker für die Zellzyklusaktivität verwendet. Das Kernprotein Ki67 ist an Umbauprozessen des Zellkerns während der Proliferation beteiligt. Das Maximum der Proteinexpression von Ki67 in kultivierten Zellen wird in der G₂- und M-Phase erreicht ^{136,137}. Eine niedrige oder fehlende Ki67-Expression kann einen ruhenden Status der Zellen anzeigen, in dem keine Teilung stattfindet. Der ruhende Status entspricht jedoch einem reversiblen Stadium, in dem ein erneuter Eintritt in den Zellzyklus und damit eine Hochregulation von Ki67 jederzeit möglich ist ¹³⁸. Während es nach 24 h AMA-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion Ki67-positiver Kerne in Relation zu Gesamtkernzahl kam (Abbildung 15B), ergab sich kein wesentlicher Unterschied in der Anzahl Ki67-positiver Kardiomyozyten-Kerne (Abbildung 15C). Nkx2.5-negative Kerne zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion an Ki67-positiven Kernen (Abbildung 15C). Dies spricht für eine verminderte Zellzyklusaktivität in Nicht-Kardiomyozyten, während die Zellzyklusaktivität von embryonale Kardiomyozyten von einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A nicht beeinträchtigt ist. Der Anteil an Ki67-positiven Kernen war unter Nicht-Kardiomyozyten dabei deutlich höher als der von Kardiomyozyten.

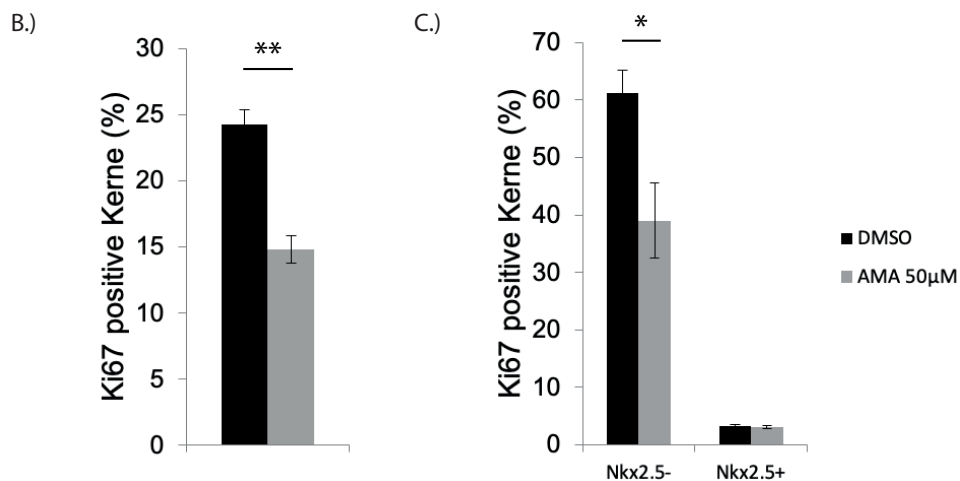
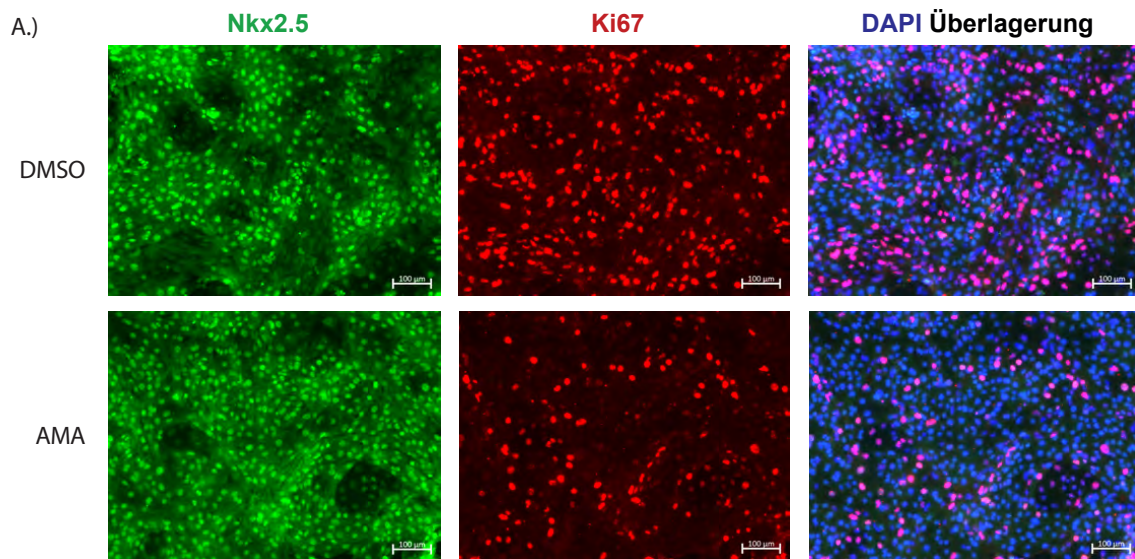


Abbildung 15 Analyse der Zellzyklusaktivität embryonaler Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A

A.) Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Nkx2.5 (in grün) und Ki67 (in rot) unter 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 μ M) oder DMSO. Es erfolgte die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Der Messbalken entspricht einer Länge von 100 μ m.

B.) Embryonale Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit Antimycin A oder DMSO. Bestimmung des Anteils Ki67-positiver Kerne an der Gesamtzahl der Kerne (hier angegeben in %) mittels Immunofluoreszenz. n = 4 Wells pro Behandlung; **p < 0,01.

C.) Embryonale Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit Antimycin A oder DMSO. Die Zellzyklusaktivität wurde anhand der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung in Nkx2.5-negativen Nicht-Kardiomyozytenkernen und Nkx2.5-positiven Kardiomyozytenkernen bestimmt. n = 4 Wells pro Behandlung; *p < 0,05.

Die Reduktion Ki67-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl unter AMA-Behandlung ließ sich somit am ehesten auf die Nicht-Kardiomyozyten zurückführen, die einem Anteil von 20–30 % der Gesamtzellpopulation entsprachen (Abbildung 14). Schlussfolgernd hat die Behandlung mit Antimycin A keinen Einfluss auf die Zellzyklusaktivität der embryonalen Kardiomyozyten, wohingegen andere Zelltypen aus dem Zellzyklus auszutreten scheinen.

4.2.3 Embryonale Kardiomyozyten erhalten ihre Kontraktilität trotz einer Behandlung mit Antimycin A

Die Kontraktilität von Kardiomyozyten ist unter anderem stark durch die metabolische Situation und den Energiehaushalt der Zellen beeinflusst. Ein von oxidativer Phosphorylierung abhängiger Stoffwechsel könnte durch eine Behandlung mit Antimycin A deutlich beeinträchtigt werden, sodass die Versuche unter anderem der Frage nach dem Erhalt der Kontraktilität als eine der primären und essentiellen Funktionen der Kardiomyozyten dienen. Die Kontraktilität von Kardiomyozyten ist abhängig von einer Reihe von Faktoren, darunter die Sarkomerstruktur der Zellen oder auch die Möglichkeit der Umwandlung von ATP in mechanische Energie ¹³⁹. Die Untersuchung der Kontraktion embryonaler Kardiomyozyten unter AMA-Behandlung kann somit auch als indirekter Hinweis für mögliche Schäden von Morphologie oder Metabolismus der Zellen herangezogen werden. Die oben beschriebenen Experimente zeigten, dass embryonale Kardiomyozyten eine Behandlung mit Antimycin A überleben und sogar ihre Zellzyklusaktivität erhalten, weshalb im nächsten Schritt die Frage nach einem Erhalt ihrer Funktionalität geprüft werden soll. Dazu wurden im Rahmen der Phasenkontrastmikroskopie Videos der kontrahierenden Zellen aufgenommen. Im Anschluss wurden mithilfe eines Gitters aus 100 Kästchen (Abbildung 16A) die Felder mit sichtbar kontrahierenden Arealen ausgezählt und somit quantifiziert. Bei der Analyse der mit Antimycin A behandelten Zellen und der Kontrollgruppe nach 24 Stunden, ließ sich kein Unterschied der Kontraktilität erkennen. In beiden Gruppen kam es in rund 98 der 100 Felder zu einer synchronen Kontraktion (Abbildung 16B).

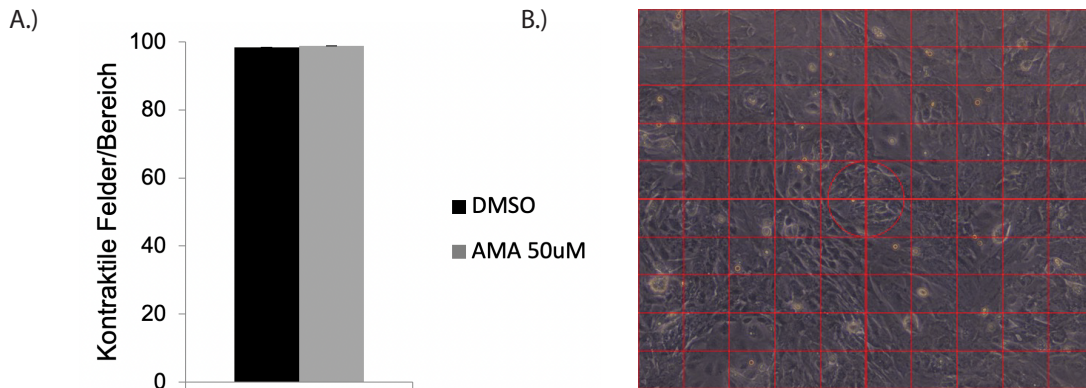


Abbildung 16 Auswertung des Kontraktionsverhaltens embryonaler Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A

A.) Graphische Darstellung der Kontraktilität embryonaler Kardiomyozyten 24 Stunden nach einer Behandlung mit 50 µM Antimycin A und DMSO über 24 h. Für jedes Well wurden 5 Videos aufgezeichnet. n = 3 Wells pro Behandlung.

B.) Embryonale Kardiomyozyten in 20-facher Vergrößerung in der Phasenkontrastmikroskopie. Zur Quantifizierung der Kontraktilität wurde ein Gitter aus 10x10 Kästchen (sichtbar in rot) über Videoaufnahmen der kontrahierenden Kardiomyozyten gelegt. Gezählt wurden die kontraktile Kästchen mit sichtbar kontraktile Bereichen.

Der Erhalt der Kontraktionsfähigkeit bestätigte erneut die hohe Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber einer 24-stündigen Komplex-III-Inhibition mit Antimycin A. Trotz der mitochondrialen Dysfunktion waren die embryonalen Kardiomyozyten in der Lage – durch Erhalt ihrer Kontraktilität – ihrer Hauptfunktion weiterhin nachzukommen. Durch den Nachweis der hohen Toleranz der Kardiomyozyten stellte sich die Frage, was für das Überleben und den Funktionserhalt der Zellen verantwortlich ist. Um der Frage nachzugehen, wurden Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen zur Identifikation möglicher molekularer Mechanismen der Stressantwort eingesetzt.

4.2.4 Embryonale Kardiomyozyten aktivieren die ISR unter Antimycin A

Zur Untersuchung molekularer Mechanismen, die womöglich einen Einfluss auf das Überleben embryonaler Kardiomyozyten unter Antimycin A haben, wurden Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen der in vitro behandelten Zellen durchgeführt. Dadurch sollten mögliche Signalwege der zellulären Stressantwort identifiziert werden, die bei mitochondrialer Komplex-III-Inhibition reguliert beziehungsweise aktiviert werden. Auf Grundlage dieser Versuche konnte zusätzlich ein Vergleich zu vorherigen Ergebnissen aus H9c2-Zellen (siehe Abschnitt 4.1 bzw. Grün et al. 2022) und dem *Hccs*-Knockout Model¹⁰¹ gezogen werden. Die Proteine wurden dabei aus einer Mischkultur von Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten isoliert. Aufgrund des hohen Anteils an Kardiomyozyten (Abbildung 14) kann dabei von einer

Proteinisolation überwiegend aus Kardiomyozyten ausgegangen werden. Die Western-Blot-Analysen embryonaler Kardiomyozyten zeigten, anders als bei H9c2-Zellen (Abbildung 11), eine signifikante Induktion der eIF2 α -Phosphorylierung nach einer AMA-Behandlung (Abbildung 17). EIF2 α ist einer der Schlüsselfaktoren in der Regulation von Translationsprozessen und dient im Rahmen von ISR und UPR^{mt} unter anderem der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase (siehe Abschnitt 1.3.3) ¹⁴⁰. Zu den während ISR und UPR^{mt} induzierten Transkriptionsfaktoren gehören ATF4 und CHOP (siehe Abschnitt 1.3.3). Beide zeigten einen signifikanten Anstieg in den Western-Blot-Analysen embryonaler Kardiomyozyten bei Behandlung mit Antimycin A (Abbildung 17). Eine signifikante Induktion zeigte sich auch für die *Cytochrom C Oxidase subunit IV* (COXIV) (Abbildung 17). Das nukleär codierte COXIV stellt eine Untereinheit der Cytochrom C Oxidase dar, ein Schlüsselenzym (Komplex IV) der mitochondrialen Atmungskette. Aus mehreren Untereinheiten bestehend ist Komplex IV im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung an der Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff beteiligt ¹⁴¹. Als mitochondriales Protein diente es als Indikator für den Mitochondriengehalt. Wie auch in H9c2-Zellen, (siehe Abschnitt 4.1.3) konnte eine Induktion von HSF1 als ein repräsentativer Marker der Hitzeschock-Antwort in mit AMA behandelten embryonalen Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu H9c2-Zellen zeigte sich außerdem keine signifikant vermehrte Expression von GADD34. Ebenfalls nicht im Western Blot nachzuweisen war eine AMA-bedingte Induktion von ATF5 in embryonalen Kardiomyozyten, welcher ebenfalls als ein Hauptakteur bzw. Transkriptionsfaktor der UPR^{mt} gilt (siehe Abschnitt 1.3.3) (Abbildung 17).

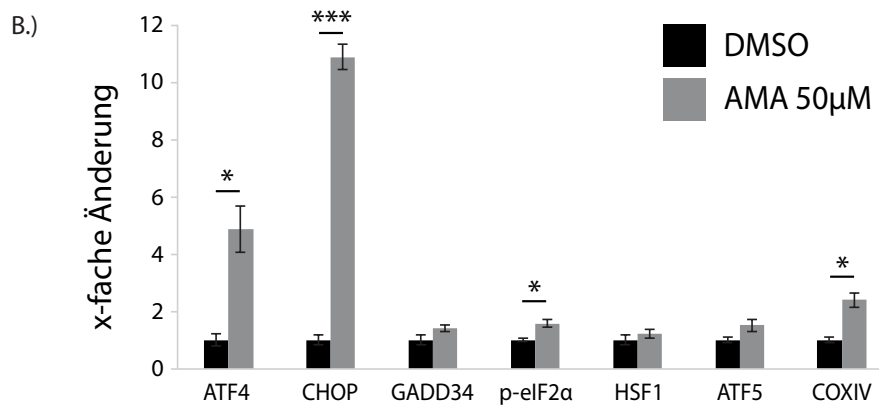
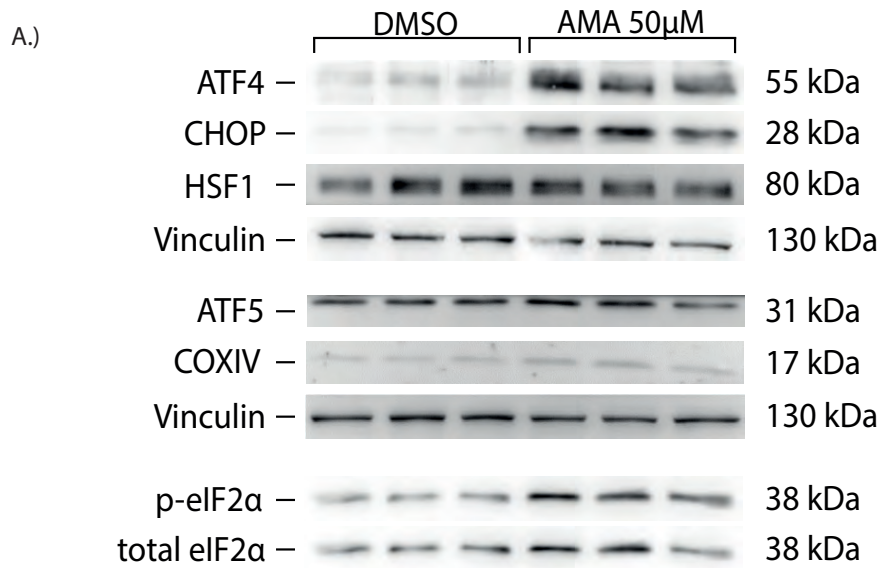


Abbildung 17 Auswertungen von Western-Blot-Analysen stressreaktiver Signalwege in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A

A.) Western Blot von über 24 Stunden mit Antimycin A 50 μ M und DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Dargestellt sind verschiedene Marker von ISR/UPR^{mt} (ATF4, CHOP, GADD34, p-eIF2 α), sowie ATF5 als einen der Schlüsselfaktoren der UPR^{mt} in Säugern. HSF1 diente der Untersuchung der Hitzeschockantwort. COXIV als mitochondriales Protein wurde als Indikator für den Mitochondriengehalt herangezogen. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurden CHOP, ATF4, GADD34, HSF1, ATF5 und COXIV auf Vinculin. p-eIF2 α wurde normalisiert auf total eIF2 α . *p < 0,05; ***p < 0,001; n = 3 Wells pro Behandlung.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen erfolgten Immunfluoreszenzanalysen in embryonalen Kardiomyozyten nach AMA- oder DMSO-Behandlung. Die Darstellung der Zellen in der Immunfluoreszenz ermöglicht eine Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin und damit eine genauere Identifizierung der Kardiomyozyten. Anders als in Western-Blot-Analysen konnten die Versuche somit eine Darstellung der Expression von stressreaktiven Proteinen speziell in Kardiomyozyten – innerhalb des gemischten Zellverbundes aus dem embryonalen Herzen – ermöglichen. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten hierbei eine verstärkte Signalintensität der Transkriptionsfaktoren ATF4 (Abbildung 18) und CHOP (Abbildung 19) in mit AMA inkubierten Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten und bestätigten damit die schon im Western Blot nachgewiesenen Ergebnisse.

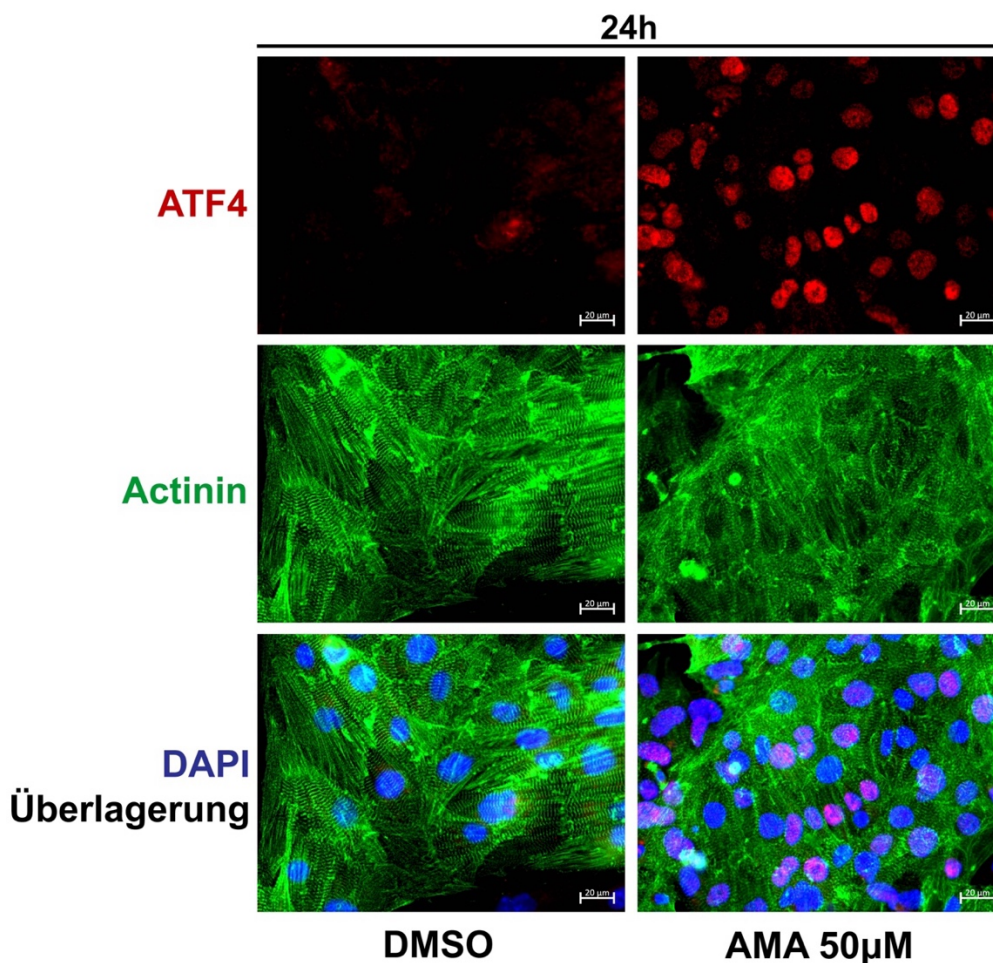


Abbildung 18 Immunfluoreszenzanalysen von ATF4 als Marker molekularer Stressantworten in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten.

Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Transkriptionsfaktors ATF4 (in rot) unter 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 μ M) oder DMSO. Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin (in grün) zur Identifizierung der Kardiomyozyten und die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Der Messbalken entspricht einer Länge von 20 μ m.

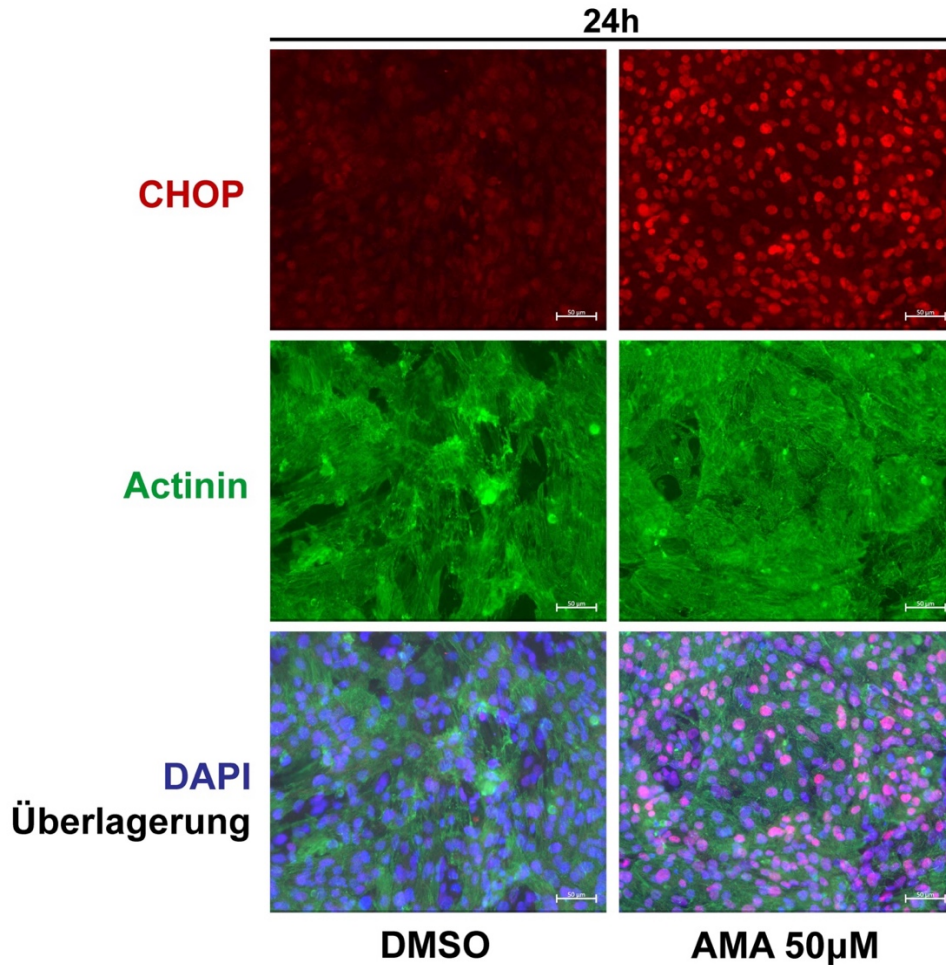


Abbildung 19 Immunfluoreszenzanalysen von CHOP als Marker molekularer Stressantworten in embryonalen Kardiomyozyten

Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Transkriptionsfaktors CHOP (in rot) unter 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 µM) bzw. DMSO. Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin (in grün) zur Darstellung der Kardiomyozyten und die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Der Messbalken entspricht einer Länge von 50 µm.

Im Rahmen der UPR^{mt} kommt es zu der Aktivierung von Genen Mitochondrien-spezifischer Proteine¹⁴². Gene für die mitochondrialen Proteasen wie YME1L1 (*YME1 like 1 ATPase*) und ClpP (*caseinolytic protease proteolytic subunit*) besitzen CHOP-Bindungselemente in ihrer Promoterregion und werden dadurch im Rahmen der UPR^{mt} vermehrt exprimiert⁹⁰. Auch die Induktion der Protease PMPCB (*Mitochondrial-Processing Peptidase Subunit Beta*), lokalisiert in der mitochondrialen Matrix, konnte mit der UPR^{mt} in Verbindung gebracht werden¹⁴³. Für keine der drei Proteasen (ClpP, YME1L1, PMPCB) konnte jedoch eine Induktion unter Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Abbildung 20). Die Ergebnisse geben damit keinen Hinweis auf die Aktivierung einer Mitochondrien-spezifischen Stressantwort.

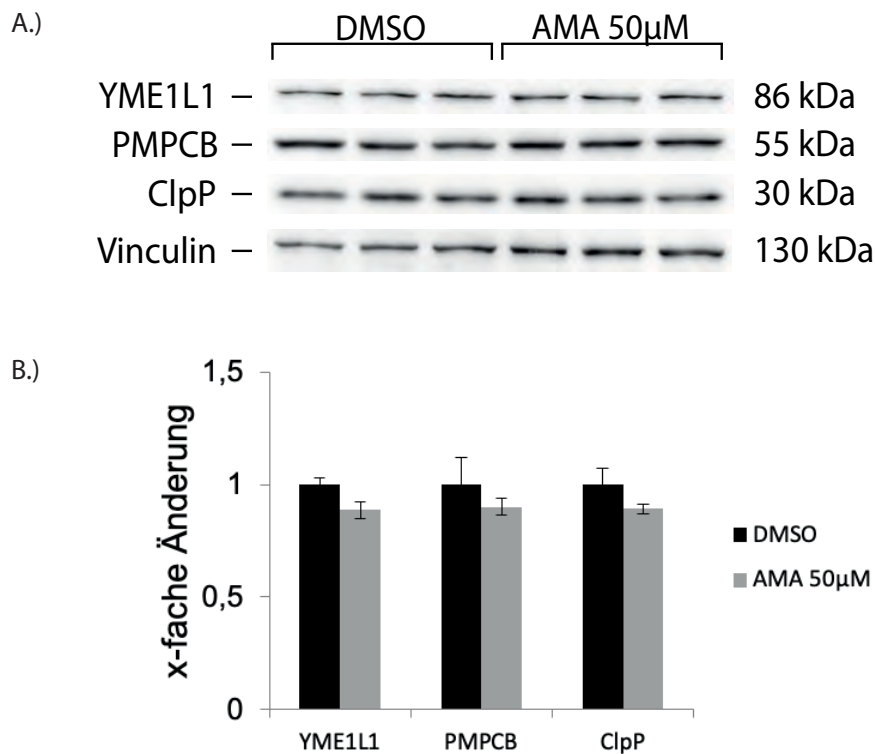


Abbildung 20 Auswertung der Western-Blot-Analysen der Proteasen YME1L1, PMPCB und ClpP der UPR^{mt} unter Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten

A.) Darstellung des Western Blots von über 24 Stunden mit Antimycin A 50 μ M und DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. YME1L1, PMPCB und ClpP stellen Mitochondrien-spezifische Proteine dar, die im Rahmen der UPR^{mt} aktiviert werden. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurden YME1L1, PMPCB und ClpP auf Vinculin. n = 3 Wells pro Behandlung.

Die Ergebnisse zeigten eine Aktivierung protektiver, zellulärer Mechanismen bzw. stressinduzierter Signalwege, insbesondere der ISR, in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A Behandlung. Die Resultate zeigten dabei Parallelen zu vorausgehenden Versuchen an H9c2-Zellen, die ebenfalls eine Induktion von ATF4 und CHOP aufwiesen (Abbildung 11). Anders als in den Zelllinien konnte in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten jedoch keine erhöhte Expression von GADD34 nachgewiesen werden (Abbildung 17). Embryonale Kardiomyozyten hingegen zeigten eine signifikant vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α unter AMA, die in H9c2-Zellen nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 11 bzw. Grün et al., 2022). Die Induktion von ATF4, CHOP und p-eIF2 α weisen dabei auf die Aktivierung der Stressantworten der *Integrated-Stress-Response* hin und könnten somit neben weiteren Mechanismen für die erhöhte Stressresistenz embryonaler

Kardiomyozyten mitverantwortlich sein. Ein Nachweis für die Induktion UPR^{mt} spezifischer Proteasen konnte nicht erbracht werden.

4.2.5 Untersuchung der ER-Stress-Achse in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A

Durch die enge physikalische und molekulare Interaktion zwischen Mitochondrien und ER, unter anderem über verschiedene Kontaktstellen in deren Membranen ¹⁴⁴ ist auch ein Einfluss von Antimycin A auf das Endoplasmatische Retikulum embryonaler Kardiomyozyten denkbar. So konnte bereits ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und der Induktion von ER-Stress gezeigt werden ¹⁴⁵. Kommt es zu einer Dysfunktion der Proteinfaltung innerhalb des ER, beispielsweise durch oxidativen Stress, resultiert dies in einer Aktivierung verschiedener ER-Stress-Mechanismen ¹³². Als ein wichtiger ER-Stress-Sensor gilt das Chaperon BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) ¹⁴⁶ und diente deshalb als solcher in den nachfolgenden Versuchen der Identifizierung von ER-Stress. BiP (oder GRP78) ist im ER-Lumen lokalisiert und bindet unter physiologischen Bedingungen die in der ER-Membran lokalisierte Kinase PERK und den Transkriptionsfaktor ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), zwei wichtige Mediatoren der ER-Stress-Achse. Kommt es zu vermehrtem Stress des Endoplasmatischen Retikulums, entlässt BiP die beiden Proteine aus der Bindung, um seiner Funktion als Faltungshelfer akkumulierter Proteine im ER-Lumen nachzukommen. Somit führt die Dissoziation von BiP unter anderem zu der Aktivierung von PERK ¹³². PERK wiederum kann dann in seiner Funktion als Kinase zu einer Phosphorylierung von eIF2 α führen (siehe Abschnitt 1.3.3) ⁷⁹. Mit AMA behandelte embryonale Kardiomyozyten zeigten nach 24 Stunden eine signifikante Induktion des Chaperons BiP (Abbildung 21).

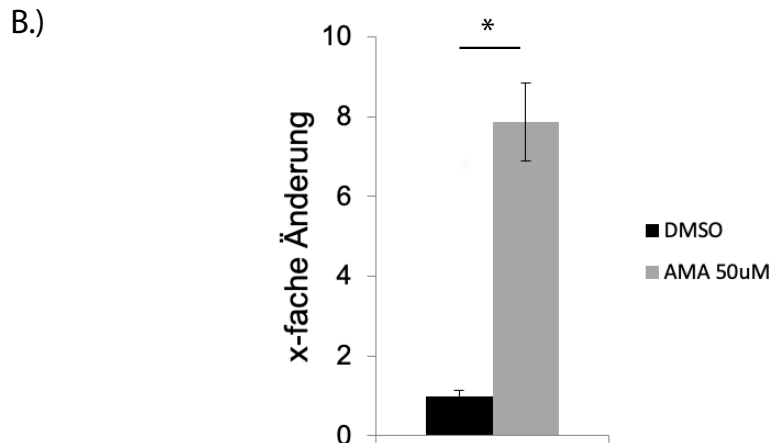
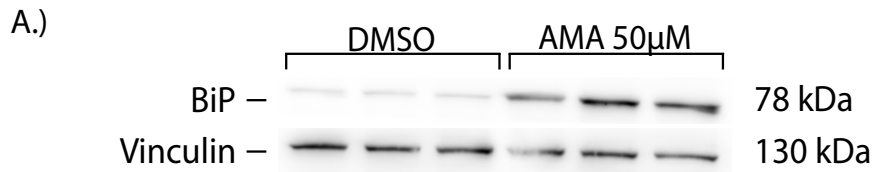


Abbildung 21 Untersuchung des ER-Chaperons BiP (GRP78) mittels Western Blot in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A

A.) Western Blot des ER-Chaperons BiP von über 24 Stunden mit Antimycin A (50 μ M) bzw. DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde BiP auf Vinculin. * $p < 0,05$; $n = 3$ Wells pro Behandlung.

Die in den Western-Blot-Analysen nachgewiesene, signifikante Induktion des ER-spezifischen Chaperons BiP könnte damit auf eine durch Antimycin A induzierte Stressreaktion nicht nur des Mitochondriums, sondern auch des Endoplasmatischen Retikulums hindeuten.

4.3 Untersuchung von oxidativem Stress und antioxidativen Mechanismen in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA

4.3.1 Die Inhibition von Komplex III der Atmungskette führt zu einer deutlichen Zunahme reaktiver Sauerstoffverbindungen

Eine Inhibition der Atmungskette kann zur übermäßigen Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen führen, die insbesondere von Komplex I und III der Atmungskette generiert werden (siehe Abschnitt 1.2.2). Die Produktion mitochondrialer Superoxide wurde durch die Fluoreszenzmikroskopie mithilfe des MitoSOXTM Red Reagenz dargestellt. Embryonale Kardiomyozyten wurden dazu 24 Stunden lang mit Antimycin A bzw. DMSO

behandelt, mit MitoSOX inkubiert und anschließend in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Darstellung der embryonalen Kardiomyozyten nach der 24-stündigen Behandlung zeigte eine deutliche Zunahme der Intensität des MitoSOXTM Red-Fluoreszenzfarbstoffes (Abbildung 22), was für eine vermehrte Produktion der mitochondrialen Hyperoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) spricht. Um eine mögliche Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, wie es bei einem Zelluntergang im Sinne von Apoptose vorkommt, zu visualisieren, wurde das Image-iTTM TMRM Assay Kit verwendet. Im Falle eines nicht mehr intakten Membranpotentials käme es bei Anfärbung mit TMRM zu einer verminderten Akkumulation in den Mitochondrien und damit zu einer reduzierten Signalintensität. Die Darstellung mit TMRM zeigte keine reproduzierbar verminderte Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes in embryonalen Kardiomyozyten nach 24 Stunden AMA-Behandlung im Vergleich zu einer DMSO-Behandlung (Abbildung 22), sodass sich ein Effekt auf das Membranpotential der Mitochondrien nicht sicher nachweisen ließ. In 2 von 3 Versuchen mittels TMRM waren keine Veränderungen des Membranpotentials nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich von einem deutlichen AMA-bedingten Anstieg von Hyperoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) sprechen, der durch die embryonalen Kardiomyozyten jedoch gut toleriert wurde, sodass sich weder in Zellwachstum und -überleben (Abbildung 14), noch bei der Kontraktilität (Abbildung 16) wesentliche Unterschiede zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und der mit 50 μ M Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten zeigten. In Übereinstimmung damit schienen das Membranpotential und die Integrität der Mitochondrien trotz oxidativem Stress weitestgehend intakt zu bleiben.

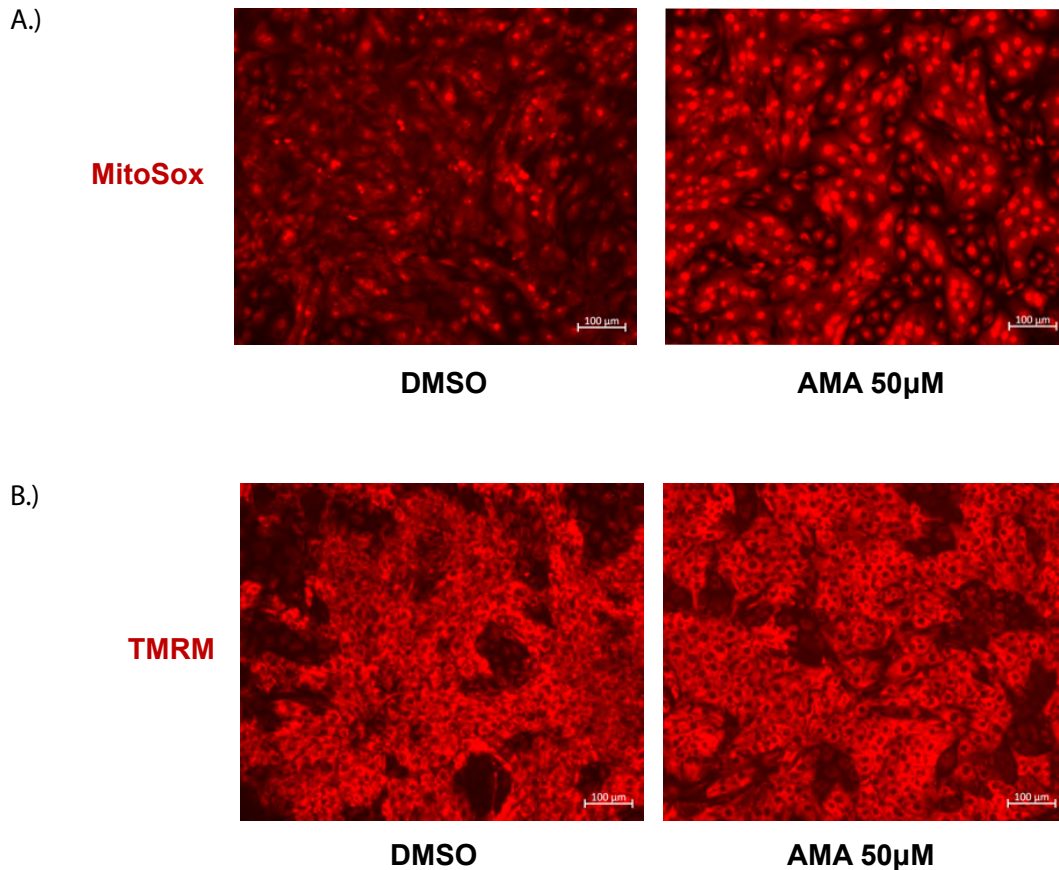


Abbildung 22 Fluoreszenzanalysen zum Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen und dem mitochondrialen Membranpotential in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten

A.) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen embryonaler Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AMA (50 μM) bzw. DMSO und anschließender Inkubation mit MitoSOX, einem rot fluoreszierenden Reagenz zur Detektion mitochondrialer $\text{O}_2^{\cdot-}$. Der Messbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

B.) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen embryonaler Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AMA (50 μM) bzw. DMSO und anschließender Inkubation mit TMRM zur Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials. Der Messbalken entspricht einer Länge von 50 μm .

Zusätzlich zu den MitoSOX-Fluoreszenzanalysen zum Nachweis von oxidativem Stress wurden die Zellen auch auf eine mögliche Hyperoxidierung von Peroxiredoxin hin untersucht. Peroxiredoxine sind an enzymatisch katalysierten, antioxidativen Mechanismen zur Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen beteiligt und tragen ein hoch reaktives Cystein-Zentrum. Kommt es durch Oxidation des Cystein-Thiols zu Cystein-Sulfenyl, wird die weitere Oxidation normalerweise über die Bildung von Disulfidbrücken verhindert und das Peroxiredoxin durch ein Oxidoreduktase in den Ausgangszustand zurückversetzt. Bei oxidativem Stress durch eine anhaltend vermehrte Generierung von ROS (wie H_2O_2), kommt

es zu einer Hyperoxidierung von Peroxiredoxin. Dies führt zu der Oxidation über Sulfensäure ($-SO^{\cdot}$) gefolgt von Sulfinsäure ($-SO_2^{\cdot}$) bis hin zu Sulfonsäure ($-SO_3^{\cdot}$)¹⁴⁹. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Antimycin A zeigten embryonale Kardiomyozyten in der Western-Blot-Analyse einen signifikanten Anstieg der hyperoxidierten Form des Peroxiredoxin (PRDX- SO_3) im Vergleich zu DMSO (Abbildung 23). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Versuchen mit H9c2-Zellen, in denen PRDX- SO_3 vermehrt vorlag¹⁰².

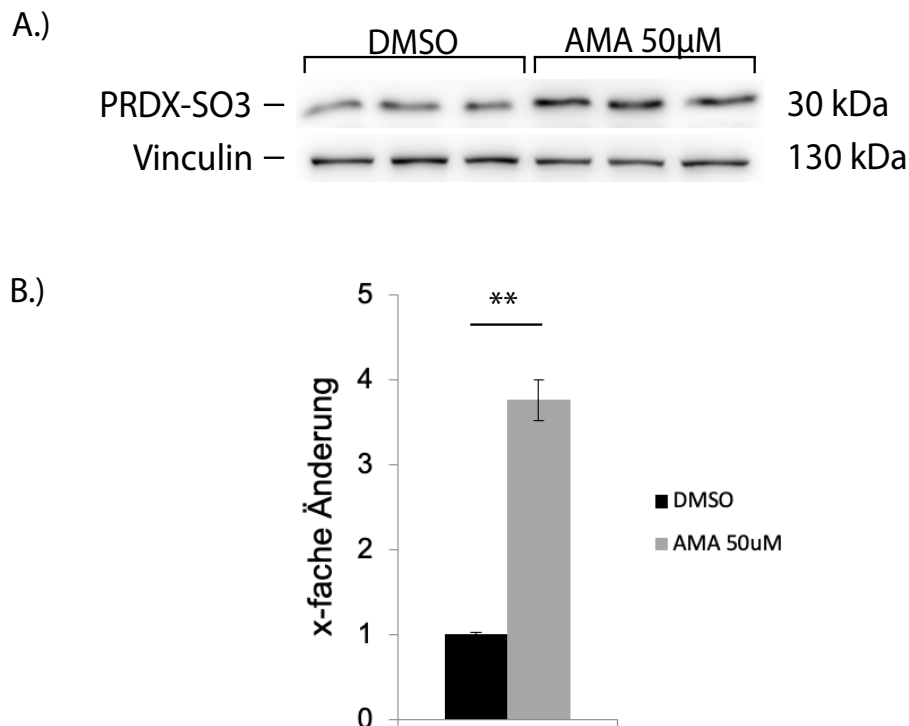


Abbildung 23 Auswertungen der Western-Blot-Analysen von PRDX- SO_3 in embryonalen Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A

A.) Western Blot von PRDX- SO_3 nach Proteinisolierung von über 24 Stunden mit Antimycin A (50 μ M) bzw. DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde PRDX- SO_3 auf Vinculin. ** $p < 0,01$; n = 3 Wells pro Behandlung.

Zusammenfassend zeigten embryonale Kardiomyozyten bei mitochondrialer Komplex-III-Inhibierung einen Anstieg von ROS und die Entstehung von oxidativem Stress. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, zeigten mit AMA behandelte, embryonale Kardiomyozyten trotz des Nachweises von oxidativem Stress keinen Zellverlust oder maßgebliche morphologische Veränderungen, was für eine hohe Toleranz der Zellen gegenüber der vermehrten Ansammlung von ROS spricht. Daraus ergibt sich die Frage nach möglichen antioxidativen

und molekularen Mechanismen, die embryonalen Kardiomyozyten vor den negativen Auswirkungen des oxidativen Stresses schützen.

4.3.2 Embryonale Kardiomyozyten aktivieren antioxidative Mechanismen unter Antimycin A

Um zu untersuchen, welche Mechanismen möglicherweise für die hohe Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber der vermehrten Produktion von ROS bei einer Komplex-III-Inhibierung verantwortlich sein könnten, wurden Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalysen antioxidativer Proteine und Enzyme durchgeführt. HO-1 (Hämoxygenase-1) zeigte in den Western-Blot-Analysen einen signifikanten Anstieg in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 24). HO-1 besitzt durch seine Nebenprodukte des Häm-Abbaus, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Bilirubin, antioxidative Eigenschaften und ist primär im glatten Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, wird jedoch auch in Mitochondrium und Nukleus gefunden. Die Translokation von HO-1 in die Mitochondrien soll die Zellen dabei vor einem durch die Mitochondrien bedingten Zelltod schützen ⁶¹.

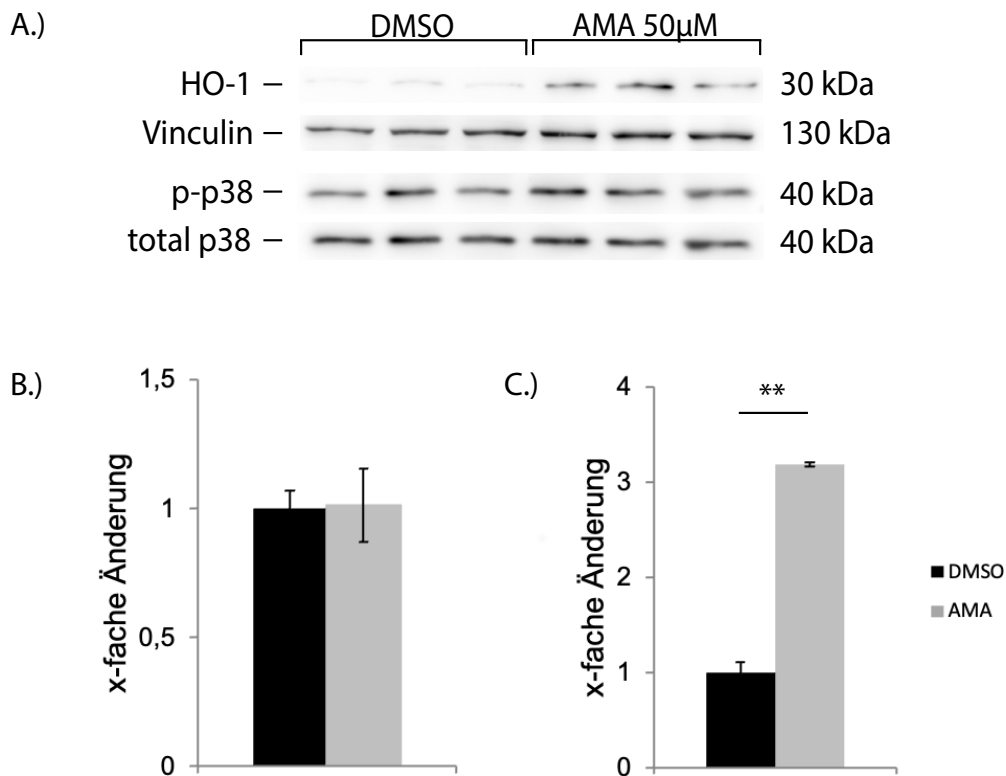


Abbildung 24 Grafische Darstellungen der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von HO-1 und p38 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

A.) Western Blot von HO-1 und p-p38 nach Proteinisolierung von 24 Stunden mit Antimycin A (50 µM) bzw. DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots von p-p38 als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde p-p38 auf total p38. n = 3 Wells pro Behandlung.

C.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots von HO-1 als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde HO-1 auf Vinculin. **p < 0,01; n = 3 Wells pro Behandlung.

Eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von mitochondrialen Hyperoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) spielen die sogenannten Superoxiddismutasen (SOD). In Säugern wird dabei zwischen drei verschiedene Formen unterschieden – SOD1, SOD2 und SOD3. Während SOD1 sich fast ausschließlich intrazellulär im Zytoplasma befindet, beschränkt sich SOD2 auf das Mitochondrium (siehe Abschnitt 1.3.1) ⁵⁸. In unseren Experimenten zeigte sich 24 Stunden nach einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten eine signifikant vermehrte Expression von SOD1, verglichen zur Kontrollgruppe (Abbildung 25). Auch bei SOD2 deuteten die Western-Blot-Analysen auf einen merklichen, jedoch nicht

signifikanten Anstieg in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten hin (Abbildung 25).

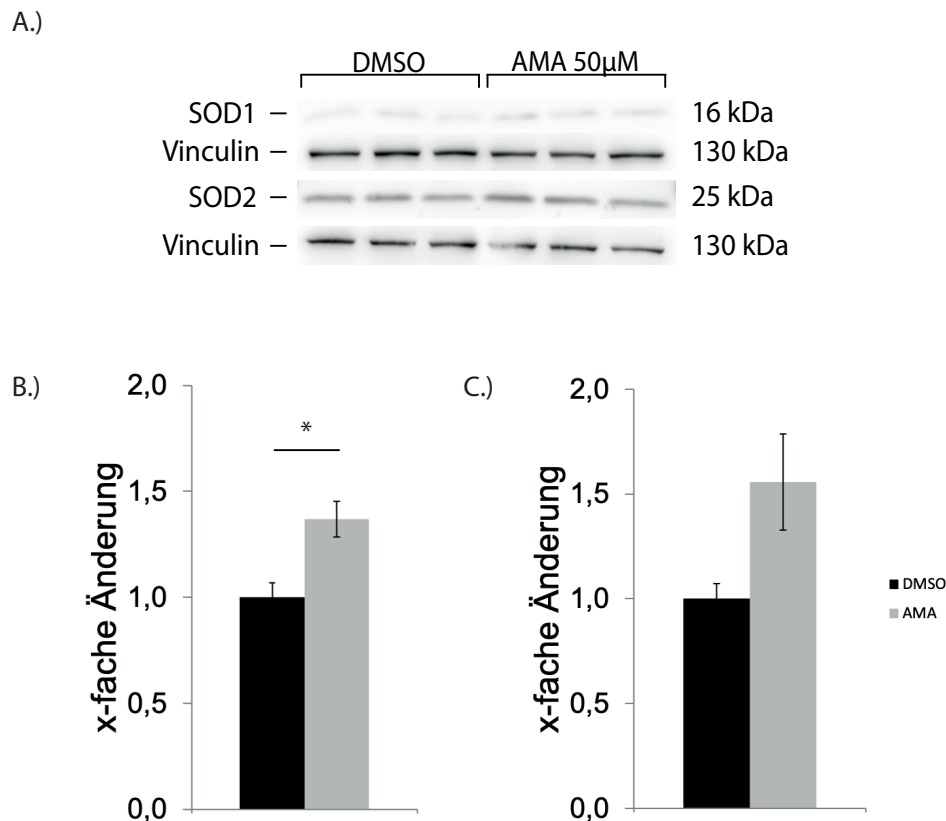


Abbildung 25 Auswertungen der Western-Blot-Analysen von SOD1 und SOD2 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

A.) Western Blot von SOD1 und SOD2 nach Proteinisolierung von 24 Stunden mit Antimycin A (50 μ M) bzw. DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots von SOD1 als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde SOD1 auf Vinculin. * $p < 0,05$; $n = 3$ Wells pro Behandlung.

C.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots von SOD2 als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde SOD2 auf Vinculin. $n = 3$ Wells pro Behandlung.

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe an H9c2-Zellen zeigte sich eine signifikante Induktion des Transkriptionsfaktors *NF-E2-related factor 2* (Nrf2) unter AMA-Behandlung¹⁰². Nrf2 gehört zu den zentralen antioxidativen und zellprotektiven Transkriptionsfaktoren der Zelle als Reaktion auf oxidativen Stress und dient als solcher der Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase⁶³. Als einer der wichtigsten transkriptionellen Regulatoren antioxidativer

Gene ist Nrf2 für die Induktion einer Reihe von antioxidativen und zellprotektiven Genen verantwortlich, darunter die Hämoxygenase 1 (HO-1) und die Superoxiddismutase 2 (SOD2)⁶³, sowie der Superoxiddismutase 1 (SOD1)⁶². Immunfluoreszenzanalysen von für 24 Stunden mit 50 μ M Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten zeigten keine vermehrte Signalintensität des nukleären NRF2 im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe (Abbildung 26).

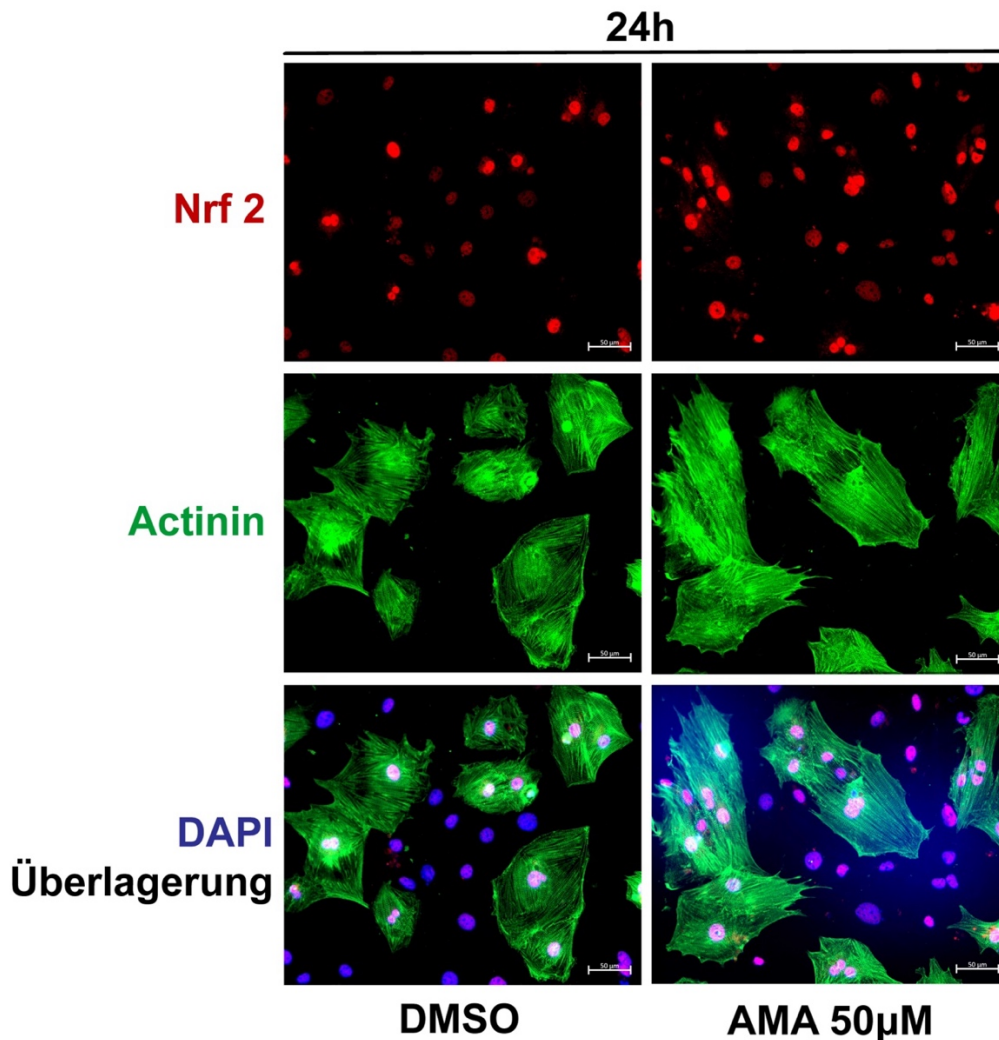


Abbildung 26 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NRF2 in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten

Repräsentative Immunfluoreszenzdarstellung von NRF2 (in rot). Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin (in grün) zur Darstellung der Kardiomyozyten und die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Die Immunfluoreszenzanalysen erfolgten nach 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 μ M) und DMSO-Kontrolle.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen zeigten eine signifikant erhöhte Expression von PRDX-SO3 (Abbildung 23), HO-1 (Abbildung 24) und SOD1 (Abbildung 25) unter AMA-Behandlung, hindeutend auf erhöhte Spiegel reaktiver Sauerstoffverbindungen und die

gleichzeitige Aktivierung antioxidativer Mechanismen in embryonalen Kardiomyozyten. Während in Western-Blot-Analysen eine Induktion von HO-1 in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A gezeigt werden konnte, war keine vermehrte Signalintensität von Nrf2 in der Immunfluoreszenz nachweisbar. Auch wenn sich eine vermehrte Bildung von ROS im Zuge einer Komplex-III-Inhibierung zeigte, blieben mikroskopisch unveränderte und kontrahierende embryonale Kardiomyozyten mit erhaltener Zellzyklusaktivität sichtbar.

4.3.3 Veränderung der Verteilungsmuster intramitochondrialer Proteine in embryonalen Kardiomyozyten nach Komplex-III-Inhibierung

SOD2 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, in der auch im physiologischen Zustand der Zelle ein Großteil der Produktion freier Radikale durch die Atmungskette entsteht. Als Superoxiddismutase katalysiert SOD2 die Umwandlung des $O_2^{\cdot-}$ in das weniger reaktive H_2O_2 und wirkt somit gegenüber freien Radikalen protektiv¹⁵⁰. Die Immunfluoreszenzanalyse von SOD2 deutete auf eine intrazelluläre Umverteilung des Enzyms hin. Die DMSO-Kontrolle zeigte die typische, vor allem perinukleäre Anordnung von Mitochondrien und damit auch intramitochondrialer Proteine. Antimycin-A-behandelte Zellen hingegen zeigten eine deutlich diffusere und bis in die Peripherie reichende Anfärbung von SOD2 (Abbildung 27).

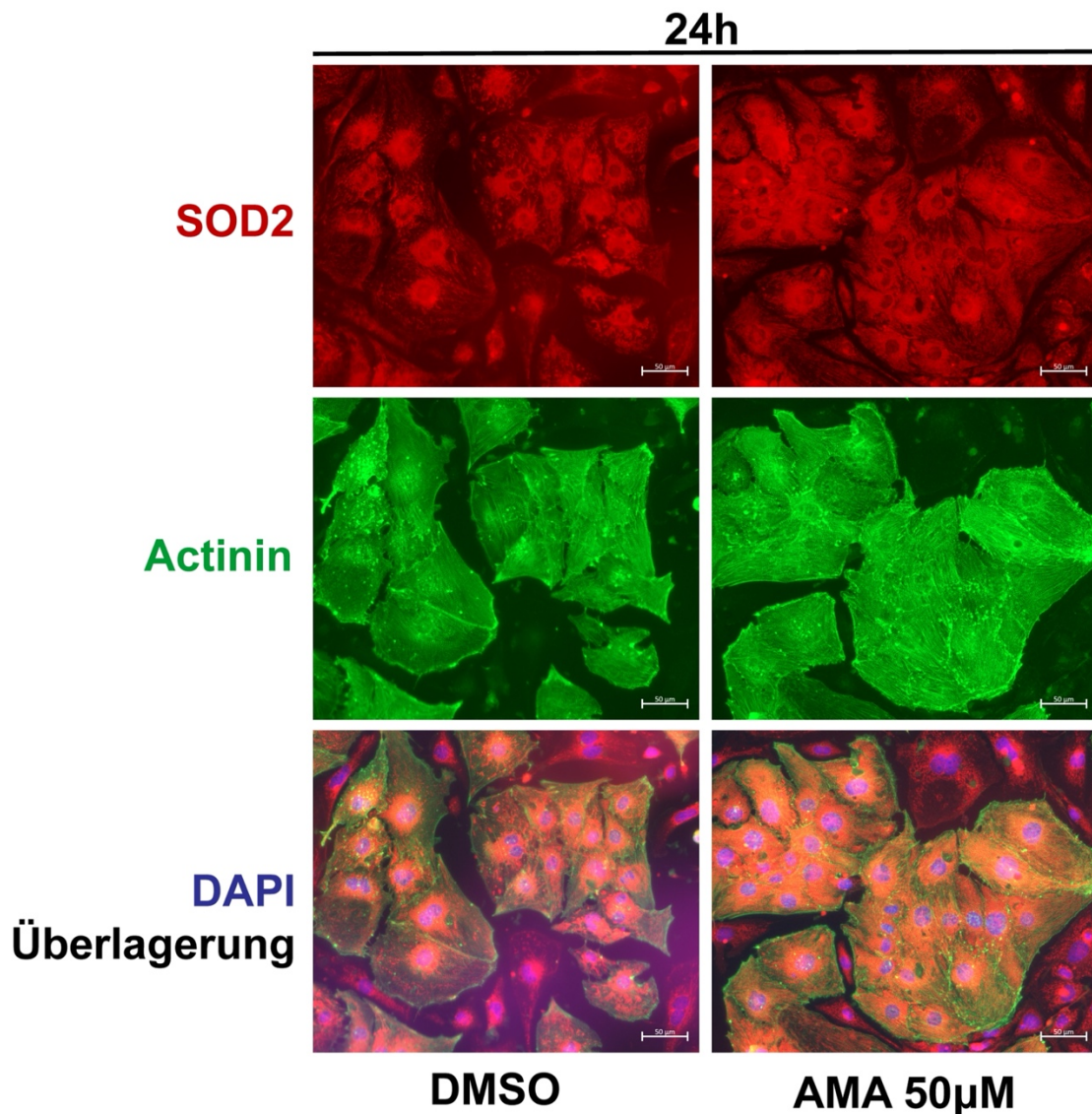


Abbildung 27 Immunfluoreszenzanalysen von SOD2 in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten

Repräsentative Immunfluoreszenzdarstellung von SOD2 (in rot). Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin (in grün) zur Darstellung der Kardiomyozyten und die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Die Immunfluoreszenzanalysen erfolgten nach 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 μ M) und DMSO-Kontrolle. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 50 μ m.

Ein weiteres Protein, das in den Mitochondrien lokalisiert ist und somit auf eine mögliche Umstrukturierung der Mitochondrien innerhalb der Zelle hindeuten kann, ist HSP60. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, dient HSP60 – ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Chaperon – primär der Faltung löslicher, monomerer Proteine. Damit stellt die Induktion von HSP60 eine wichtige Reaktion der Zellen auf proteotoxischen Stress dar⁷⁴. HSP60 zeigte in den Western-Blot-Analysen keinen signifikanten Anstieg in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 28).

Immunfluoreszenzanalysen deuten jedoch auf eine vermehrte Signalintensität von HSP60 in AMA-behandelten, embryonalen Kardiomyozyten (Abbildung 29).

HSP60 zeigte nach Behandlung mit Antimycin A in der Immunfluoreszenz zudem eine deutliche Anfärbung bis in die Peripherie der embryonalen Kardiomyozyten. Im Vergleich dazu zeigt sich in den mit DMSO behandelten Kardiomyozyten eine primär perinukleäre Verteilung des Proteins. Die veränderte intrazelluläre Verteilung von HSP60 und SOD2 als mitochondriale Proteine könnte somit auf eine Umstrukturierung der Mitochondrien als Antwort auf den zellulären Stress hindeuten.

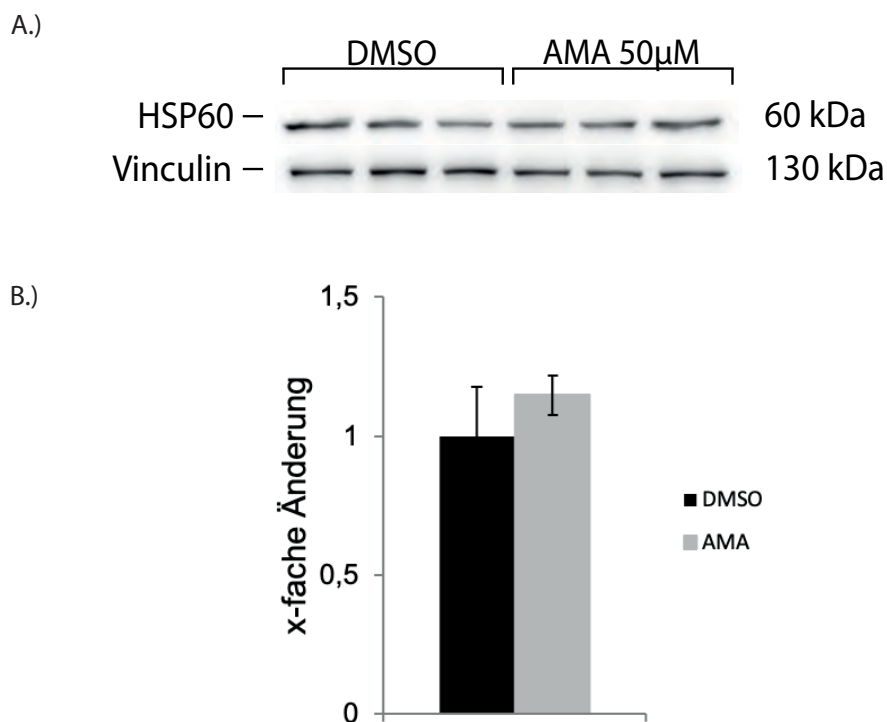


Abbildung 28 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von HSP60 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

A.) Western Blot von HSP60 nach Proteinisolierung von über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Antimycin A (50 μ M) bzw. DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurden HSP60 auf Vinculin. n = 3 Wells pro Behandlung.

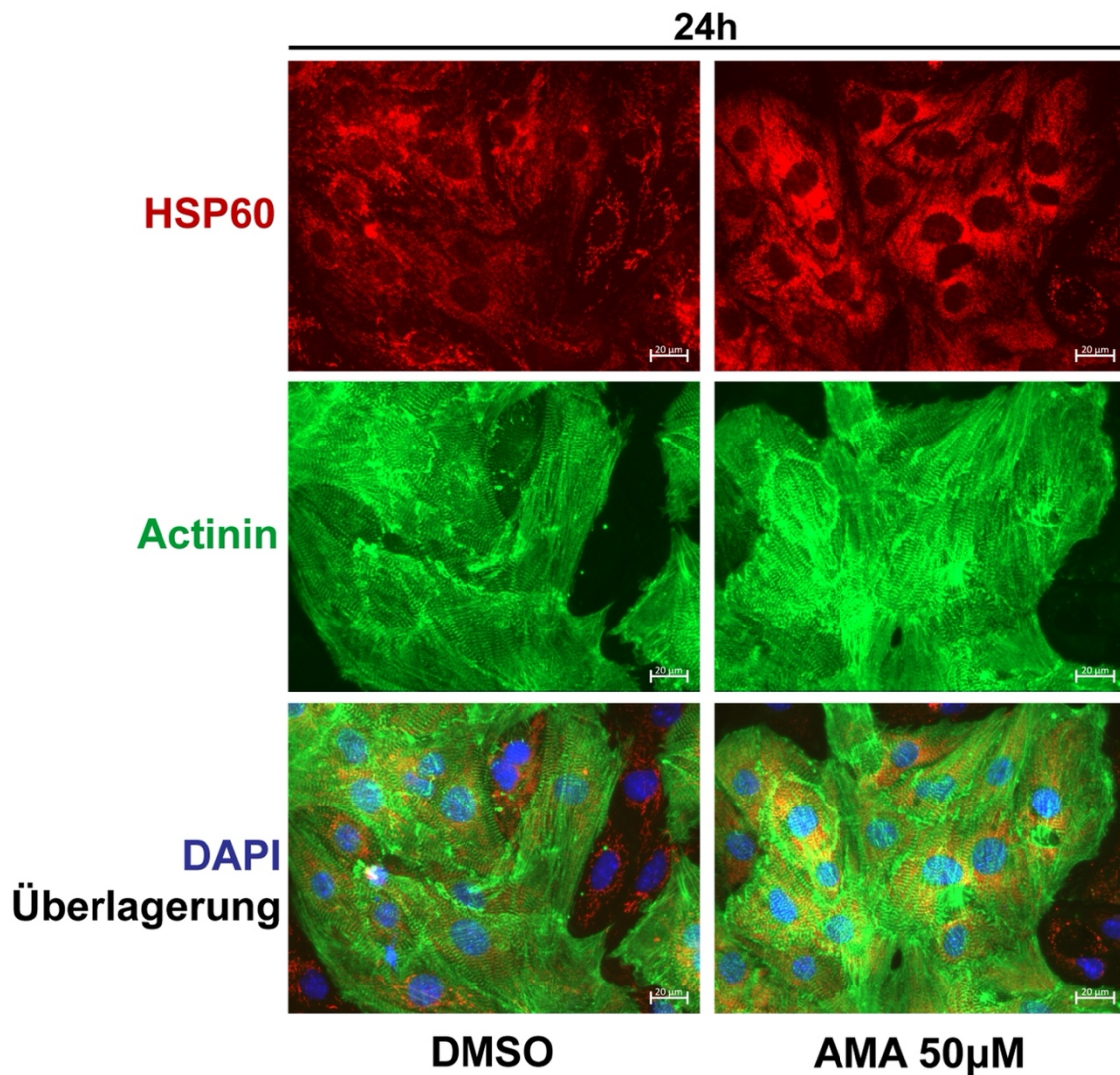


Abbildung 29 Immunfluoreszenzanalyse von HSP60 in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A

Repräsentative Immunfluoreszenzdarstellung von HSP60 (in rot). Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Strukturprotein α -Actinin (in grün) zur Darstellung der Kardiomyozyten und die Darstellung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Immunfluoreszenzanalysen erfolgten nach 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Antimycin A (50 μ M) und DMSO-Kontrolle. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 20 μ m.

4.4 Komplex-III-Inhibition in adulten Maus-Kardiomyozyten durch Antimycin A

4.4.1 Adulte Kardiomyozyten zeigen einen deutlichen Zellverlust bei Behandlung mit Antimycin A

Isolierte, adulte Kardiomyozyten präsentieren sich als stäbchenförmige, meist bi- oder multinukleäre, in ihrer Sarkomerstruktur streng organisierte Zellen. Sie können dabei ihre Fähigkeit zur Kontraktion auch in Kultur beibehalten. Jedoch ist ihre Morphologie abhängig von der Zeit, die sie in Kultur gehalten werden. So kommt es im Verlauf zu einer Dedifferenzierung der adulten Kardiomyozyten, mit zunehmender Abweichung zu einem in-vivo-Szenario¹⁰³. Unter anderem aus diesem Grund werden die meisten, in der Literatur beschriebenen Experimente innerhalb von 24 Stunden nach Präparation durchgeführt¹⁰³. Eine Fähigkeit zur Proliferation besteht bei den isolierten, adulten Kardiomyozyten nicht. Während embryonale Kardiomyozyten eine Behandlung mit Antimycin A in einer Konzentration von 50 µM über 24 Stunden gut tolerierten (siehe Abschnitt 4.2.1), zeigten adulte Kardiomyozyten bei gleicher Konzentration innerhalb kürzester Zeit einen Zelluntergang (Abbildung 30). Abbildung 30 zeigt zum einen die typischen, stäbchenförmigen Kardiomyozyten unter DMSO-Behandlung. Die adulten Kardiomyozyten zeigten jedoch bereits nach 15 Minuten unter einer Behandlung mit Antimycin A in der gleichen Konzentration, die auch bei embryonalen Kardiomyozyten über 24 Stunden verwendet wurde (50 µM), abgerundete, nicht mehr adhärente Zellen als Zeichen für einen Zelltod. Es zeigten sich eine Fragmentierung und Kontraktur der Zellen, eine Kontraktion und damit Funktionalität der Kardiomyozyten war nicht mehr nachweisbar.

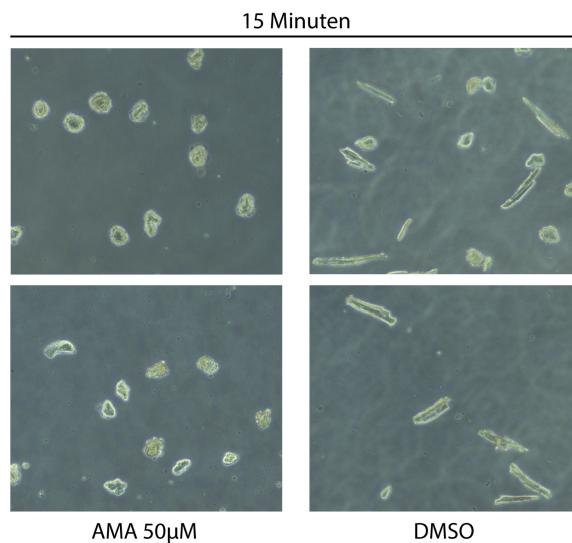


Abbildung 30 Morphologie adulter Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A (AMA)

Repräsentative Phasenkontrastbilder adulter Kardiomyozyten in 20-facher Vergrößerung nach 15-minütiger Behandlung mit 50 μM Antimycin A. Im Vergleich dargestellt ist die Kontrollgruppe behandelt mit der Trägersubstanz DMSO in äquimolarer Menge.

Zusammenfassend ließ sich bereits nach kürzester Zeit ein deutlicher Unterschied zwischen mit AMA behandelten, adulten Kardiomyozyten und der DMSO-Kontrollgruppe in der Phasenkontrastmikroskopie darstellen. Während embryonale Kardiomyozyten eine 24-stündige Behandlung bei einer Konzentration von 50 μM AMA tolerierten, bestanden bei adulten Kardiomyozyten bei gleicher Konzentration bereits nach wenigen Minuten deutliche morphologische Veränderungen und Anzeichen für den Zelltod.

4.4.2 Aktivierung der ISR in adulten im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

Wie in Abschnitt 4.4.1 dargestellt, zeigten sich adulte Kardiomyozyten deutlich sensibler gegenüber der Behandlung mit Antimycin A als embryonale Kardiomyozyten. Bereits nach kurzer Zeit führte die Behandlung mit dem Komplex-III-Inhibitor zu morphologischen Veränderungen bzw. dem Zelluntergang der adulten Zellen (siehe Abbildung 30). Bei einer Konzentration von 50 μM Antimycin A, wie sie auch bei der Behandlung embryonaler Kardiomyozyten verwendet wurde, zeigten sowohl Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe (Abbildung 31) als auch entsprechende Verifizierungen im Rahmen dieser Arbeit zur ISR im Western Blot bei adulten Kardiomyozyten zu einem Zeitpunkt von 15 und 30 Minuten keinen Anstieg von ATF4 und CHOP. Auch eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α konnte nicht nachgewiesen werden. CHOP und p-eIF2 α zeigten sich in adulten Kardiomyozyten nach AMA-

Behandlung zu einem Zeitpunkt von 15 und 30 Minuten sogar signifikant reduziert, was tendenziell auch für ATF4 gilt (Abbildung 31).

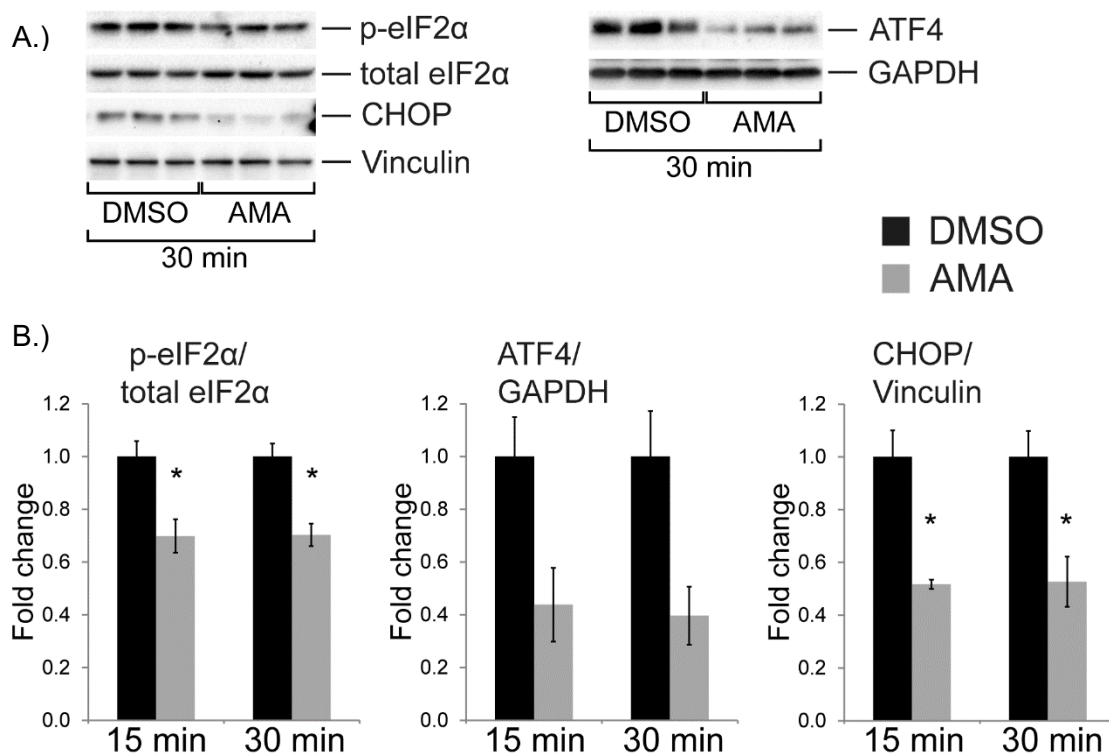


Abbildung 31 Adulte Kardiomyozyten zeigten keine Aktivierung ISR spezifischer Marker nach hochdosierter AMA-Behandlung

A.) Western-Blot-Ergebnisse von p-eIF2α sowie den Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP von über 30 Minuten mit Antimycin A (50 μM) und DMSO behandelten, adulten Kardiomyozyten.

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde p-eIF2α auf eIF2α. ATF4 wurde auf GAPDH, CHOP auf Vinculin normalisiert. *p < 0,05; n = 3 Wells pro Behandlung. Die dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen von Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe generiert, im Verlaufe dieser Arbeit aber durch eigene Daten verifiziert.

Bei hohen Konzentrationen von Antimycin A kam es bei adulten Kardiomyozyten bereits nach wenigen Minuten zu einem deutlichen Zelluntergang (siehe Abschnitt 4.4.1). Daher wurde nach einer Konzentration gesucht, die ein längeres Überleben der adulten Kardiomyozyten ermöglicht und somit eine Reaktion der Zellen im Sinne einer Aktivierung von molekularen Stress-Antworten erlaubt. Um eine geeignete Dosis von Antimycin A für die Beurteilung adulter Kardiomyozyten zu finden, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors behandelt. Im Anschluss wurden Phasenkontrastbilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt und somit mögliche morphologische Veränderungen detektiert. Um eine geeignete Konzentration für die Behandlung der Zellen mit Antimycin A zu finden, wurden

diese zunächst mit 0,5 μM , 1 μM und 2 μM AMA behandelt und über einen Zeitraum von zwei Stunden mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie beobachtet. Während embryonale Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μM Antimycin A keine morphologischen Veränderungen zeigten und weiterhin ihre Fähigkeit zur Kontraktion beibehielten, waren bei adulten Kardiomyozyten bereits nach zweistündiger Behandlung und einer Konzentration von nur 1 μM Antimycin A deutliche zellmorphologische Veränderungen nachweisbar (Abbildung 32). Die DMSO-Kontrollgruppe zeigte die typische Morphologie isolierter, adulter Kardiomyozyten im Sinne einzelner, stabförmiger Zellen. Im Vergleich dazu rundeten sich die mit Antimycin A behandelten Zellen zunehmend ab und verloren bereits nach kürzester Zeit ihre Adhärenz. Es zeigten sich zudem eine Fragmentierung und Verkürzung bzw. Kontraktur der Zellen und aktiv kontrahierende Zellen waren nur noch vereinzelt nachweisbar. Erste Anzeichen für einen Zelluntergang waren im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten somit bereits bei deutlich geringerer Konzentration und zu deutlich früheren Zeitpunkten des Inhibitors zu sehen.

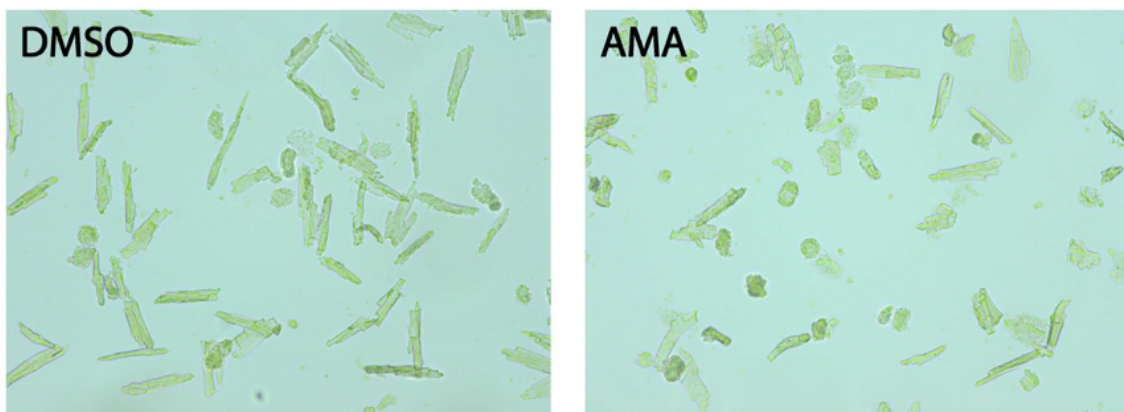


Abbildung 32 Morphologie adulter Kardiomyozyten nach Behandlung mit 1 μM Antimycin A

Repräsentative Phasenkontrastbilder adulter Kardiomyozyten in 10-facher Vergrößerung nach zwei stündiger Behandlung mit 1 μM Antimycin A. Im Vergleich dargestellt ist die Kontrollgruppe behandelt mit der Trägersubstanz DMSO in äquimolarer Menge.

Nachfolgend sollte daher geklärt werden, ob die geringe Toleranz adulter Kardiomyozyten gegenüber AMA auf Unterschiede der molekularen Stressantwort gegenüber embryonalen Kardiomyozyten zurückzuführen sein könnte. Für die Proteinisolierung wurde eine Konzentration von 1 μM AMA zu einem Zwei-Stunden-Zeitpunkt gewählt. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine morphologische Stressreaktion in einem Teil der adulten Kardiomyozyten deutlich, bei gleichzeitig jedoch überwiegend intakten Kardiomyozyten. Um die Vergleichbarkeit der Dynamik der molekularen Stress-Antwort zu gewährleisten, erfolgte die Proteinisolierung embryonaler Kardiomyozyten nach AMA-Behandlung mit 50 μM ebenfalls noch einmal zu

einem Zeitpunkt nach zwei Stunden. Wie auch nach 24-stündiger AMA-Behandlung, zeigten embryonale Kardiomyozyten im Western Blot auch nach 2 Stunden einen signifikanten Anstieg von p-eIF2 α . Neben den embryonalen Kardiomyozyten zeigten auch die adulten Kardiomyozyten nach 2 Stunden AMA-Behandlung einen signifikanten Anstieg des phosphorylierten eIF2 α (Abbildung 33). Ebenfalls auffällig war der deutliche Unterschied von total eIF2 α in Bezug auf sein Molekulargewicht, sodass die Bande von total eIF2 α in adulten Kardiomyozyten deutlich über der von embryonalen Kardiomyozyten zur Darstellung kam (Abbildung 33).

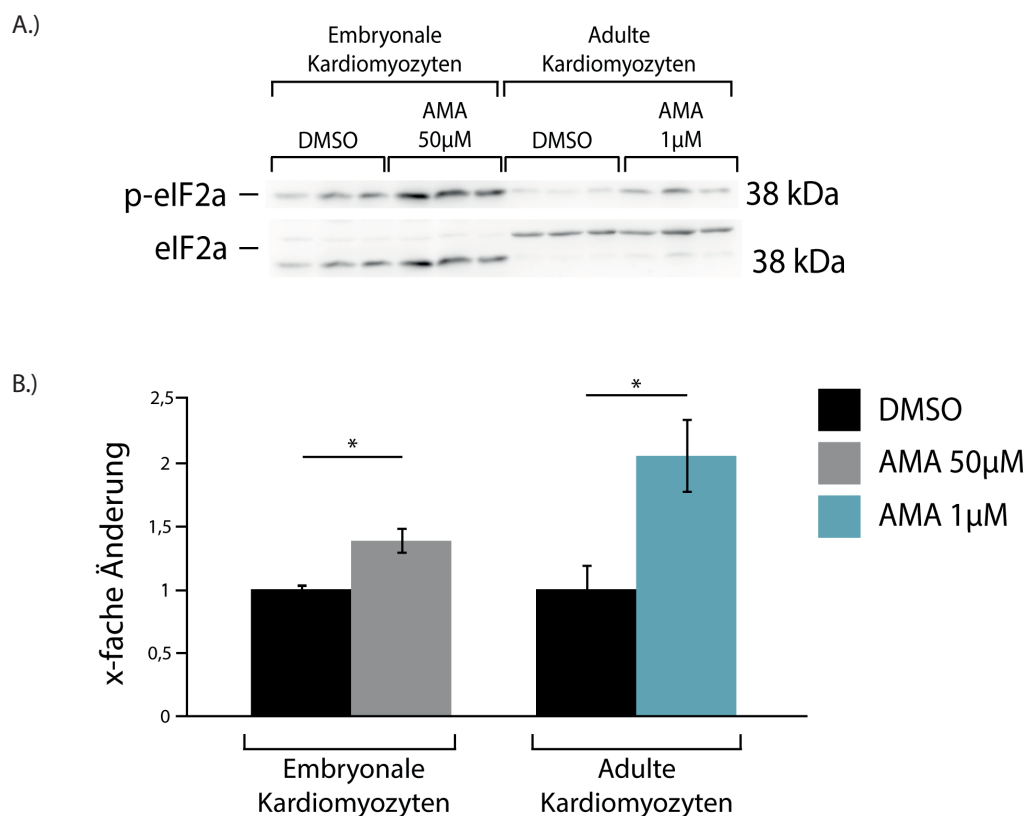


Abbildung 33 Western-Blot-Analysen von p-eIF2 α in mit Antimycin A behandelten, embryonalen und adulten Kardiomyozyten

A.) Western Blot von p-eIF2 α von über 2 Stunden mit Antimycin A bzw. DMSO behandelten, embryonalen (50 μ M AMA) und adulten (1 μ M AMA) Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde p-eIF2 α auf eIF2 α . *p < 0,05; n = 3 Wells pro Behandlung.

Während CHOP sich in AMA-behandelten embryonalen Kardiomyozyten auch zu einem Zeitpunkt von zwei Stunden im Vergleich zu DMSO signifikant erhöht zeigte, konnte eine

Induktion des Transkriptionsfaktors in adulten Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 34). In adulten Kardiomyozyten kam es unter der Behandlung mit 1 μM Antimycin A bereits nach zwei Stunden zu einer deutlichen Reduktion des Transkriptionsfaktors CHOP.

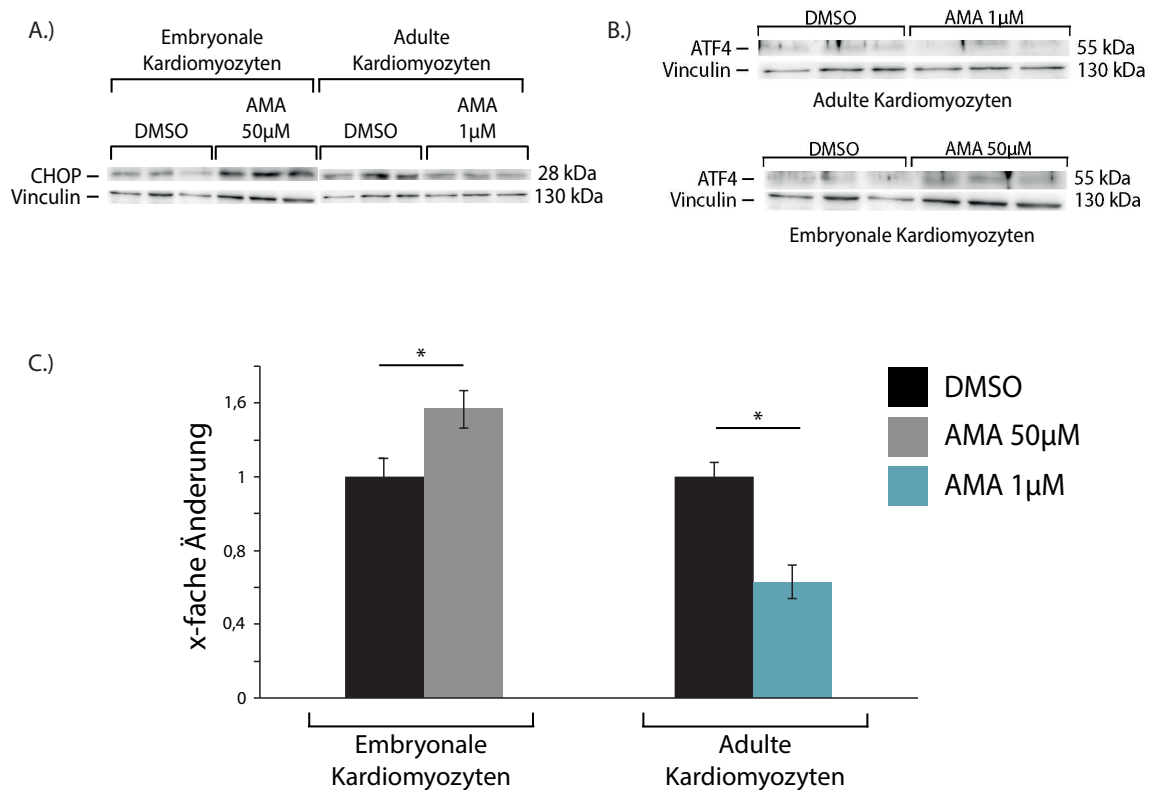


Abbildung 34 Western-Blot-Analysen von CHOP und ATF4 in adulten und embryonalen Kardiomyozyten nach 2-stündiger Behandlung mit Antimycin A

A.) Western Blot des Transkriptionsfaktors CHOP von über 2 Stunden mit Antimycin A bzw. DMSO behandelten, embryonalen (50 μM AMA) und adulten (1 μM AMA) Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Western Blot des Transkriptionsfaktors ATF4 von über 2 Stunden mit Antimycin A und DMSO behandelten, adulten (1 μM AMA) und embryonalen Kardiomyozyten (50 μM AMA). Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

C.) Densitometrische Quantifizierung des in A. dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde CHOP auf Vinculin. * $p < 0,05$; $n = 3$ Wells pro Behandlung.

Ein signifikanter Anstieg von ATF4, wie er in embryonalen Kardiomyozyten nach 24 Stunden AMA-Behandlung nachweisbar war, konnte zum Zeitpunkt von zwei Stunden nicht eindeutig gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.2.4). Während die Western Blots des Transkriptionsfaktors eine Induktion in embryonalen Kardiomyozyten andeuteten, war eine Quantifizierung aufgrund

von technisch bedingten Western-Blot-Artefakten nicht möglich (Abbildung 34, B). Im Vergleich dazu wiesen die aufgenommenen Western Blots adulter Kardiomyozyten nicht auf einen Anstieg von ATF4 unter AMA-Behandlung hin (Abbildung 34,B). Während H9c2-Zellen unter Antimycin A eine vermehrte Phosphorylierung und dadurch bedingte Aktivierung der Stress-assoziierten MAP-Kinase p38 zeigten (Abbildung 11), ließ sich dies in embryonalen Kardiomyozyten nicht nachweisen. In embryonalen Kardiomyozyten zeigte sich p38 weder nach 24 Stunden (Abbildung 24), noch nach 2 Stunden mit 50 μ M Antimycin-A-Behandlung vermehrt phosphoryliert (Abbildung 35). Adulte Kardiomyozyten hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg von p-p38 zum Zeitpunkt von 2 Stunden nach Antimycin-A-Behandlung (1 μ M) im Vergleich zu DMSO (Abbildung 35).

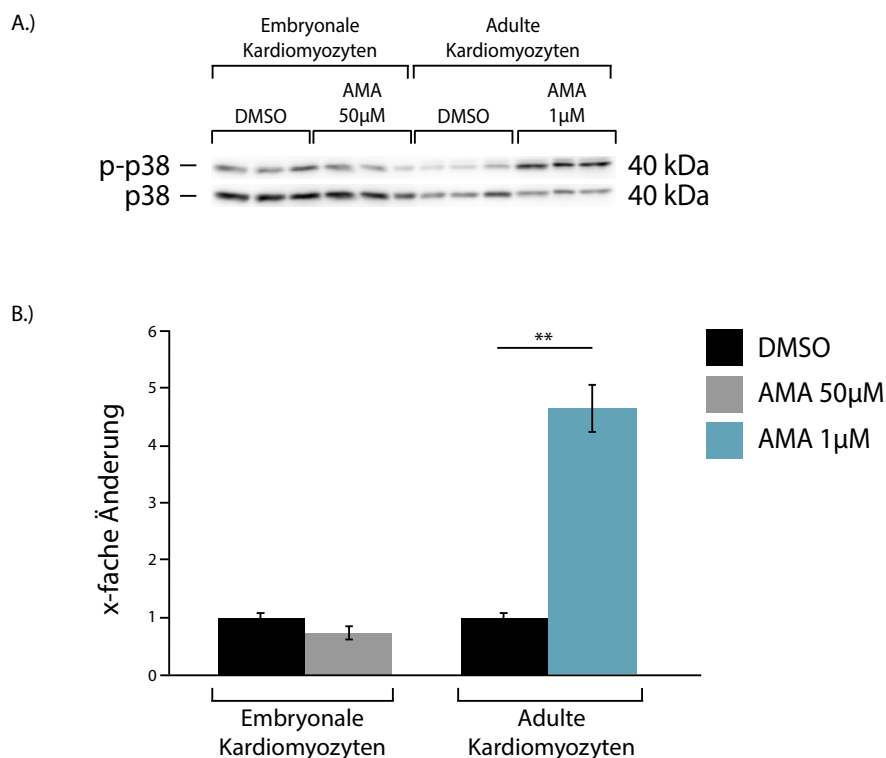


Abbildung 35 Western-Blot-Analyse der MAP-Kinase p38 in AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten

A.) Western Blot zur Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 von über 2 Stunden mit Antimycin A bzw. DMSO behandelten, embryonalen (50 μ M AMA) und adulten (1 μ M AMA) Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde p-p38 auf p38.

**p < 0,01; n = 3 Wells pro Behandlung.

Eines der wesentlichen Elemente der *Heat-Shock-Response* bildet der Transkriptionsfaktor HSF1 (siehe Abschnitt 1.3.2). In embryonalen Kardiomyozyten ließen sich im Western Blot

keine Veränderungen von HSF1 in Reaktion auf eine Behandlung mit 50 μM Antimycin A über 2 Stunden nachweisen. Adulte Kardiomyozyten hingegen zeigten nach zwei Stunden eine signifikante Reduktion von HSF1 bei einer Behandlung mit 1 μM Antimycin A im Vergleich zu DMSO (Abbildung 36).

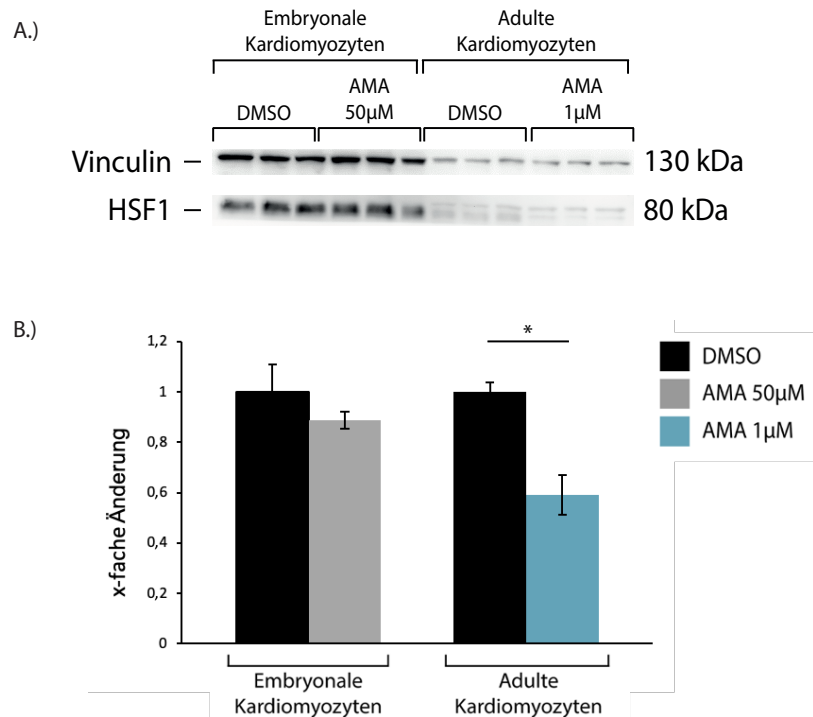


Abbildung 36 Western-Blot-Analyse von HSF1 in mit AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten

A.) Western Blot von HSF1 von über 2 Stunden mit Antimycin A bzw. DMSO behandelten embryonalen (50 μM AMA) und adulten (1 μM AMA) Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurde HSF1 auf Vinculin. * $p < 0,05$; $n = 3$ Wells pro Behandlung.

Eine Induktion antioxidativer Enzyme wie SOD2 oder PRDX3 konnte weder in embryonalen, noch in adulten Kardiomyozyten zu einem Zeitpunkt nach 2 Stunden AMA-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 37). Die Daten zeigen, dass nach 2 Stunden einer Behandlung mit Antimycin A noch keine Hyperoxidation von PRDX in embryonalen oder adulten Kardiomyozyten als Anzeichen für einen anhaltenden oxidativen Stress stattgefunden hatte (Abbildung 37). Die signifikante Induktion von BiP als Hinweis für ER-Stress, der in embryonalen Kardiomyozyten nach einer 24-stündigen Behandlung mit Antimycin A gezeigt werden konnte (Abbildung 21), ließ sich nach 2 Stunden weder in embryonalen noch adulten

Kardiomyozyten nachweisen (Abbildung 37). ATF5 und HSP60 als Hinweise auf eine Aktivierung der mitochondrialen UPR zeigten ebenfalls keine verstärkte Proteinexpression (Abbildung 37).

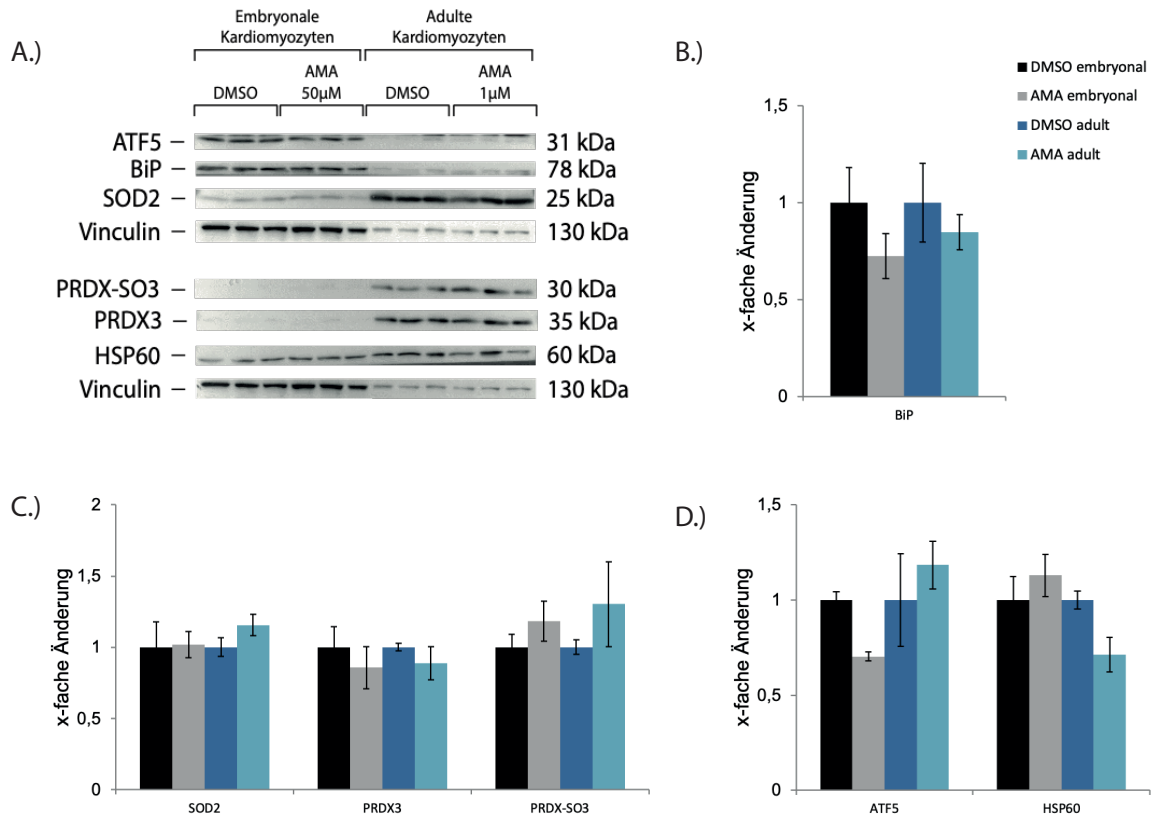


Abbildung 37 Western-Blot-Analyse von antioxidativen Mechanismen sowie Effektoren von mitochondrialem Stress und ER-Stress in mit AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten

A.) Western Blot von über 2 Stunden mit Antimycin A bzw. DMSO behandelten, embryonalen (50 µM AMA) und adulten (1 µM AMA) Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.-D.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots (A) als x-fache Änderung der mit Antimycin A behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Normalisiert wurden BiP (B), SOD2, PRDX3, PRDX-SO₃ (C), sowie ATF5 und HSP60 (D) auf Vinculin. n = 3 Wells pro Behandlung.

Die Ergebnisse verdeutlichen den frühen Anstieg wichtiger Mediatoren der ISR (wie zum Beispiel die Phosphorylierung von eIF2α und die Induktion von CHOP) in embryonalen Kardiomyozyten unter mitochondrialer Dysfunktion bzw. Komplex-III-Inhibierung. Adulte Kardiomyozyten, die nur deutlich geringere AMA-Konzentrationen über einen deutlich verkürzten Zeitraum überleben, zeigten dagegen eine signifikante Reduktion des Transkriptionsfaktors CHOP. Gleichzeitig war dennoch ein Anstieg von p-eIF2α in beiden Zelltypen nachweisbar, scheinbar jedoch ohne den Anstieg nachfolgender Mediatoren der

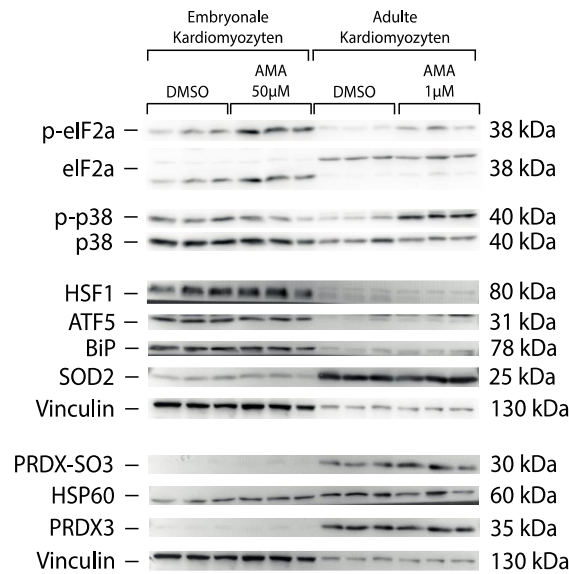
ISR. Nur in adulten, nicht aber in embryonalen Kardiomyozyten kam es unter AMA-Behandlung zu einer vermehrten Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 und einer signifikanten Reduktion von HSF1.

4.5 Vergleich der Basisexpression stressrelevanter Proteine in embryonalen und adulten Kardiomyozyten bei einer Komplex-III-Inhibition

Neben der Analyse der Stressantwort embryonaler und adulter Kardiomyozyten unter der Behandlung mit Antimycin A, ließen sich anhand der Daten der Western-Blot-Analysen Rückschlüsse auf Unterschiede in der Basisexpression der verschiedenen Komponenten der Signalwege ziehen (Abbildung 38). Die Daten ließen dabei eine Beurteilung der ISR, aber auch antioxidativer Proteine und Enzyme, sowie verschiedener Komponenten der *Heat-Shock-Response* zu. Dazu wurde die DMSO-Kontrolle embryonaler Kardiomyozyten mit der DMSO-Kontrolle adulter Kardiomyozyten in den im Abschnitt 4.4 beschriebenen Western Blots verglichen. Beide Gruppen liefen bei Durchführung der Western-Blot-Analysen dabei auf demselben Gel.

Betrachtet man SOD2 und PRDX3, beide notwendig für die Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase, so zeigten diese eine deutlich stärkere Basisexpression in adulten im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten. Adulte Kardiomyozyten zeigten zudem höhere Level des hyperoxidierten PRDX (PRDX-SO₃). Als einer der Initiationsfaktoren für ISR/UPR^{mt} zeigte sich eIF2 α in embryonalen Kardiomyozyten vermehrt phosphoryliert, während ATF5 als einer der Schlüsselfaktoren der UPR^{mt} in adulten Kardiomyozyten signifikant höher exprimiert war. Total eIF2 α zeigte zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten einen Shift in seinem Molekulargewicht. Während sich in embryonalen Kardiomyozyten eine deutliche Bande bei etwa 38 kDa zeigte, kam es in adulten Kardiomyozyten zu einer deutlichen Bande bei etwa 30 kDa. Eine solche Veränderung der Bandenhöhe ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Zur Auswertung wurde die jeweils stärkere Bande verwendet, was bei der Interpretation der Daten beachtet werden muss. Weiterhin war p-38 und die Phosphorylierung der MAP-Kinase in embryonalen Kardiomyozyten vermehrt nachweisbar. Als Marker der Hitzeschockantwort wies HSF1 in seiner Basisexpression keinen signifikanten Unterschied zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten auf. Wie in Abbildung 21 verdeutlicht, zeigte sich in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten nach 24 Stunden eine Induktion von BiP, einem Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums. Im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten wurde außerdem eine vermehrte Basisexpression von BiP in embryonalen Zellen deutlich (vgl. Abbildung 38). Als Ladekontrolle diente zum Großteil Vinculin (Abbildung 38A), welches sich selbst in seiner Expression zwischen adulten und embryonalen Kardiomyozyten deutlich unterscheidet und daher bei der mathematischen Einschätzung der Werte beachtet werden muss.

A.)



B.)

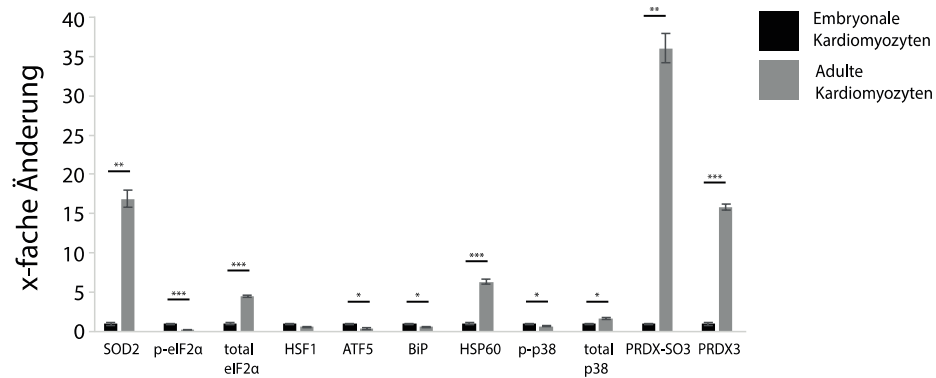


Abbildung 38 Vergleich der Basisexpression verschiedener Stressmarker in embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten

A.) Western Blots nach Proteinisolierung von 2 Stunden mit Antimycin A (50 μM und 1 μM), sowie mit DMSO behandelten, embryonalen bzw. adulten Kardiomyozyten. Am rechten Rand angegeben ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

B.) Densitometrische Quantifizierung des dargestellten Western Blots als x-fache Änderung der mit DMSO behandelten, adulten Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Normalisiert wurde p-eIF2α auf total-eIF2α, p-p38 auf total-p38. Die restlichen Antikörper wurden auf Vinculin normalisiert. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; n = 3 Wells pro Behandlung.

Vergleicht man die Basisexpression embryonaler und adulter Kardiomyozyten, ließen sich auf Proteinebene deutliche Unterschiede in allen untersuchten, stressreaktiven Signalwegen feststellen. Eine Studie des Kaessmann-Labs der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg beschäftigte sich mit den kompletten Transkriptomen sieben verschiedener Organe aus sieben

Spezies im Lauf der prä- und postnatalen Entwicklung. Sie charakterisierten dabei die genomweite RNA-Expression in der Organentwicklung verschiedener Säugetiere, darunter auch des Menschen. Die daraus entstandene Datenbank ermöglicht einen Vergleich der Genexpressionsmuster im Laufe der Organogenese, sowie der Expressionsmuster zwischen verschiedenen Geweben und Spezies von der Embryogenese bis hin zum Erwachsenenalter¹⁵¹. Im Vergleich zu der Untersuchung der Proteine in Western-Blots lässt sich mithilfe der Daten die RNA-Expression untersuchen. Die öffentlich zugängliche Datenbank¹⁵² ermöglicht die Beurteilung der RNA-Expressionsmuster von Hitzeschockantwort, antioxidativen Mechanismen und UPR^{mt} im Laufe ihrer Entwicklung, welche im Rahmen dieser Arbeit in vorherigen Versuchen anhand von Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenznachweisen analysiert wurden. Angegeben werden die Expressions-Level dabei in RPKM (*Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads*) entsprechend der Expressionsstärke der jeweiligen Gene. Betrachtet wird dabei die Expression im embryonalen Maus-Herzen von Tag E10,5 bis hin zum postnatalen Herzen an Tag 63 nach der Geburt (P63). Im humanen Herzen wurden Proben in einem Zeitraum der frühen Organogenese in der Embryonalzeit bis hin zum Erwachsenenalter gesammelt. Die pränatalen Proben der humanen Herzen entstammen einem wöchentlichen Entwicklungsabstand, sodass das Entwicklungsstadium bis zur Geburt als Wochen nach Konzeption (WPC = *weeks post conception*) angegeben werden¹⁵¹. Damit soll der Frage auf den Grund gegangen werden, wie die Stressgene sich im Verlauf der terminalen Differenzierung von Kardiomyozyten auf transkriptioneller Ebene verändern und wie die gewonnenen Daten mit den Western-Blot-Daten zur Proteinexpression in embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten passen. So können sich Ergebnisse der Untersuchungen von Transkription und Translation unter anderem durch die Stabilität der Proteine oder posttranslationale Modifikationen deutlich voneinander unterscheiden¹⁵³. Eine solche Analyse über die Entwicklungsstufen ermöglicht gegebenenfalls Rückschlüsse auf mögliche Ursachen einer gesteigerten Stressanfälligkeit von adulten gegenüber embryonalen Kardiomyozyten.

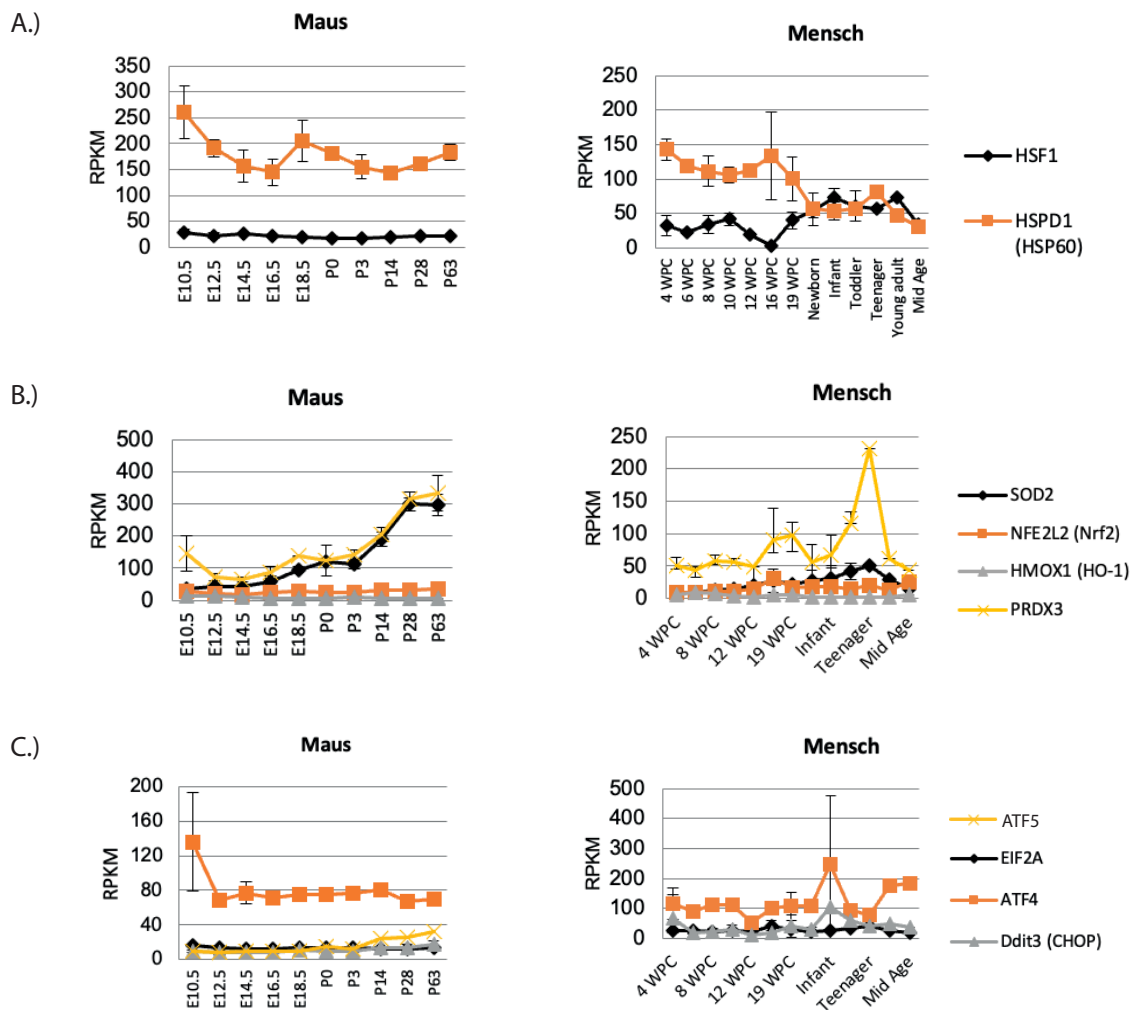


Abbildung 39 Expressionsanalyse verschiedener stressreaktiver Gene in humanen und murinen Herzen im Laufe der embryonalen und postnatalen Entwicklung

Basisexpression von HSF1 und HSP60 (A), antioxidativer Proteine und Enzyme (SOD2, Nrf2, HO-1, PRDX3) (B) und Markern der ISR/UPR (eIF2 α , ATF4, CHOP) (C) in humanen Herzen im Stadium WPC4 bis ins erwachsene Alter und Maus-Herzen im Stadium E10,5 bis P63, angegeben in absoluten RPKM-Werten.

Als Marker der Hitzeschockantwort dienten der Transkriptionsfaktor HSF1 und das Hitzeschockprotein HSP60, kodiert durch das HSPD1-Gen. HSP60 als mitochondriales Hitzeschockprotein gehört zu den durch CHOP regulierten Proteinen im Rahmen der UPR^{mt} ⁷⁴. Die Expression von HSF1 blieb im Verlauf der Entwicklung in der Maus nahezu konstant (Abbildung 39A) und auch die Expression von HSP60 unterlag im prä- im Vergleich zum postnatalen Herzen nur sehr geringfügigen Schwankungen (Abbildung 39A). HSP60 zeigte eine verstärkte Expression während der frühen Embryonalphase, mit einem stetigen Abfall bis zu E16,5. Nach einem kurzen erneuten Anstieg zeigte sich eine eher geringe Expression in

der frühen Postnatalphase mit wiederum zunehmender Expression ab Tag P28. In humanen kardialen Zellen zeigte HSP60 eine verstärkte Expression während der Embryonalzeit mit stetigem Abfall bis ins Erwachsenenalter, wohingegen es bei HSF1 postnatal zu einer leichten Zunahme der Expression kam, die erst im Erwachsenenalter wieder abnahm.

Zu den antioxidativen Enzymen zählen unter anderem SOD2 und PRDX3. Die Expression beider Gene blieb während der Embryonalentwicklung der Maus weitestgehend unverändert (Abbildung 39B). In der Postnatalphase kam es in beiden Fällen zu einer deutlichen Zunahme der Expression. In humanen Herzen zeigten SOD2 und PRDX3 ein ähnliches Muster mit ihrem Maximum während des Jugendalters. HMOX1 (*heme oxygenase 1*) als kodierendes Gen von HO-1 präsentierte sich sowohl in der Maus als auch in humanen kardialen Zellen nahezu konstant (Abbildung 39B). Nrf2 mit seinem zugehörigen Gen NFE2L2 (*NFE2 like bZIP transcription factor 2*) als Upstream-Transkriptionsfaktor von antioxidativen Genen (darunter HO-1) unterlag während der Entwicklung zwar immer wieder leichten Schwankungen, präsentierte sich jedoch ebenfalls ohne deutliche prä- und postnatale Veränderungen (Abbildung 39B). In humanen Zellen kam es nur zu geringfügigen Schwankungen in der Expression von Nrf2. Veränderungen der Expression verschiedener Marker von ISR/UPR zeigten sich bei eIF2 α , ATF4 und CHOP (Abbildung 39C). eIF2 α zeigte kaum Veränderungen seiner Expression im gesamten Verlauf der Entwicklung der Maus. ATF4 zeigte einen deutlichen Abfall zwischen Tag E10,5 und E12,5 und blieb dann im weiteren Verlauf ebenfalls nahezu gleich. Ddit3 (*DNA damage-inducible transcript 3*) als zugrundeliegendes Gen für den Transkriptionsfaktor CHOP zeigte sich annähernd konstant mit leichtem Anstieg der Expression kurz nach der Geburt ab Tag P3. Eine sehr ähnliche Entwicklung wie CHOP zeigt ATF5 in der Maus, ein wichtiger Faktor der UPR^{mt}. Während die Expression sich im embryonalen Stadium kaum veränderte, zeigte sich ab P3 eine leichte Zunahme der Expression. Die entsprechenden Daten zu ATF5 im Menschen ließen aufgrund einer zu kleinen Gruppengröße und einer zu großen Standardabweichung keine Analyse zu. Betrachtet man die Gene der ISR/UPR^{mt} in ihrer Entwicklung in humanen Herzen, so zeigten ATF4 und CHOP ihr Maximum im Kleinkindesalter mit Abweichung einzelner Werte. ATF4 zeigte zudem eine Zunahme der Expression ab dem Jugendalter, wohingegen eIF2 α leichte Schwankungen in seiner Expression im Verlauf der Entwicklung ohne größere Abweichungen nach der Geburt zeigte.

Bei der Frage zu möglichen Veränderungen im Verlauf der Differenzierung von kardialen Zellen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten, sowohl in Bezug auf die Proteinanalyse im Western-Blot als auch auf die RNA-Expression. Veränderungen auf Proteinebene und Unterschiede der RNA-Expression bieten eine Grundlage bei der Frage nach dem Zusammenhang zu der Stressanfälligkeit

embryonaler und adulter Kardiomyozyten. Zusammenfassend kam es postnatal zu einem deutlichen Anstieg antioxidativer Mechanismen (SOD2, PRDX3). Zudem zeigten die Western-Blot-Analysen eine vermehrte PRDX-Hydroxylierung, möglicherweise als Zeichen ihres höheren oxidativen Stoffwechsels mit einer vermehrten Produktion von ROS. HSF1 zeigte sich sowohl auf Proteinebene als auch in seiner RNA-Expression postnatal erhöht. Die Proteinexpression im Rahmen der UPR^{mt} schien zum Großteil postnatal verstärkt zu sein, wobei sich hierbei insbesondere bei HSP60 Unterschiede zwischen den Western-Blot-Analysen und der RNA-Expression zeigten.

4.6 Inhibition der Atmungskette embryonaler Kardiomyozyten an Komplex I und V

4.6.1 H9c2-Zellen zeigen eine geringe Toleranz bei Behandlung mit Oligomycin und Rotenon

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zeigten eine hohe Toleranz der H9c2-Zellen und embryonalen Kardiomyozyten gegenüber der Behandlung mit Antimycin A, welches zu einer Inhibition von Komplex III der Atmungskette führt. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit sich die Toleranz und Reaktion der embryonalen Kardiomyozyten bei Inhibition anderer Komplexe der Atmungskette von denen durch eine Behandlung mit Antimycin A unterscheiden. Oligomycin ist ein Inhibitor der mitochondrialen ATPase, auch als Komplex V der Atmungskette bezeichnet. Das Antibiotikum bindet an das sogenannte *oligomycin sensitivity conferral protein (OSCP)*, welches die Verbindung zwischen dem F₀- und dem F₁-Anteil der ATPase gewährleistet. Durch die Bindung stört Oligomycin diese Verbindung, was zu einer gestörten ATP-Synthese führt¹⁵⁴. Das Pestizid Rotenon hingegen ist ein Inhibitor von Komplex I der Atmungskette, einem der Haupt-Eintrittspunkte von Elektronen. Es verhindert die Elektronenübertragung des Eisen-Schwefel-Zentrums auf das Ubiquinon, resultierend in einer verminderten Produktion von ATP. Die nun nicht mehr in die Atmungskette einfließenden Elektronen führen so zu einer Reduktion von Sauerstoffmolekülen und folglich einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffverbindungen¹⁵⁵. Die Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Oligomycin (5 µM) und Rotenon (10 µM) erfolgte analog zur AMA-Behandlung ebenfalls über 24 Stunden. Als Kontrolle diente auch hier die Behandlung mit DMSO in äquimolarer Menge, da sowohl Oligomycin als auch Rotenon in DMSO gelöst wurden. Als Richtlinie für die verwendeten Konzentrationen von Rotenon wurden in der Literatur gängige Konzentrationen, sowie Erfahrungen der Arbeitsgruppe genutzt¹⁰². Um eine geeignete Konzentration für Oligomycin zu finden, wurden in der Literatur gängige Konzentrationen verwendet und diese im Anschluss zunächst an H9c2-Zellen getestet. Dazu wurde ein MTT-Test 24 und 48 Stunden nach Zugabe des Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen von 2 µM, 4 µM und 10 µM verwendet. Der in Abbildung 40 abgebildete t0-

Wert entspricht dabei der Zellzahl zu Beginn der Behandlung. Der MTT-Test für mit Oligomycin behandelten H9c2-Zellen zeigte einen deutlichen Effekt des Inhibitors im Vergleich zur Kontrollgruppe. Anhand der graphischen Darstellung der Ergebnisse (Abbildung 40) wird das konstante Wachstum der DMSO-Kontrollgruppe innerhalb des Untersuchungszeitraums von 48 Stunden deutlich. Im Vergleich dazu zeigten die mit Oligomycin behandelten Zellen eine signifikant reduzierte Zellzahl. Unter der Behandlung mit 2 μM und 4 μM Oligomycin zeigten die Zellen zwar noch ein stetiges Wachstum verglichen zu dem t₀-Wert, jedoch waren die gemessenen Werte nach 48 Stunden geringer als die der DMSO-Kontrolle. Eine signifikante Reduktion zeigte sich dabei bei einer Konzentration von 4 μM Oligomycin über einen Zeitraum von 48 Stunden. Bei 10 μM Oligomycin kann kein Wachstum der Zellen mehr nachgewiesen werden, verglichen mit dem t₀-Wert kam es dabei sogar zu einer leichten Reduktion. Dies spricht indirekt für einen Zellverlust unter der Konzentration von 10 μM Oligomycin. Die gemessenen Werte waren dabei sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe deutlich reduziert.

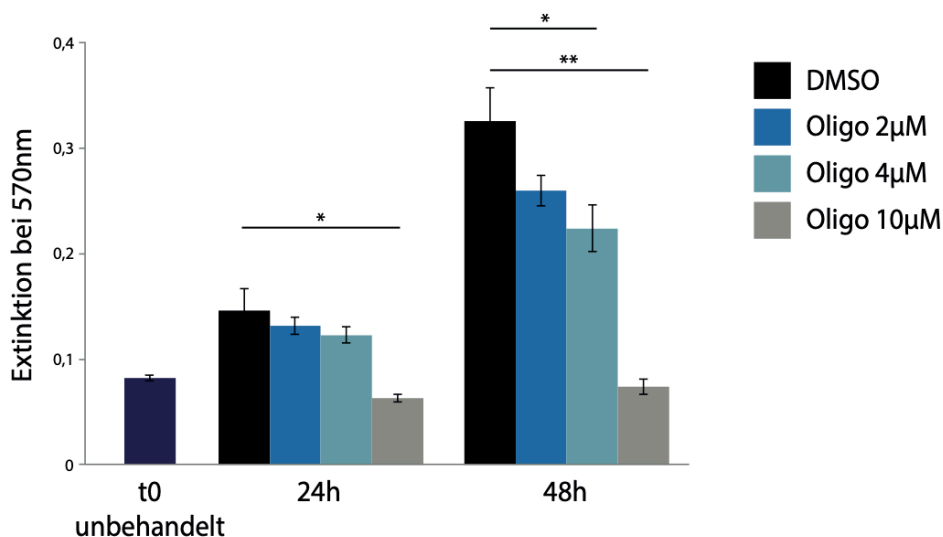


Abbildung 40 **Wachstum von H9c2-Zellen unter Oligomycin-Behandlung**

Dargestellt ist die graphische Abbildung der Extinktionswerte eines MTT-Tests von über 24 und 48 Stunden behandelten H9c2-Zellen mit DMSO und Oligomycin in den Konzentrationen 2 μM , 4 μM und 10 μM . t₀ entspricht der Extinktion unbehandelter Zellen zu Behandlungsbeginn, 24 Stunden nach Aussaat. *p < 0,05; **p < 0,01; n = 3 Wells pro Behandlung.

4.6.2 Embryonale Kardiomyozyten zeigen eine geringe Toleranz gegenüber einer Behandlung mit Oligomycin und Rotenon

Anhand der Ergebnisse der H9c2-Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor Oligomycin, wurde für die folgenden Versuche an embryonalen Kardiomyozyten eine Konzentration von

5 μM gewählt. Bei dieser Wirkstoffkonzentration zeigte sich ein sichtbarer Effekt auf das Zellwachstum- bzw. überleben bei H9c2-Zellen, ohne einen kompletten Wachstumsarrest oder massiven Zelltod zu erzeugen. Die Analyse mittels Phasenkontrastmikroskopie von 24 Stunden mit Oligomycin und Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten zeigte deutliche Effekte in Konfluenz und Morphologie der Zellen (Abbildung 41). Die mit DMSO behandelten, embryonalen Kardiomyozyten präsentierten sich als konfluenter, synchron schlagender Zellverbund. Mit Rotenon behandelte Zellen hingegen zeigten eine deutlich reduzierte Konfluenz und stark abgerundete, nicht mehr adhärente Zellen, als Zeichen eines massiven Zelluntergangs. Ein deutlich milderer, im Vergleich zu DMSO jedoch trotzdem deutlicher Effekt auf die Konfluenz der Zellen, zeigte sich bei der Behandlung mit Oligomycin. Morphologisch zeigten mit Oligomycin behandelte Kardiomyozyten in der Phasenkontrastmikroskopie zunächst keine sichtbaren Veränderungen.

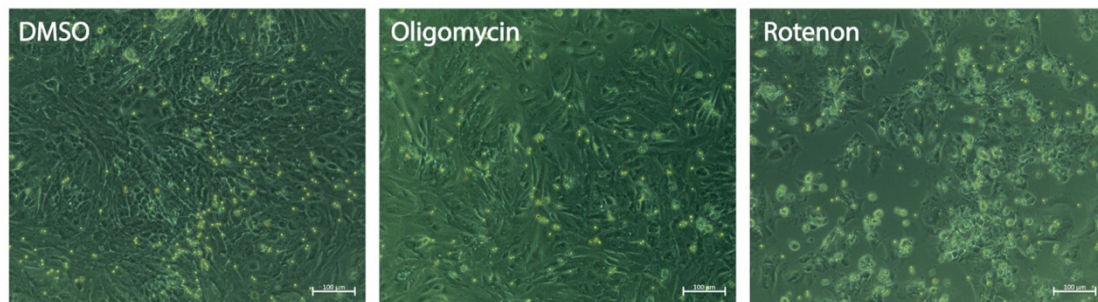


Abbildung 41 Phasenkontrastmikroskopie embryonaler Kardiomyozyten 24 Stunden nach Behandlung mit Oligomycin und Rotenon

Repräsentative Phasenkontrastmikroskopieaufnahmen embryonaler Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μM Oligomycin bzw. 10 μM Rotenon. Die Behandlung der Kontrolle erfolgte durch Zugabe von DMSO. Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μm .

In der Immunfluoreszenzanalyse für das Sarkomer-assoziierte Protein α -Actinin von mit Oligomycin behandelten Zellen zeigte sich ein stark variierendes Zellbild (Abbildung 42). Ein Teil der Kardiomyozyten präsentierte sich unverändert, mit nicht erkennbarem Unterschied der Sarkomerstruktur im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen. Der andere Teil der Zellen zeigte einen eindrucklichen Verlust der sonst organisierten Sarkomerstruktur der Kardiomyozyten.

24h

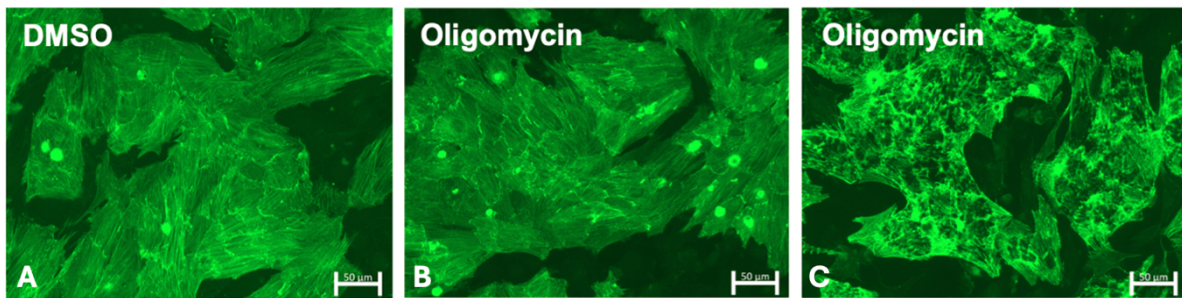


Abbildung 42 Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des Sarkomerproteins α -Actinin embryonaler Kardiomyozyten nach 24 h Behandlung mit Oligomycin

Immunfluoreszenzanalysen embryonaler Kardiomyozyten mithilfe des Sarkomerproteins α -Actinin (in grün) nach 24-stündiger Behandlung mit dem Inhibitor Oligomycin A in einer Konzentration von 5 μ M (B, C). Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO (A). Die repräsentativen Immunfluoreszenzbilder Oligomycin behandelter Zellen zeigen ein stark variiertes Zellbild mit Erhalt (B) oder deutlichem Verlust (C) der organisierten Sarkomerstruktur. Der Messbalken entspricht einer Länge von 50 μ m.

Zur Beurteilung der Kernzahl der embryonalen Kardiomyozyten 24 Stunden nach einer Behandlung mit Oligomycin, diente erneut die Co-Färbung mit DAPI und Nkx2.5 in der Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 4.2.2).

Aufgrund von Fluoreszenz-Artefakten, bedingt durch den Zelluntergang und die damit verbundene Zell-Kondensation in Rotenon behandelten embryonalen Kardiomyozyten, war eine genaue Zellzählung in diesem Fall nicht möglich. Mit Oligomycin behandelte Zellen zeigten eine signifikante Reduktion sowohl der Gesamtkernzahl, als auch der Anzahl an Nkx2.5-positiven Kardiomyozytenkernen pro Bild, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 43A). Der Anteil an Kardiomyozytenkernen, bezogen auf die Gesamtkernzahl, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen mit Oligomycin behandelten Zellen und der Kontrollgruppe und erreichte in beiden Fällen nahezu 70 %.

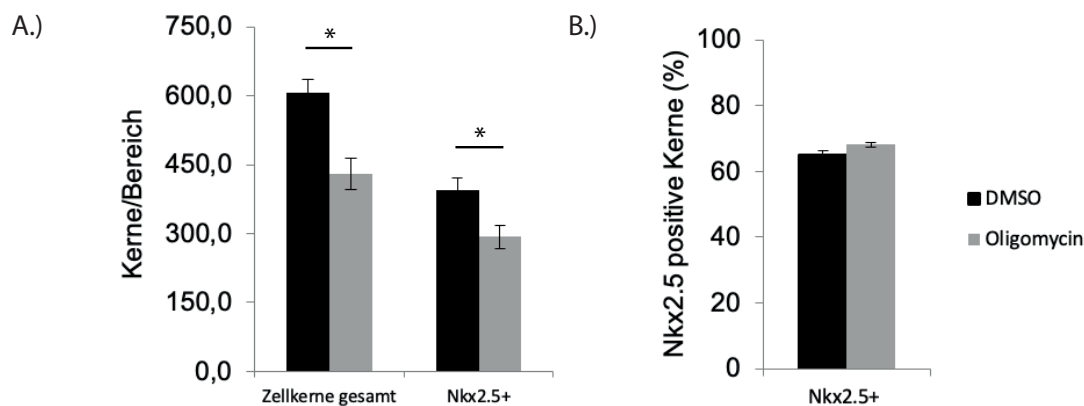


Abbildung 43 Kernzählung und Bestimmung des Kardiomyozytenanteils von mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten

A.) Kernzählung von mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Zählung aller Kerne erfolgte mittels der Darstellung der Zellkerne mit DAPI. Zur Identifikation von Kardiomyozytenkernen diente die Immunfluoreszenzdarstellung von Nkx2.5 (siehe auch Abbildung 14). *p < 0,05; n = 3 Wells pro Behandlung.

B.) Anteil der Kardiomyozytenkerne von mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Zählung erfolgte mittels Darstellung der Zellkerne mit DAPI. Zur Identifikation der Kardiomyozytenkerne diente die Darstellung des Antikörpers Nkx2.5. n = 3 Wells pro Behandlung.

Im nächsten Schritt wurde, wie auch schon bei der Behandlung mit Antimycin A (siehe Abschnitt 4.2.2), die Zellzyklusaktivität der embryonalen Kardiomyozyten unter Oligomycin betrachtet, um Wachstum und Zellüberleben und damit eine mögliche Beeinträchtigung der Zellen besser einschätzen zu können. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden lang mit Oligomycin bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Im Anschluss erfolgte die Immunfluoreszenz-Co-Färbung der Zellen mit Ki67 und Nkx2.5. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion sowohl der Ki67-positiven Kerne bezogen auf die Gesamtkernzahl, als auch der Ki67-positiven Kardiomyozytenkerne von mit Oligomycin behandelten Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen (Abbildung 44). Die Untersuchung zeigte also eine deutliche Abnahme der Zellzyklusaktivität, was für ein verändertes Proliferationsverhalten der embryonalen Kardiomyozyten unter der Behandlung mit Oligomycin spricht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der erhaltenen Zellzyklusaktivität unter einer Behandlung mit Antimycin A (siehe Abschnitt 4.2.2).

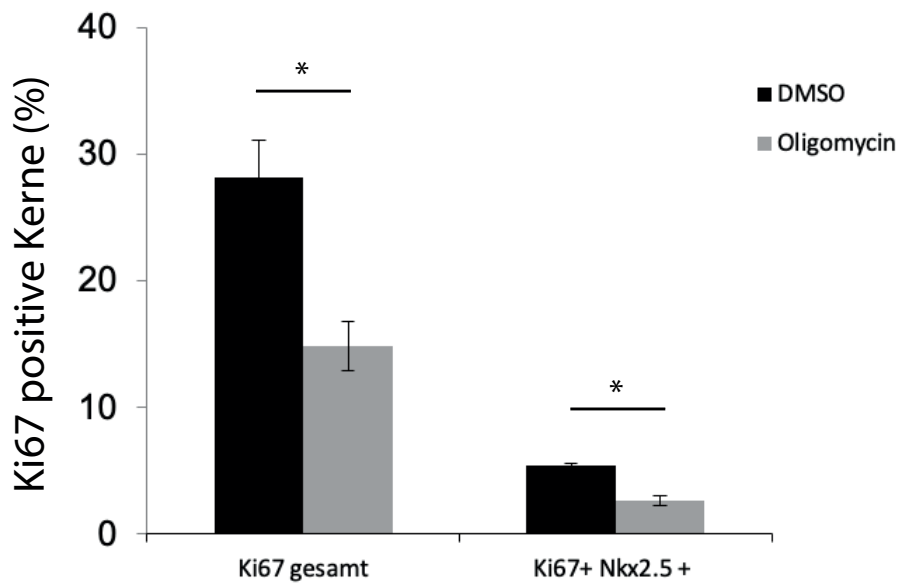


Abbildung 44 Zellzyklusaktivität embryonaler Kardiomyozyten unter Oligomycin-Behandlung

Embryonale Kardiomyozyten wurden über 24 Stunden mit Oligomycin (5 μ M) oder der Trägersubstanz DMSO als Kontrollgruppe behandelt. Die Zellzyklusaktivität wurde anhand der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung in Nkx2.5-negativen Nicht-Kardiomyozytenkernen und Nkx2.5-positiven Kardiomyozytenkernen bestimmt. n = 3 Wells pro Behandlung; *p < 0,05.

Während die Inhibition von Komplex III der Atmungskette durch Antimycin A in der Phasenkontrastmikroskopie keinen merklichen Unterschied zu mit DMSO behandelten Zellen aufwies, zeigten sich deutliche Effekte bei der Inhibition von Komplex I (Rotenon) und der mitochondrialen ATPase bzw. Komplex V (Oligomycin). Eine Behandlung mit Rotenon zeigte deutliche Effekte in Konfluenz und Morphologie der embryonalen Kardiomyozyten, die auf einen Zelltod hindeuteten. Unter Oligomycin kam es zwar nur bei einem Teil der Zellen zu morphologischen Veränderungen, die in der Immunfluoreszenz gemessene Kernzahl bzw. -dichte spiegelte jedoch die auch in der Phasenkontrastmikroskopie reduzierte Konfluenz wider. Auch die Zellzyklusaktivität in embryonalen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten unter Oligomycin war signifikant reduziert. Die Analysen zeigten einen deutlichen Effekt auf das Zellüberleben und die Morphologie embryonaler Kardiomyozyten, in Abhängigkeit von dem verwendeten Inhibitor und damit dem Angriffspunkt der mitochondrialen Atmungskette. Daraus ergibt sich die Frage, inwiefern sich die Inhibition der verschiedenen Komplexe der Atmungskette auf die Aktivität stressreaktiver Signalwege auswirkt.

4.6.3 Embryonale Kardiomyozyten aktivieren die ISR nach Behandlung mit Oligomycin

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erläutert, aktivieren mit Antimycin A behandelte, embryonale Kardiomyozyten eine Reihe molekularer Stressantworten, darunter vor allem die ISR/UPR (siehe Abschnitt 4.2.4). Im nächsten Schritt wurden Immunfluoreszenzanalysen der mit Rotenon und Oligomycin behandelten Zellen durchgeführt, um die Stressantworten bei Inhibition von Komplex I und V der Atmungskette zu vergleichen. Unterschiede in der Aktivierung stressreaktiver Signalwege könnten als eine mögliche Erklärung der verminderten Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber verschiedenen Inhibitoren dienen. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden lang mit 10 μM Rotenon und 5 μM Oligomycin behandelt. Wie schon zuvor, erfolgte die Behandlung der Kontrollgruppe mit einer äquimolaren Menge DMSO. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine unveränderte Signalintensität der Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP in den mit Rotenon behandelten Zellen (Abbildung 45). Eine vermehrte Expression der ISR-Marker im Zellkern hingegen wurde in den mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten deutlich, deren Behandlung im Vergleich zu der mit Rotenon besser toleriert wurde. Somit wurde sowohl in mit Antimycin A als auch in mit Oligomycin behandelten Zellen ein Anstieg der beiden Transkriptionsfaktoren von ISR/UPR nachgewiesen.

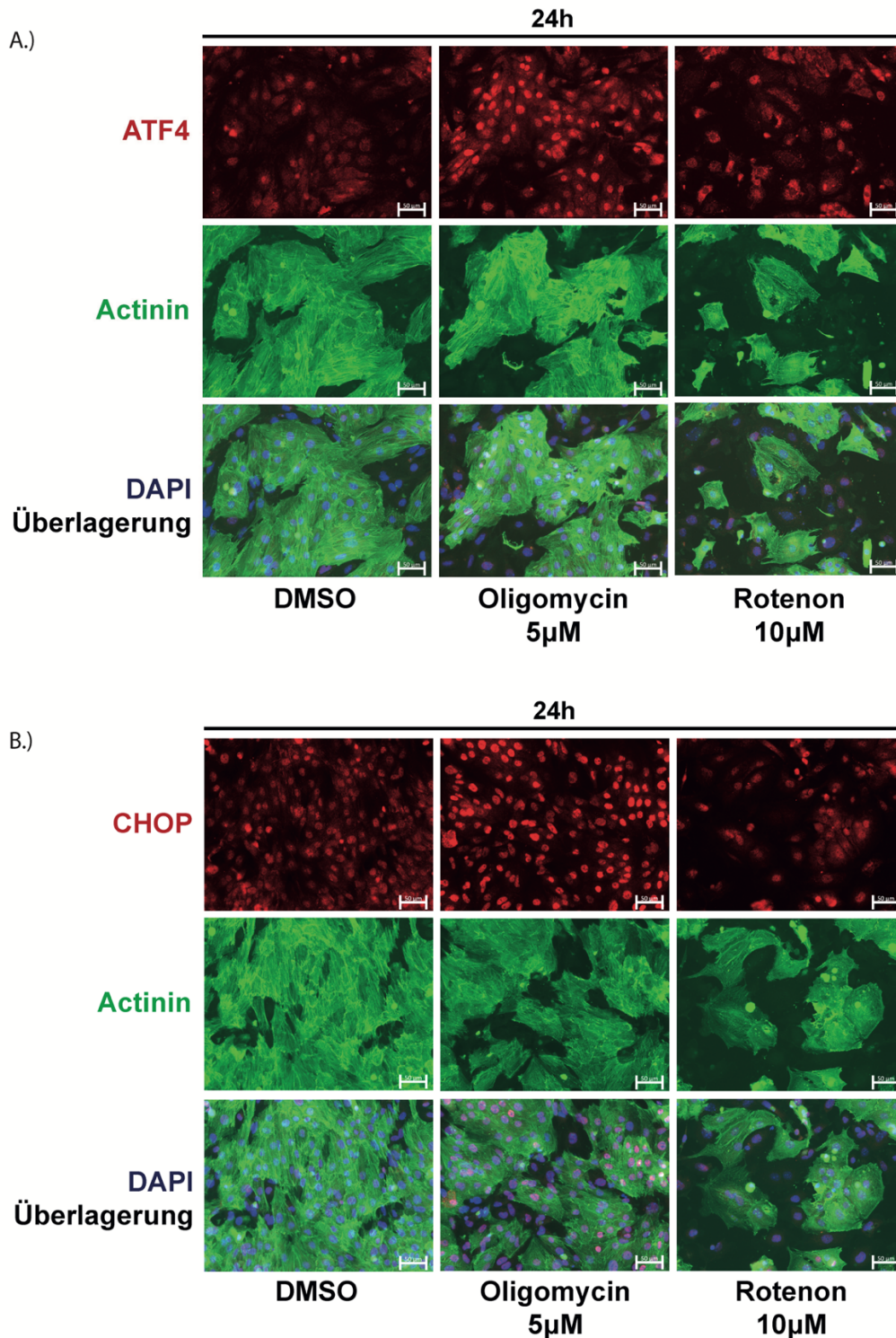


Abbildung 45 Immunfluoreszenzanalysen der ISR/UPR von mit Oligomycin bzw. mit Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten

Immunfluoreszenzdarstellung des Transkriptionsfaktors ATF4 (A) und CHOP (B) (in rot) nach 24-stündiger Behandlung embryonaler Kardiomyozyten mit Rotenon (10 µM) bzw. Oligomycin (5 µM) sowie der DMSO-Kontrolle. Es erfolgte die Co-Färbung mit dem Sarkomerprotein α -Actinin (in grün) zur Darstellung der Kardiomyozyten und die Färbung der Zellkerne mittels der Markierung von DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (in blau). Die Messbalken entsprechen 50 µm.

Während mit Antimycin A behandelte, embryonale Kardiomyozyten die Behandlung mit dem Inhibitor gut tolerierten und in ihrer Zellzyklusaktivität nicht eingeschränkt waren, kam es unter der Behandlung mit Rotenon zu einem deutlichen Zelluntergang. Mit Oligomycin behandelte Zellen zeigten einen deutlichen Unterschied der Konfluenz und Zelldichte, bei gleichzeitig in der Phasenkontrastmikroskopie kaum sichtbaren morphologischen Veränderungen. Die mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten zeigten, wie auch die mit Antimycin A behandelten Zellen, eine deutliche Zunahme der Signalintensität der Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP. Nicht verändert zeigten diese sich hingegen in den – zum Großteil zugrunde gegangenen – mit Rotenon behandelten Zellen.

4.6.4 LDH-Freisetzung embryonaler Kardiomyozyten nach Inhibition verschiedener Komplexe der Atmungskette

Zur Untersuchung des Zelluntergangs beziehungsweise einer Zytolyse und der Zytotoxizität der verschiedenen Inhibitoren in embryonalen Kardiomyozyten diente der Lactatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay). LDH stellt ein Schlüsselenzym des anaeroben Metabolismus dar und kommt in fast allen Zellen und Geweben des Körpers vor¹⁵⁶. Als Oxidoreduktase katalysiert es die reversible Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Kommt es zu einem Mangel an ATP unter anaeroben oder hypoxischen Bedingungen, wird die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien gestört und zwingt die Zelle zu alternativen Wegen der Energieproduktion. Es kommt zu einem LDH-Anstieg, der bei Sauerstoffmangel der anaeroben Metabolisierung von Glucose dient¹⁵⁶. Kommt es zu einer Schädigung der Zellmembran und damit zum Integritätsverlust der Zelle, wird das ansonsten intrazellulär gelegene Enzym freigesetzt und ist mithilfe eines LDH-Assays nachweisbar¹⁵⁷.

Als Proben dienten die Überstände der Zellkulturmedien embryonaler Kardiomyozyten, 24 Stunden nach der Behandlung mit Rotenon (10 µM), Oligomycin (5 µM) und Antimycin A (50 µM). Als Kontrollgruppe erfolgte die Behandlung mit äquimolarer Menge DMSO. Die Messung ergab eine signifikant erhöhte Absorption der Proben von mit Rotenon bzw. Antimycin A behandelten Zellen (Abbildung 46). Ein signifikanter Anstieg der Lactatdehydrogenase-Aktivität im Medium der mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

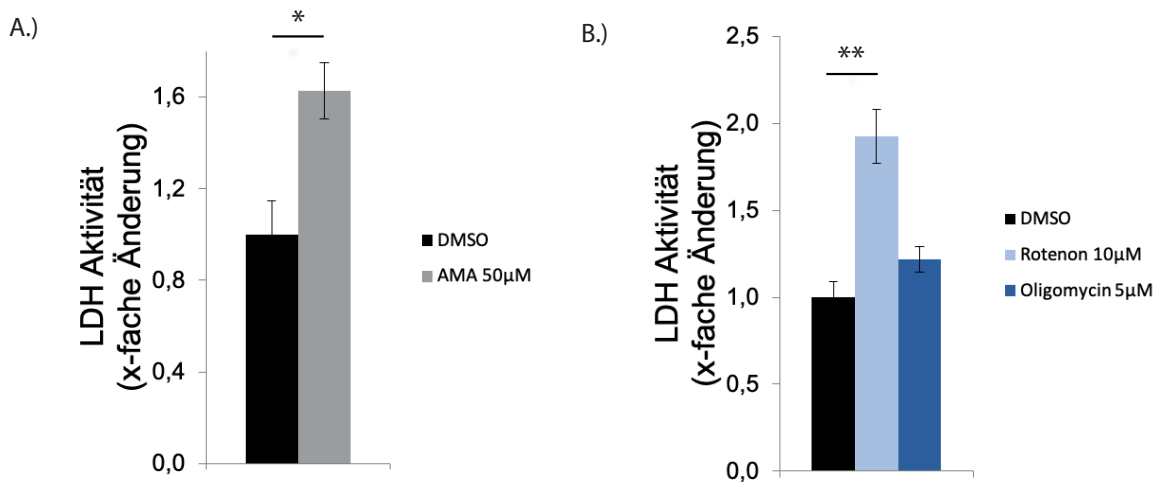


Abbildung 46 LDH-Assay embryonaler Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A, Rotenon und Oligomycin

LDH-Assay von über 24 Stunden mit 50 μM Antimycin A (A) sowie Rotenon 10 μM und Oligomycin 5 μM (B) behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO, deren Absorptionswerte als 1 definiert wurden. Gemessen wurde 30 Minuten nach Start der LDH-abhängigen Reaktion im Plate Reader bei einer Absorptionswellenlänge von 490 nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 4$ Wells pro Behandlung.

Die Ergebnisse des LDH-Assays ergaben eine erhöhte Absorption und damit den Nachweis einer vermehrten Freisetzung von LDH in das Medium bei mit Rotenon bzw. Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten. Bei mit Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten deckten sich die Ergebnisse des LDH-Assays mit den Untersuchungen der Phasenkontrast- und der Immunfluoreszenzmikroskopie, die beide einen deutlichen Zelluntergang nach Behandlung mit dem Inhibitor zeigten. Im Vergleich dazu erschienen die Ergebnisse des LDH-Assays bei mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten widersprüchlich zu den vorherigen Versuchen, die eine hohe Resistenz der Zellen gegenüber einer Komplex-III-Inhibition zeigten. Bei mit Oligomycin behandelten Zellen zeigte sich keine erhöhte LDH-Freisetzung, trotz deutlicher morphologischer Unterschiede zur DMSO-Kontrollgruppe und einer gleichzeitigen Abnahme der Zelldichte.

4.7 Neonatale Kardiomyozyten zeigen ein ähnliches Verhalten wie embryonale Kardiomyozyten unter einer mitochondrialen Komplex-III-Inhibition

Eine weitere Frage, die sich aus den Ergebnissen vorheriger Versuche ergab, war die nach dem Zeitpunkt im Verlauf der Entwicklung bzw. dem Stadium der Differenzierung von Kardiomyozyten, zu dem es zu einer solch deutlichen Abnahme der Stressresistenz kommt,

wie sie sich in vorherigen Abschnitten zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten gezeigt hatte. Zu diesem Zweck erfolgte die Untersuchung neonataler Kardiomyozyten und ihre Reaktion auf eine mitochondriale Komplex-III-Inhibierung. Angelehnt an die vorherigen Experimente der embryonalen Kardiomyozyten wurde für die in-vitro-Behandlung der neonatalen Kardiomyozyten zunächst ebenfalls eine Konzentration von 50 μ M Antimycin A für 12 h und 24 h gewählt. Im Anschluss erfolgte die morphologische Beurteilung der Zellen mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie. Während bei einer Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung keine offensichtlichen Veränderungen in Konfluenz, Morphologie oder Kontraktilität der Zellen deutlich wurden (Abbildung 47,A) so zeigte die Phasenkontrastmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung innerhalb der mit AMA behandelten, neonatalen Kardiomyozyten deutliche morphologische Veränderungen mit runden, gleichmäßig über die Zellen verteilten Strukturen, die an Vakuolen erinnern (Abbildung 47,B).

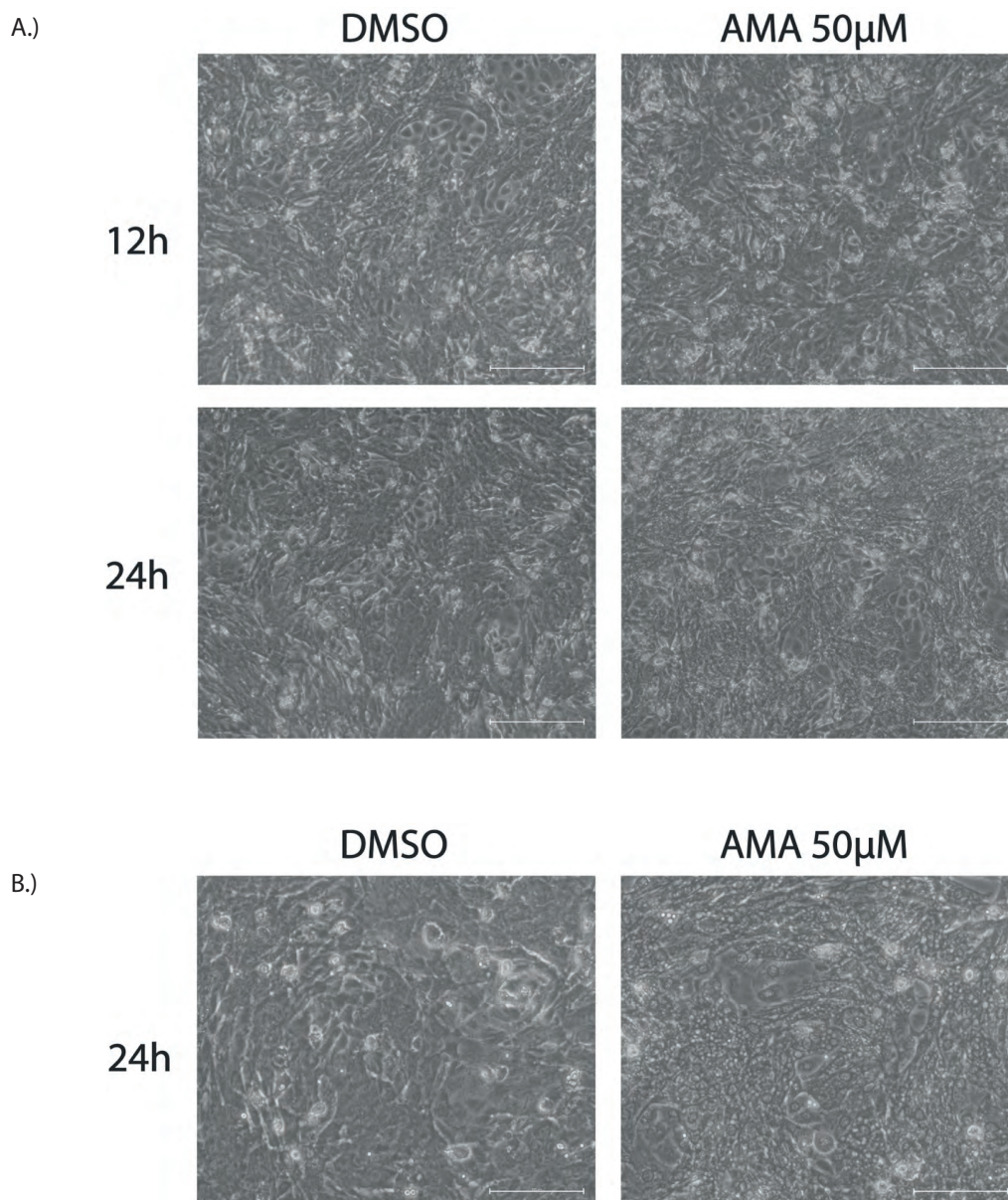


Abbildung 47 Phasenkontrastmikroskopie neonataler Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

Die repräsentativen Phasenkontrastbilder in 10x- (A) und 20x-Vergrößerung (B) zeigen über 12 und 24 Stunden mit 50 μ M Antimycin A behandelte, neonatale Kardiomyozyten. Im Vergleich dargestellt ist die Kontrollgruppe mit DMSO-Behandlung in gleicher Menge. Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 200 μ m (A) und 100 μ m (B).

Die mit Antimycin A behandelten Zellen zeigten in der Phasenkontrastmikroskopie keine Abnahme ihrer Konfluenz oder Adhärenz und damit keine Anzeichen für Zelltod. Jedoch waren Veränderungen ihrer Morphologie mit neu aufgetretenen, runden Strukturen innerhalb der Zellen nachweisbar.

Zusammenfassend deutete die phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der neonatalen Kardiomyozyten auf einen eher moderaten Effekt der Komplex-III-Inhibition hin. Die Aufnahmen der Phasenkontrastmikroskopie zeigten keinen erkennbaren Unterschied in Konfluenz und keinen Hinweis auf massiven Zelltod. Jedoch konnte in stärkerer Vergrößerung ein sichtbarer Effekt auf die Morphologie bei Antimycin A nachgewiesen werden, im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

5. Diskussion

Grundlage dieser Arbeit war die Hypothese einer hohen Stresstoleranz embryonaler Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress, bedingt durch unterschiedliche zelluläre Schutzmechanismen, die in terminal differenzierten Herzmuskelzellen verloren gehen. Die Ergebnisse der in der Arbeit aufgeführten Untersuchungen bestätigten eine deutlich höhere Stresstoleranz embryonaler Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition. Wie auch H9c2-Zellen, tolerierten die embryonalen Kardiomyozyten eine mitochondriale Dysfunktion bei Behandlung mit 50 μM Antimycin A über 24 Stunden, während adulte Kardiomyozyten bereits bei 1 μM nach nur 2 Stunden einen deutlichen Zelluntergang zeigten. Weiteres Ziel des Projektes war es, die entsprechende Stressreaktion in kultivierten, primären embryonalen und adulten Kardiomyozyten der Maus bei mitochondrialer Dysfunktion näher zu untersuchen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stressreaktion embryonaler und adulter Kardiomyozyten. Es konnte eine Aktivierung typischer Effektoren der ISR sowie eine Reihe antioxidativer Mechanismen in embryonalen Kardiomyozyten nachgewiesen werden, die potentiell an der hohen Stresstoleranz der Zellen beteiligt sein könnten. Die in Voruntersuchung vermutete Aktivierung der UPR^{mt} konnte nicht nachgewiesen werden. Die zugrunde liegenden zellprotektiven Mechanismen könnten zum einen therapeutische Angriffspunkte und zum anderen eine Kardioprotektion (siehe Abschnitt 2) durch Reaktivierung protektiver, embryonaler Mechanismen in adulten Kardiomyozyten bieten und so deren Überleben unter pathologischen Bedingungen verbessern. Auch ergibt sich die Frage nach dem Einfluss auf die pränatale Herzentwicklung und die Vermeidung angeborener Herzerkrankungen durch die hohe Stresstoleranz und Plastizität embryonaler Kardiomyozyten.

5.1 Vergleich der Effekte einer mitochondrialen Komplex-III-Inhibition auf embryonale, neonatale und adulte Kardiomyozyten

Unsere Versuche an embryonalen Maus-Kardiomyozyten zeigten eine hohe Toleranz der Zellen gegenüber einer Inhibition von Komplex III der Atmungskette durch Antimycin A in einer Konzentration von 50 μM über 24 Stunden. In der Phasenkontrastmikroskopie präsentierten sich die embryonalen Kardiomyozyten als kontrahierender und konfluenter Zellrasen ohne offensichtliche morphologische Veränderungen (Abbildung 12). Ein phasenkontrastmikroskopisch sichtbarer Zelluntergang im Sinne abgelöster oder abgerundeter Zellen zeigte sich nicht. Auch bei Quantifizierung der Kardiomyozyten-Dichte oder des Kardiomyozyten/Nicht-Kardiomyozyten-Verhältnisses ergaben sich keine Anzeichen für einen Zellverlust (Abbildung 14) oder einen Zellzyklusarrest, gemessen anhand der Co-Färbung von Nkx2.5 und Ki67 in der Immunfluoreszenz (Abbildung 15). Nicht-Kardiomyozyten

hingegen zeigten eine Reduktion des Zellzyklus unter AMA, sodass dies die Spekulation zulässt, ob embryonale Kardiomyozyten in der Hinsicht sogar ‚resistenter‘ als Nicht-Kardiomyozyten sind. Eine andere Erklärung läge in den sehr unterschiedlichen Zellzyklus-Raten (60 % Ki67 in Nicht-Kardiomyozyten versus 3 % in Kardiomyozyten), so dass ein Effekt in Kardiomyozyten möglicherweise kaum messbar ist (siehe Abschnitt 5.3.1). Ein drastischer Zelluntergang zeigte sich dagegen bei adulten Kardiomyozyten, die bei Antimycin-A-Konzentrationen von nur 1 μM bereits nach wenigen Minuten einen deutlichen Zellverlust zeigten, sich abrundeten und ihre Adhärenz verloren (Abbildung 32). Die Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit vorherigen Studien in kardialen Zelllinien und in-vivo Beobachtungen in der Maus. Die undifferenzierten H9c2-Kardiomyoblasten zeigten, wie auch embryonale Kardiomyozyten, eine hohe Toleranz gegenüber einer Antimycin-A-Behandlung mit minimaler Induktion von Zelltod, ohne Beeinflussung des Zellzyklus¹⁰². H9c2-Myoblasten sind in der Lage, sich zu adulten Muskelzellen zu differenzieren, die in Abhängigkeit von den Zellkulturbedingungen eher Charakteristika von Herz- oder Skelettmuskulatur besitzen¹⁵⁸. Die Fähigkeit zur Differenzierung bietet auch bei H9c2-Zellen die Möglichkeit, den Einfluss pathologischer Bedingungen in Bezug auf das Differenzierungsstadium der Zellen zu untersuchen. So konnten Branco et al. 2012 eine erhöhte Akkumulation und eine damit einhergehende Toxizität von Doxorubicin (siehe Abschnitt 1.1) in differenzierten H9c2-Zellen im Vergleich zum undifferenzierten Stadium nachweisen. Insbesondere Zellen, deren Zellkulturbedingungen eine Differenzierung hin zum kardialen Phänotyp bedingen, zeigten 48 Stunden nach Behandlung einen signifikant höheren Doxorubicin-induzierten Zelltod. Und auch die Zytotoxizität des kardiotoxischen Sympathomimetikums Isoproterenol war in differenzierten H9c2-Zellen erhöht¹⁵⁸.

Die Inkubation der differenzierten H9c2-Zellen mit Isoproterenol ging unter anderem mit einer zytosolischen Überladung mit Calcium, vermehrtem oxidativem Stress und einer Depolarisierung und Funktionsverlust der Mitochondrien einher. Undifferenzierte H9c2-Zellen weisen im Vergleich zum differenzierten Stadium einen erhöhten Gehalt anti-apoptotischer und antioxidativer Proteine wie SOD2 auf. Wie auch im Rahmen der zugrundeliegenden Hypothese dieser Arbeit formuliert, zeigten sie damit Schutzmechanismen, die eine erhöhte Toleranz in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium bedingen können¹⁵⁸.

Die differenzierten HL-1 Zellen (Vorhof-Kardiomyozyten der Maus) gingen, wie auch die adulten Kardiomyozyten, bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen durch eine Mischung aus Zelltod und Zellzyklusarrest zugrunde¹⁰². Auch embryonale Kardiomyozyten in vivo, mit einer durch das Fehlen von Cytochrom-C-bedingten Dysfunktion von Komplex III der Atmungskette, werden im Laufe der intrauterinen Entwicklung nicht eliminiert und überleben die mitochondriale Dysfunktion bis ins Erwachsenenalter (siehe Abschnitt 1.4)¹⁰¹. Zunächst bestätigte sich die hohe Stressresistenz embryonaler Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten

Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion damit auch in den Primärzellen. Die Ergebnisse werfen die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung bzw. Differenzierung es zu einer verminderten Toleranz der Zellen gegenüber einer Komplex-III-Inhibierung kommt und welche Mechanismen die undifferenzierten, embryonalen Kardiomyozyten vor einem Zelluntergang schützen. Um das Herz auf eine lebenslang effiziente Pumpfunktion vorzubereiten, durchläuft es während der intrauterinen, perinatalen und postnatalen Entwicklung verschiedene Reifungsprozesse. Solche Reifungsprozesse umfassen strukturelle und metabolische Anpassungen, sowie Veränderungen der Genexpression. Beispiele für die strukturellen Veränderungen reifender Kardiomyozyten sind eine massive Ausdehnung der Sarkomere mit Veränderung ihrer ultrastrukturellen Organisation, nachweisbar in der Transmissionselektronenmikroskopie ^{159,160}. Auch bei Zellorganellen wie den Mitochondrien kommt es dabei zu verschiedenen Reifungsprozessen. Während der Entwicklung vom fetalen zum adulten Herzen kommt es in der Perinatalphase zu einer Umstellung des Metabolismus von der primären ATP-Produktion durch Glykolyse zu einem oxidativen Metabolismus ^{161,159,162,160,95}. Dabei kommt es zu einer veränderten Genexpression, die sich in einer gesteigerten Expression von Genen der mitochondrialen Biogenese, oxidativen Phosphorylierung, β -Oxidation von Fettsäuren und einer verminderten Expression glykolytischer Gene äußert ^{163,160}. Hierbei muss das adulte menschliche Herz den hohen Bedarf von rund 6 kg ATP am Tag decken ¹⁵⁹. Die β -Oxidation von Fettsäuren stellt dabei den effizientesten Weg zur Bereitstellung von ATP dar und überwiegt im postnatalen Herzen ¹⁶⁰. Um dies zu gewährleisten, kommt es innerhalb der differenzierten Kardiomyozyten zu einer Zunahme von Masse und Anzahl der Mitochondrien ^{159,160,164}. Die Umstellung des Metabolismus und damit die Art der ATP-Bildung könnte eine mögliche Erklärung für die deutlich höhere Toleranz der embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu den adulten Kardiomyozyten sein. Durch die in embryonalen Kardiomyozyten primär im Rahmen der Glykolyse stattfindende ATP-Produktion sind diese weniger auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen und somit gegebenenfalls nicht in gleichen Maßen anfällig für eine Komplex-III-Inhibition wie die adulten Kardiomyozyten. Zum einen, da vor diesem Hintergrund ein weniger drastischer Energiemangel anzunehmen ist als in adulten Kardiomyozyten und zum anderen gegebenenfalls auch aufgrund einer geringeren Produktion von ROS entlang der Atmungskette. Durch den Anstieg der mitochondrialen β -Oxidation kommt es nach der Geburt zu einer vermehrten Produktion von ROS, welche in den Tagen nach der Geburt einen oxidativen DNA-Schaden hervorrufen und somit am postnatalen Zellzyklusarrest der Kardiomyozyten beteiligt sind ¹⁶⁵. Die Analyse der RNA-Expression im Verlaufe der intrauterinen und postnatalen Entwicklung von Mensch und Maus durch die Arbeit mit der Datenbank des Kaessman-Labors ¹⁵¹ (Abbildung 39) und auch unsere Western-Blot-Analysen (Abbildung 38) zeigten, dass es in adulten Kardiomyozyten bzw. im postnatalen Herzen zu

einer Hochregulation von Genen kommt, die an der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase beteiligt sind (siehe Abschnitt 4.5). Durch die metabolischen Veränderungen während der Reifung der Kardiomyozyten, von einer Energieproduktion auf Basis von Glykolyse zu einem oxidativen Metabolismus, könnte eine vermehrte Produktion von ROS einen höheren Bedarf antioxidativer Mechanismen erforderlich machen. Eine Produktion von ROS entlang der Atmungskette kann zur Oxidation von Proteinen, DNA und Lipiden führen und mit Zellschädigung und Zelltod einhergehen^{111,166}. Eine vermehrte Exposition von Kardiomyozyten gegenüber ROS führt zu einer Funktionseinschränkung des Herzens mit Rhythmusstörungen und kann zu Apoptose, Nekrose und Fibrose führen, was einen Umbau des Herzens bedingt^{166,167}. Bei einer exzessiven Produktion von ROS im Rahmen einer mitochondrialen Dysfunktion^{50,166}, könnte das Redox-System der adulten Kardiomyozyten ausgereizt sein und die Zellen nicht länger suffizient vor einem ROS-bedingten Zellverlust schützen. Im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten zeigten embryonale Kardiomyozyten unter Antimycin A eine Induktion von HO-1 (Abbildung 24), SOD1 und SOD2 (Abbildung 25). Embryonale Kardiomyozyten scheinen also eine Reserve zu haben, um die Redox-Homöostase hochzufahren. Dabei zu beachten ist der kurze Zeitraum der AMA-Behandlung bei adulten Kardiomyozyten, der gegebenenfalls eine messbare Induktion der Proteine nicht zulässt.

Um zu untersuchen, ob es bereits mit der Geburt zu einer Abnahme der Stresstoleranz der Kardiomyozyten kommt, untersuchten wir auch neonatale Kardiomyozyten. Unsere Ergebnisse zeigten in der Phasenkontrastmikroskopie bei einer Konzentration von 10 μ M Antimycin A leichte morphologische Veränderungen neonataler Kardiomyozyten ohne offensichtliche Veränderungen in Konfluenz und Kontraktilität (Abbildung 47). Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich kein Anhalt für einen übermäßigen Zelltod, sondern die Stresstoleranz neonataler Kardiomyozyten blieb also weitestgehend erhalten. Die Phasenkontrastmikroskopie neonataler Kardiomyozyten bei Behandlung mit AMA zeigt jedoch morphologische Veränderungen mit runden, gleichmäßig über die Zellen verteilten Strukturen, die an Vakuolen erinnern (siehe Abbildung 47B). Eine mögliche Erklärung wäre eine beginnende Apoptose bzw. Degradierung der Zellen durch eine Behandlung mit Antimycin A. In diesem streng regulierten Prozess kommt es zu der Bildung membranumhüllter Partikel, bezeichnet als apoptotische Körper, die Zellorganellen und Teile des Zellkernes enthalten. Die gebildeten apoptotischen Körper können dann im nächsten Schritt phagozytiert und somit abgebaut werden^{168,169}. Eine weitere Theorie wäre die Bildung von Autophagosomen bzw. Lysosomen im Rahmen einer vermehrten Autophagie. Als Autophagie wird ein Prozess bezeichnet, bei dem es zum intrazellulären Abbau zytoplasmatischer Elemente kommt¹⁷⁰. Auch im Herzen wird dies als wichtiger Prozess zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion angesehen, indem er zur Schadensbegrenzung sowohl unter

physiologischen Bedingungen als auch im Rahmen von zellulärem Stress kommt. In adulten Kardiomyozyten ist die Autophagie beispielsweise entscheidend am Abbau anfallender Proteinaggregate beteiligt und damit an der sog. PQC (*protein quality control*) (siehe Abschnitt 1.3.2), sowie dem Abbau beschädigter Zellorganellen. Abzubauenen Zellbestandteile, wie fehlgefaltete Proteine oder Organellen wie die Mitochondrien (Mitophagie), werden durch die von einer Doppelmembran umgebenden Autophagosomen aufgenommen. Diese verschmelzen mit den Lysosomen zu sogenannten Autophagolysosomen, die der Degradierung der enthaltenen Bestandteile dienen¹⁷⁰. Dabei wird der Autophagie auch eine wichtige Rolle in alternden Zellen zugesprochen und sie nimmt im alternden Herzen zunehmend ab, wodurch es zu einer zunehmenden Akkumulation fehlgefalteter Proteine, dysfunktionaler Mitochondrien und DNA-Schäden kommt^{3,170}. Neonatale Kardiomyozyten könnten also eine zunehmende Autophagie aufweisen, um so dysfunktionale Mitochondrien aufgrund einer Inhibition der Atmungskette abzubauen. Wodurch die Veränderungen bedingt sind, muss durch eine genauere Bildgebung im Rahmen einer Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) geklärt werden. Zu welchem Zeitpunkt und in welchem Stadium der Differenzierung genau es zu einem Verlust der Toleranz der Kardiomyozyten gegenüber einer Komplex-III-Inhibition kommt, bleibt vorerst ungeklärt und bedarf weiteren Untersuchungen. Auch in der Literatur gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse, die den Zeitpunkt, zu dem es zu einem Verlust der Stressresistenz kommt, eingrenzen könnten.

5.2 Aktivierung zellulärer Schutzmechanismen in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

Oxidativer Stress führt unter anderem zur Ansammlung fehlgefalteter und dysfunktionaler Proteine, was zu einer Proteinaggregation innerhalb der Zellen führen kann. Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist die funktionale Integrität des Proteoms essentiell. Um dies zu gewährleisten, unterliegen die zellulären Proteine einer strengen Qualitätskontrolle (*Protein quality control* = PQC) (siehe Abschnitt 1.3.2)⁶⁴. Teil dieser strengen Qualitätskontrolle ist die *unfolded-protein-response* (UPR), ein organellspezifisches, transkriptionelles Programm, welches zu einer Inhibition der Proteintranslation mit selektiver Translation ausgewählter Proteine führt (siehe Abschnitt 1.3.3). Dabei kommt es im Zuge der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase zur Induktion bestimmter Chaperone und Proteasen. In Säugern ist die UPR dabei eng verbunden mit der *Integrated-Stress-Response* (ISR), initiiert durch die Phosphorylierung von eIF2 α durch verschiedene Kinasen (siehe Abschnitt 1.3.3)⁷⁷. Zhang et al. (2021) zeigten, dass die ISR (siehe Abschnitt 1.3.3) das Überleben von Kardiomyozyten bei Ischämie/Reperfusionsschaden (siehe Abschnitt 1.1) durch eine selektive Reduktion der mitochondrialen Protein-Synthese und der ROS-Produktion in vivo verbessern kann. Die UPR^{mt} blieb dabei, wie auch in unseren Daten in embryonalen

Kardiomyozyten unter AMA Behandlung, unberührt (siehe Abschnitt 1.3.3). Des Weiteren konnte dabei auch eine Kardioprotektion durch medikamentöse Aktivierung der ISR bei Reperfusion in vivo gezeigt werden ¹⁷¹.

Die ISR gehört zu einem der Signalwege, die neben den antioxidativen Mechanismen eine Erklärung der Unterschiede zwischen embryonaler und adulter Stressantwort bieten könnten. Embryonale Kardiomyozyten zeigten nach 24, aber auch nach 2 Stunden Antimycin-A-Behandlung (50 μM) eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α (vgl. Abbildung 17, Abbildung 33) und eine Induktion von CHOP (vgl. Abbildung 17, Abbildung 34), sowie eine Induktion von ATF4 nach 24 Stunden und fraglich auch nach 2 Stunden (vgl. Abbildung 17, Abbildung 34), was auf eine Aktivierung der ISR hindeutet. Adulte Kardiomyozyten zeigten in niedriger Antimycin-A-Dosierung (1 μM) ebenfalls eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α (Abbildung 33), eine Aktivierung von CHOP blieb jedoch aus (Abbildung 34). Dabei stellt sich die Frage nach dem zeitlichen Aspekt bzw. der Dynamik der ISR-Antwort. Die Ergebnisse könnten für eine höhere Geschwindigkeit der ISR-Antwort in embryonalen als in adulten Kardiomyozyten hindeuten. Eine andere Möglichkeit wäre die einer möglichen CHOP-unabhängigen ISR, sodass eine Phosphorylierung von eIF2 α von einer CHOP-Induktion entkoppelt wäre. Die protektive Rolle der ISR in Kardiomyozyten und anderen Zelltypen konnte in der Literatur bereits an mehreren Stellen nachgewiesen werden ¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts kommt es zu einem Verlust von Herzmuskelzellen, was sich in einem kardialen Remodelling äußern und zu einem Herzversagen führen kann ¹⁷⁵. Hierbei haben Li et al. (2015) gezeigt, dass Salubrinal Kardiomyozyten im Rattenmodell vor einer durch Myokardinfarkt induzierten Apoptose nach LAD-Ligatur schützt. Salubrinal, eine niedermolekulare Verbindung, hemmt dabei die Dephosphorylierung von eIF2 α und damit die Proteintranslation. Dadurch kann die Proteinhomöostase aufrechterhalten werden. So zeigte sich in Studien eine verstärkte Induktion von eIF2 α -Phosphorylierung und eine verringerte Infarktgröße ^{175,176}.

Auch bei Hypoxie oder einer Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten des ventrikulären Ratten-Herzens mit Tunicamycin zeigte Salubrinal protektive Effekte durch die Aktivierung des PERK-eIF2 α -Signalweges, gemessen anhand verschiedener Assays zum Nachweis einer Apoptose ¹⁷⁷. Der Nachweis einer vermehrten Phosphorylierung von eIF2 α wirft die Frage nach der zugrundeliegenden Upstream-Kinase auf, die in AMA-behandelten embryonalen Kardiomyozyten für die vermehrte Phosphorylierung verantwortlich ist. Die ISR wird in Abhängigkeit vom auslösenden Stress durch vier verschiedene Kinasen aktiviert (PKR, HRI, GCN2 und PERK) (siehe Abschnitt 1.3.3) ^{71,80}. Die genaue Identifikation der Upstream-Kinase in Abhängigkeit von der auslösenden Bedingung könnte auch im Rahmen von therapeutischen Strategien eine individuellere Manipulation der Stressreaktion bzw. ISR ermöglichen, die durch

Dauer und Umgebungsfaktoren essentiell für die Homöostase oder aber auch pro-apoptisch sein kann ⁸².

Auch für den nachgeschalteten Transkriptionsfaktor CHOP sind in der Literatur sowohl apoptotische als auch zytoprotektive Effekte beschrieben ¹⁷⁸. CHOP ist unter anderem an der Expression von Genen zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Proteinhomöostase beteiligt ⁹⁰. Kaspar et al. (2021) zeigten, dass ein Verlust von CHOP bei genetisch induzierter mitochondrialer Dysfunktion zu früh eintretenden, tödlichen mitochondrialen Kardiomyopathien in Mäusen führte ⁹³. Dies war dabei auf eine Überaktivität der ISR zurückzuführen. Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 erläutert, zeigten Kasper et al. (2021), dass CHOP eine Feinabstimmung der ISR gewährleistet, indem eine Überaktivität von ATF4 verhindert wird. Kommt es bei mitochondrialer Dysfunktion im Herzen zu einem Verlust von CHOP, führt dies zu einer anhaltend reduzierten Proteinsynthese in vivo, die in einer Fehlfunktion der mitochondrialen Atmung durch Verlust der Komplexe der Atmungskette endet ⁹³. In adulten Kardiomyozyten zeigten unsere Ergebnisse eine Induktion von $\text{elf}2\alpha$, welche als ein früher Schritt der ISR auf dessen Aktivierung hindeutet, ohne dass sich bereits eine Induktion von CHOP als einen der nachfolgenden Schritte der ISR nachweisen ließ. Eine Unfähigkeit zur Aktivierung, Aufrechterhaltung oder auch Feinabstimmung der ISR könnte mit zu einem Zellverlust adulter Kardiomyozyten unter Antimycin A beitragen. Die Aktivierung von CHOP könnte hingegen in embryonalen Kardiomyozyten protektiv wirken.

Höhere Dosierungen von Antimycin A führten zu einem nahezu unmittelbaren Verlust der zellulären Integrität von adulten Kardiomyozyten. Der drastische Zelluntergang innerhalb von Minuten erschwerte eine Beurteilung möglicher stress-sensitiver Signalwege, da die Zellen womöglich nicht genug Zeit hatten, um auf die Gegebenheiten mit einer Aktivierung entsprechender Signalwege zu reagieren. Der Zelluntergang der adulten Kardiomyozyten legt zudem die Frage nach dem verantwortlichen Zelltod-Mechanismus nahe. Apoptose ist eine regulierte und kontrollierte Form des Zelltodes, ausgelöst durch eine Reihe von Caspasen in Form einer kontrollierten Kaskade ¹⁷⁹. Apoptotische Zellen zeigen eine nukleäre und zytoplasmatische Kondensation, die Bildung von apoptotischen Körpern und einen Erhalt einer intakten Plasmamembran ¹⁷⁹. Dem gegenüber steht die Nekrose, eine eher passive und unkontrollierte Form des Zelltodes mit Ruptur der Zellmembran ¹⁷⁹. Der drastische und rapide Zelluntergang adulter Kardiomyozyten unter einer AMA-Behandlung deutet auf eine eher unkontrollierte Form des Zelltodes im Sinne einer Nekrose hin, der keinen Ablauf von kontrollierten Kaskaden im Rahmen einer Apoptose erlaubt. Eine genauere Identifizierung des zugrundeliegenden Mechanismus könnte in weiteren Versuchen mithilfe verschiedener Apoptose-Assays untersucht werden.

Während die Aktivierung von ATF4, CHOP und $\text{elf}2\alpha$ in mit AMA behandelten embryonalen Kardiomyozyten eine Aktivierung der ISR nahe legten, ergab sich kein Anhalt für eine

Aktivierung der UPR^{mt}. Zwar sind ATF4, CHOP und eIF2 α auch Teil der UPR^{mt}, jedoch zeigte sich keine der getesteten, Mitochondrien-spezifischen Proteasen der UPR^{mt} (CLPP, PMPCB, YME1L1), noch das für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Proteinhomöostase relevante Chaperon HSP60 signifikant induziert (Abbildung 20). Auch ATF5, welches in der Studie von Fiorese et al. (2016) als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der UPR^{mt} und als Analogon zu ATFS-1 im Fadenwurm *C. elegans* identifiziert wurde, konnte in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA-Behandlung nicht vermehrt nachgewiesen werden (Abbildung 17). Was zu der Entkopplung einer mitochondrialen Dysfunktion und der UPR^{mt} führte und ob diese spezifisch für die Inhibierung von Komplex III ist, bleibt somit zu klären. Des Weiteren ließe sich spekulieren, ob AMA in anderen Zelltypen oder Organen mit einer Aktivierung der UPR^{mt} einhergehen würde. Dazu wäre ein genaues Verständnis der aktivierenden Mechanismen und Signalwege wichtig, die einer Aktivierung der UPR^{mt} vorausgehen und eine Kommunikation von Zellkern und Mitochondrien voraussetzt. Sutandy et al. (2023) zeigten, dass die UPR^{mt} durch zwei verschiedene Signale im Zytosol nach medikamentöser Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion in HeLa-Zellen bedingt wird. Zum einen führt die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Mitochondrium zu einer vermehrten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffen in das Zytosol. Zum anderen kommt es durch Defekte des mitochondrialen Proteinimports zu einer Anhäufung von mitochondrialen Proteinvorläufern im Zytosol ¹⁸⁰.

Weitere Unterschiede zwischen embryonalen und adulten Kardiomyozyten zeigten sich in einem reduzierten HSF1-Protein-Level (Abbildung 36) und einer signifikant erhöhten Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 (Abbildung 35) in adulten, nicht aber in embryonalen Kardiomyozyten nach AMA-Behandlung. Verschiedene Studien demonstrierten bereits die kardioprotektiven Effekte von HSF1. Zou et al. (2003) zeigten beispielsweise, dass eine Überexpression von HSF1 in Kardiomyozyten der Maus zu einem verminderten apoptotischen Zellverlust im Myokard im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens führte. Zudem zeigten die Herzen der Mäuse mit einer Überexpression von HSF1 eine reduzierte Infarktgröße als Kontrolltiere ¹⁸¹. Huang et al. (2016) verdeutlichten ebenfalls die protektive Rolle von HSF1 bei einem Doxorubicin-induzierten Herzschaden (siehe Abschnitt 1.1). Ein Teil der kardiotoxischen Wirkung des Medikamentes ist dabei bedingt durch den proteasomalen Abbau und fehlende Kerntranslokation von HSF1, resultierend in einem apoptotischen Zelltod. Die Autoren zeigten außerdem, dass die Zugabe mit HSF1A, einem HSF1-Aktivator ¹⁸², sowohl in vivo als auch in vitro zu einer Reduktion eines apoptotischen Kardiomyozytenverlustes durch Doxorubicin führte ¹⁸³. Ein Verlust von HSF1 in adulten Kardiomyozyten könnte also möglicherweise mitverantwortlich für den drastischen Untergang der Zellen in Folge der mitochondrialen Dysfunktion gewesen sein. Ob die Reduktion von HSF1 an dem Verlust der adulten Kardiomyozyten unter AMA-Behandlung beteiligt war und ob HSF1 ein mögliches therapeutisches Ziel bei mitochondrialer Dysfunktion im Herzen bieten könnte, bleibt dabei in

künftigen Studien zu klären. Für HSF1 wurde auch eine Regulation der Gene der UPR^{mt} nachgewiesen¹⁸⁰. Demnach führen mitochondriale ROS zu einer Oxidation des zytosolischen HSP40-Proteins NDAJA1, was wiederum zu einer verstärkten Rekrutierung von HSP70 im Zytosol führt. HSP70 führt zu der Freisetzung von HSF1, welches in den Zellkern wandert und die Transkription von Genen der UPR^{mt} bedingt. Embryonale Kardiomyozyten zeigten keine Induktion von HSF1 als Teil der UPR^{mt}-Signalkaskade und auch, wie bereits beschrieben, keine Induktion der UPR^{mt} Proteine¹⁸⁰.

Für die Stress-induzierte MAP-Kinase p38 sind im Herzen eine Reihe an Funktionen beschrieben^{184,185}. Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens, in dem es durch eine vermehrte Produktion von ROS und eine Depolarisation der mitochondrialen Membran zu einer mitochondrialen Schwellung und Ruptur kommt, einhergehend mit einem vermehrten Nekro-apoptotischem Zellverlust¹⁸⁶. Kumphune et al. (2015) konnten anhand von isolierten Mitochondrien des adulten Rattenherzens nach Ischämie-Reperfusion zeigen, dass eine Inhibition von p38 eine Schwellung der Mitochondrien vermindert und ultrastrukturellen Veränderungen sowie eine Depolarisation der Mitochondrienmembran und somit einhergehenden apoptotischen Zellverlust reduziert. Eine Reihe weiterer Studien weisen auf den pro-apoptotischen Effekt von p38 im Herzen hin¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. So könnte p38 also auch in adulten Kardiomyozyten unter AMA-Behandlung gegebenenfalls einen eher negativen Effekt auf das Überleben der Zellen haben, sodass diese von einer Inhibition profitieren könnten. Die vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38-MAP-Kinase zeigte sich auch in mit AMA behandelten H9c2-Zellen¹⁰² und in embryonalen HCCS-defizienten Mausherzen¹⁰¹. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse von den embryonalen Kardiomyozyten, in denen keine vermehrte Phosphorylierung von p38 unter AMA nachgewiesen werden konnte.

Als zentralen Punkt zeigen unsere Ergebnisse die wesentliche Abnahme in der Stresstoleranz der sich differenzierenden Kardiomyozyten. Mögliche Erklärungen bieten insbesondere unterschiedlich hohe ROS-Level aufgrund von metabolischen Eigenschaften der Energiegewinnung und Unterschiede in zellulären, stressreaktiven Signalwegen wie der *Heat-Shock-Response*, der ISR und den antioxidativen Mechanismen bzw. der Redox-Homöostase.

5.3 Aktivierung der ER-Stress Achse in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition

Durch Alterungsprozesse oder Erkrankungen wie einer Ischämie des Herzens kann es zu einem Ungleichgewicht der Proteinhomöostase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) kommen. Durch ein Missverhältnis zwischen der Kapazität der Faltungsmaschinerie des Zellkompartiments und fehlerhaft synthetisierten Proteinen kann es zu einer Anhäufung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im ER kommen. Um deren proteotoxische

Wirkungen zu vermindern und die Proteinhomöostase wiederherzustellen, gibt es die UPR^{ER}¹⁸⁸. Im Rahmen der UPR^{ER} kommt es zu einer selektiven Induktion von Proteinen wie ER-Chaperonen, die Faltungsprozesse und den Abbau fehlgefalteter Proteine innerhalb des ER unterstützen sollen. Die globale Proteinsynthese wird dabei reduziert, um so insgesamt die Faltungsmaschinerie der Organelle zu entlasten¹⁸⁸. Abbildung 21 zeigt eine signifikante Induktion von BiP, einem ER-Chaperon (auch bekannt als GRP78), in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA-Behandlung. BiP ist durch seine Interaktion mit IRE1, PERK und ATF6 auf der luminalen Seite der ER-Membran ein wichtiger Faktor und an der UPR^{er} beteiligt²⁵. In Kardiomyozyten und auch anderen Zelltypen wird BiP im Rahmen von ER-Stress induziert und soll im Zuge dessen auch als ER-Stresssensor dienen^{146,188}. Die Induktion von BiP deutet somit in embryonalen Kardiomyozyten unter Behandlung mit AMA auf ER-Stress hin. Eine Ursache für ER-Stress bei mitochondrialer Dysfunktion kann der vermehrte oxidative Stress sein, der sowohl in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten (siehe Abbildung 22) als auch in H9c2-Zellen über eine vermehrte Produktion von ROS mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes MitoSOX und die Hyperoxidation von PRDX nachgewiesen wurde¹⁰². Über Kontaktstellen, sogenannte MAM (*Mitochondria-associated membrane*), können ROS von den Mitochondrien direkt in das ER transportiert werden^{189,190}. Des Weiteren beeinflussen die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien viele Prozesse wie die Autophagie, Apoptose, Inflammation und die Regulation des Calciumhaushaltes¹⁹⁰. Durch ihre zahlreichen Funktionen werden ihnen zudem eine Rolle in der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen zugesprochen¹⁹⁰. Vermehrter oxidativer Stress kann im Endoplasmatischen Retikulum zu einer Ansammlung fehlgefalteter Proteine führen und damit zu ER-Stress und einer Störung der zellulären Homöostase¹⁸⁹. Dabei verfügt das Endoplasmatische Retikulum über nur geringe antioxidative Mechanismen im Vergleich zu anderen Zellorganellen wie den Mitochondrien¹⁸⁹. Die mitochondriale Funktion und die des Endoplasmatischen Retikulums hängen unter physiologischen Bedingungen eng zusammen, weshalb das Endoplasmatische Retikulum auch bei einer mitochondrialen Dysfunktion beteiligt sein kann²⁵.

Ein Protein, welches an ebendieser Interaktion zwischen ER und Mitochondrien beteiligt ist, ist das in der Mitochondrienmembran lokalisierte Protein Mitofusin (Mfn). Mitofusin ist zum einen an der Fusion von Mitochondrien beteiligt und zum anderen an Mitofusin-vermittelten Kontakten zwischen ER und Mitochondrien¹⁴⁴. Celardo et al. (2016) zeigten den direkten Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Dysfunktion, ausgelöst durch Mutationen mitochondrialer Enzyme und einer Aktivierung von stressreaktiven Signalwegen des Endoplasmatischen Retikulums in neuronalen Zellen von *Drosophila*. Dabei ermittelten sie eine Aktivierung von PERK und Induktion von BiP als typische Bestandteile der UPR^{er}. Ausgelöst wurde die ER-Stress-Achse dabei durch Mitofusin-vermittelte Membrankontakte

zwischen den defekten Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum. Ein Knockdown von *dMfn* (*Drosophila*-Mitofusin) zur Reduktion der Mitofusin-Kontaktstellen konnte ER-Stress reduzieren und damit zellprotektiv wirken, ohne die mitochondriale Funktion positiv zu beeinflussen. Die vermehrte Produktion von ROS in embryonalen Kardiomyozyten oder auch Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER bieten mögliche Erklärungen für die Induktion von BiP und damit einem ER-Stress bei einer Komplex-III-Inhibition.

Ein Transkriptionsfaktor, der entscheidend an der intrauterinen Proliferation sowohl embryonaler als auch adulter Kardiomyozyten nach einem Myokardschaden ist, ist Tbx20 (T-Box-Transkriptionsfaktor 20)^{191,192}. Tbx20 ist unter anderem entscheidend an der Entwicklung des Herzens durch Proliferation von Kardiomyozyten beteiligt¹⁹¹. Dadurch führt ein Verlust zur Fehlbildung des embryonalen Herzens^{193,194}. Doch nicht nur in embryonalen Herzen ist Tbx20 essentiell, sondern auch in adulten Herzen scheint Tbx20 eine wichtige Rolle für die kardiale Funktion zu spielen. Ein Knockout von Tbx20 führte zu schweren Kardiomyopathien und Arrhythmien, die im Tod der Mäuse resultierten¹⁹⁵. Eine Überexpression von Tbx20 in adulten Kardiomyozyten der Maus hingegen förderte die Proliferation und verbesserte die kardiale Funktion und das Überleben und führte zu einer Reduktion der Infarktgröße nach Myokardinfarkt in Mausherzen¹⁹². Das et al. (2023) konnten zudem zeigen, dass Tbx20 durch Induktion von ER-Stress in H9c2-Zellen und adulten Mausherzen in vivo hochreguliert wurde, was zu einer Proliferation der Kardiomyozyten führte und eine Apoptose einschränkte. Vermittelt wurde die Erhöhung von Tbx20 dabei durch die UPR^{ER} und insbesondere durch die vermehrte Expression von ATF6, welcher direkt an den Promoter des *tbx20*-Gens bindet und dadurch dessen Expression fördert¹⁹⁴. Damit nimmt die UPR^{ER} eine entscheidende Funktion bei der Regenerationsfähigkeit des adulten Herzens ein.

Die gezeigte Induktion von ER-Stress und eine möglicherweise damit einhergehende Induktion der UPR^{ER} in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten könnte damit auch hier eine zellprotektive Rolle einnehmen. Als Limitation der Arbeit ist hier zu erwähnen, dass trotz der deutlichen Hochregulation von BiP in embryonalen Kardiomyozyten bei mitochondrialer Komplex-III-Inhibition nur ein ER-Stress-Marker untersucht wurde. Um ein umfassenderes Bild einer hier anzunehmenden Beeinträchtigung des ER durch die induzierte mitochondriale Dysfunktion zu erhalten, müssten zukünftig noch weitere ER-Stress-Marker getestet werden. Beispiele hierfür wären die Phosphorylierung von PERK (induziert in H9c2-Zellen)¹⁹⁶, die Induktion von ATF6 oder gegebenenfalls auch Tbx20. Während embryonale Kardiomyozyten 24 Stunden nach einer AMA-Behandlung eine signifikante Induktion von BiP zeigten (Abbildung 21), blieb diese sowohl in embryonalen als auch adulten Kardiomyozyten 2 Stunden nach AMA-Behandlung aus (Abbildung 37). Damit scheint BiP erst mit einer gewissen zeitlichen Latenz in embryonalen Kardiomyozyten aktiviert zu werden. Um eine Aktivierung in

adulten Kardiomyozyten näher zu untersuchen, müssten daher gegebenenfalls noch Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt nach Beginn einer AMA-Behandlung erfolgen. Die Aktivierung der ER-Stress-Achse durch BiP in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten, spiegelte sich in H9c2-Zellen durch eine vermehrte Induktion der Kinase PERK wider¹⁹⁶. Bei scheinbar vermehrtem ER-Stress könnte ein Nachweis einer gesteigerten Aktivität von PERK auch in embryonalen Kardiomyozyten als Upstream-Kinase für die verstärkte Phosphorylierung von eIF2 α verantwortlich sein (siehe Abschnitt 14).

Eine verstärkte Aktivität von PERK oder eine Induktion von BiP/GRP78 konnte in embryonalen HCCS-defizienten Kardiomyozyten in vivo nicht gezeigt werden, und auch andere Marker für ER-Stress, wie ATF6 oder IRE1/XBP1, wurden nicht aktiviert¹⁰¹. Zum einen kann der ER-Stress, der sich in H9c2-Zellen und in embryonalen Kardiomyozyten zeigte, ein auf die Zellkultur begrenztes Phänomen sein, welches in vivo nicht auftritt. Zum anderen kann es erneut mit der Dynamik der Stressantwort in Zusammenhang stehen. H9c2-Zellen und embryonale Kardiomyozyten zeigten ER -Stress 24 Stunden nach der Komplex-III-Inhibition. Die Untersuchung von *Hccs*-Knockout-Herzen erfolgte zum Stadium 13,5 dpc. Gegebenenfalls führte die anhaltende mitochondriale Dysfunktion und der damit einhergehende ER-Stress zu einer Adaptation der Hccs-defizienten Kardiomyozyten, um einen Zelltod zu vermeiden, der durch dauerhaften und unkontrollierten ER-Stress und damit einhergehende Stressantworten bedingt wird¹³².

Der mit einer mitochondrialen Dysfunktion verbundene ER-Stress und die damit einhergehende Aktivierung von BiP und gegebenenfalls der UPR^{ER} in embryonalen Kardiomyozyten könnte an der hohen Toleranz der embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition beteiligt sein und damit einen Angriffspunkt zellprotektiver Strategien bieten.

5.3.1 Methodische Aspekte zur Quantifizierung der Zellzyklusaktivität in Kardiomyozyten

Ki67 ist ein gängiger Marker für die Beurteilung der Proliferation von Zellen und wird zellzyklusabhängig exprimiert. Klinisch findet er daher insbesondere bei dem Grading und der Beurteilung der Zellteilungsrate in Tumoren Anwendung¹⁹⁷. Wenn es um die Beurteilung der Proliferation von Kardiomyozyten geht, muss klar zwischen der Proliferation und einer Aktivierung des Zellzyklus ohne eine zwangsläufige Entstehung neuer Kardiomyozyten differenziert werden¹²². Laut Auchampach et al. (2022) sollte als Proliferation lediglich der Prozess bezeichnet werden, bei dem aus einem einzelnen Kardiomyozyten zwei neue Kardiomyozyten entstehen. Ki67 ist ein Indikator für die Zellzyklusaktivität und wird insbesondere in der G₂-Phase und während der Mitose exprimiert¹³⁶. Dabei kann durch Ki67 jedoch nicht zwischen einer abgeschlossenen Zellteilung (Zytokinese) im Rahmen einer

Proliferation und einer Endomitose (oder Endore(du)plikation) unterschieden werden ¹²². Als Endomitose wird eine Verdopplung der genomischen DNA und damit der Chromatiden ohne eine darauffolgende Zellteilung bezeichnet, sodass es zu der Entstehung von polyploiden Zellen oder multinukleären Zellen kommt ¹⁹⁸. Im Rahmen der Endomitose treten Kardiomyozyten in den Zellzyklus ein. Dabei kommt es auch zum Abschluss der DNA-Synthese während der S-Phase und zum Eintritt in die Mitose, ohne dass es allerdings zum Abschluss der Zellteilung (Zytokinese) kommen muss ¹²². Während Ki67 also einen Marker für die Zellzyklusaktivität darstellt, kann durch die Immunfluoreszenzfärbung nicht unterschieden werden, ob die Zelle sich letztendlich auch teilen und proliferieren wird. Andere Studien zeigten auch, dass es im Rahmen einer Hypertrophie von Kardiomyozyten zu einer vermehrten Expression von Ki67 kam ¹⁹⁹. Das Wissen über die Hintergründe einer Ki67-Expression ist also notwendig, um die korrekte Interpretation der Daten in Kardiomyozyten zu gewährleisten. Unsere Versuche haben dabei keine Unterschiede in der Zellzyklusaktivität von embryonalen Kardiomyozyten bei einer Komplex-III-Inhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt (Abbildung 15). Die Rate an Ki67-positiven Zellen lag bei Kardiomyozyten dabei nur bei 3 %. In Nicht-Kardiomyozyten lag die Rate mit rund 60 % deutlich höher und zeigte signifikante Unterschiede zwischen mit Antimycin A und mit DMSO behandelten Zellen. Diese Unterschiede könnten in Nicht-Kardiomyozyten aufgrund der deutlich höheren Anzahl Ki67-positiver Kerne mit höherer Sensitivität messbar sein. Die mit Oligomycin behandelten Zellen zeigten jedoch trotz der relativ geringen Zellzyklus-Rate signifikante Unterschiede, mit einer Reduktion auch in den embryonalen Kardiomyozyten. Die Ergebnisse unterstreichen durch die erhaltene Zellzyklusaktivität in AMA-behandelten, embryonalen Kardiomyozyten insbesondere deren Toleranz gegenüber einer Komplex-III-Inhibition und bestärken die im Vergleich herabgesetzte Resistenz gegenüber der Komplex-V-Inhibition mit Oligomycin. Die Ki67-Färbung und die erhaltene Kontraktion dienen somit insbesondere auch trotz mitochondrialer Dysfunktion als Abbild des Wohlbefindens der Zellen. Insbesondere wird dies auch noch einmal vor dem Hintergrund deutlich, dass oxidative DNA-Schäden auch in neonatalen Kardiomyozyten einen Zellzyklus-Arrest bewirkten ¹⁶⁵.

Ein in der Literatur kritizierter Aspekt bei der Quantifizierung von Zellzyklusaktivität in Kardiomyozyten ist die teils fehlende Nutzung von Kernmarkern bei der Interpretation von Ki67 oder anderen nukleär lokalisierten Markern für die Zellzyklusaktivität ¹²². Werden zur Identifizierung der Kardiomyozyten im Zellverbund lediglich Sarkomerproteine verwendet, ist die genaue Zuordnung der Ki67-positiven Zellkerne zu Kardiomyozyten schwierig ¹²². Die genaue Zuordnung von Zellkernen zu Kardiomyozyten liegt laut Ang et al. (2010) im Falle einer reinen Anfärbung mit Sarkomerproteinen wie Troponinen im Myokard-Gewebe in der Histologie bei 78–83 %. Auch wenn die Zuordnung von Kardiomyozyten in der Histologie gegenüber der Zellkultur, in der eine bessere räumliche Abgrenzung der Kardiomyozyten

möglich ist, noch einmal schwieriger ist, können Überlappungen eine genaue Zuordnung doch erschweren. Um eine genauere Zuordnung von Kernen zu ermöglichen, testeten wir drei mögliche Kardiomyozyten-Kernmarker: GATA4, MEF2 und Nkx2.5 (Abbildung 13), welche allesamt Transkriptionsfaktoren darstellen, die bei der Differenzierung von Kardiomyozyten während der frühen Herzentwicklung eine Rolle spielen ¹²². In Bezug auf die einzelnen Kernmarker gibt es dabei gewisse Einschränkungen bei der Interpretation der Daten. Der Transkriptionsfaktor GATA4 wird nicht ausschließlich von Kardiomyozyten, sondern auch von Fibroblasten exprimiert ^{122,201}. Mef2, ein Transkriptionsfaktor der kardialen Entwicklung, kann neben Kardiomyozyten auch von den glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert werden ^{122,202}. Die Expression des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 nimmt zwar mit dem Alter und fortschreitender Differenzierung ab, eignet sich aber aufgrund seiner spezifischen Anfärbung gut zur Kernfärbung in den embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten ¹²². Aufgrund seiner Spezifität bei deutlicher Anfärbung in der Immunfluoreszenzanalysen erfolgten die weiteren Versuche mit Nkx2.5.

5.4 Komplex-III-Inhibition in embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich mit dem in vivo Hccs-Modell und in vitro H9c2-Zellen

Anhand des herzspezifischen *Hccs*-Knockout-Modells (siehe Abschnitt 1.4) konnte in vivo eine hohe Stressresistenz der embryonalen Kardiomyozyten bei einer Fehlfunktion des Komplex III der Atmungskette nachgewiesen werden ¹⁰¹. Nachfolgende Untersuchungen anhand von Zelllinien in vitro dienten der genaueren Identifizierung möglicher zellulärer Mechanismen, die zu der hohen Toleranz gegenüber der mitochondrialen Dysfunktion führten ¹⁰². Die Behandlung von H9c2-Zellen erfolgte daher mit dem Komplex-III-Inhibitor Antimycin A, sodass die Fehlfunktion der Atmungskette der der HCCS-defizienten Kardiomyozyten ähnelte, bei denen mit Cytochrom C der Elektronentransporter zwischen Komplex III und IV fehlt. Verwendet wurden hierbei H9c2-Zellen als undifferenzierte Myoblasten der Ratte und die differenzierten HL-1 Zellen des atrialen Mausherzens ¹⁰². Die Erkenntnisse aus HCCS-defizienten Kardiomyozyten in vivo und den Zelllinien wies einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede mit den hier dargestellten Versuchen in embryonalen Kardiomyozyten auf. Embryonale Kardiomyozyten aktivierten unter AMA-Behandlung wie auch H9c2-Zellen und HCCS-defiziente Kardiomyozyten eine Reihe von antioxidativen Proteinen und Enzymen. HCCS-defiziente Kardiomyozyten ¹⁰¹ und H9c2-Zellen ¹⁰² zeigten eine Induktion von SOD2 und PRDX3. Während in embryonalen Kardiomyozyten keine signifikante Erhöhung von PRDX3 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich wie auch in H9c2-Zellen eine deutliche Induktion von HO-1 (Abbildung 24) und eine verstärkte Signalintensität von SOD2 in der Immunfluoreszenzanalyse (Abbildung 27). Die Immunfluoreszenznachweise in embryonalen Kardiomyozyten deckten zudem eine intrazelluläre Umverteilung von SOD2 in embryonalen

Kardiomyozyten unter AMA auf, was in Abschnitt 5.5 der Diskussion näher behandelt wird. Eine Hyperoxidierung von Peroxiredoxin zu PRDX-SO₃ als Anzeichen für anhaltenden oxidativen Stress konnte sowohl in H9c2-Zellen als auch in embryonalen Kardiomyozyten *in vitro* nachgewiesen werden. Die Aktivierung verschiedener antioxidativer Proteine und Enzyme spiegelte die Relevanz des antioxidativen Systems in unreifen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibierung wider. Als einen der wichtigsten antioxidativen Transkriptionsfaktoren für das Überleben bzw. Wachstum von H9c2-Zellen konnten Grün et al. (2022) Nrf2 identifizieren. Ein Knockdown von Nrf2 äußerte sich unter anderem in einer verminderten Expression bzw. Induktion seines Target-Gens *HO-1* und führte zu einem verminderten Wachstum und Zellverlust in den H9c2-Zellen nach der AMA-Behandlung. Während Nrf2 in H9c2-Zellen sich also als essentieller Transkriptionsfaktor der Redox-Homöostase herausstellte, konnte eine Induktion in embryonalen Kardiomyozyten unter Behandlung mit Antimycin A nicht sicher nachgewiesen werden, was zunächst einmal auf methodische Einschränkungen im Western Blot zurückzuführen sein dürfte. So war Nrf2 in embryonalen Kardiomyozyten im Western Blot nicht detektierbar und eine Quantifizierung somit nicht möglich. Auch in der Immunfluoreszenzanalyse zeigte sich keine vermehrte Signalintensität (Abbildung 26). Aus mündlichen Übermittlungen der Arbeitsgruppe geht jedoch hervor, dass der Nachweis des signifikanten Nrf2-Anstiegs in H9c2-Zellen lediglich auf Basis der RNA- und Proteinexpression nachweisbar war, nicht jedoch über die Immunfluoreszenzanalyse, in der sich wie auch in embryonalen Kardiomyozyten keine verstärkte Signalintensität unter AMA zeigte. Es ist also gut möglich, dass Nrf2 in embryonalen Kardiomyozyten ebenfalls induziert ist und der fehlende Nachweis lediglich auf methodischen Aspekten beruhte. Eine endgültige Aussage erfordert daher weitere Versuche zur genaueren Identifizierung der Dynamik der Nrf2 bei Komplex-III-Inhibition in embryonalen Kardiomyozyten. *HO-1* als eines der nachgeschalteten Zielgene von Nrf2 zeigte sich in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA signifikant erhöht (Abbildung 24) und könnte ein Hinweis für die Aktivierung der Nrf2/*HO-1*-Achse auch in Primärzellen sein. In der Literatur wird eine Induktion von *HO-1* als Antwort auf Stimuli wie Hypoxie, oxidativen Stress oder durch die Anwesenheit von Zytokinen beschrieben und dient der Neutralisation von Zellstress, unter anderem von Kardiomyozyten^{61,203}. Die durch *HO-1* entstehenden Metaboliten (Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid) beim Abbau von Häm besitzen zum Teil antioxidative Eigenschaften²⁰³. So kann Bilirubin, welches über die Biliverdin-Reduktase aus Biliverdin gewonnen werden kann, mit ROS reagieren und dabei selbst oxidiert werden. Dadurch kann es beispielsweise Hydroxyl-Radikale und Superoxid-Anionen abfangen und damit die übermäßige Oxidation von Lipiden und Proteinen verhindern²⁰⁴. Hull et al. (2016) konnte anhand einer durch das Anthrazyklin Doxorubicin induzierten, mitochondrialen Schädigung in Mäusen die kardioprotektive Wirkung von *HO-1* verdeutlichen. Dabei verhinderte die Überexpression von *HO-1* unter anderem eine Fragmentierung der

Mitochondrien und ist mit einer vermehrten mitochondrialen Biogenese verbunden. Eine bei Wildtyp-Mäusen auftretende, dilatative Kardiomyopathie und eingeschränkte linksventrikuläre Auswurfleistung nach Doxorubicin konnte dadurch verhindert werden. Dies verdeutlicht die protektive Wirkung von HO-1 auf die mitochondriale Qualitätskontrolle des Herzens ²⁰⁵. Auch bei dem in vorherigen Abschnitten mehrfach erwähnten Ischämie-Reperfusionsschaden konnte in Versuchen von Yet et al. (2001) die kardioprotektive Rolle einer genetisch herbeigeführte Überexpression von HO-1 durch eine Reduktion der Infarktgröße in Mäusen gezeigt werden ²⁰⁶. Grün et al. (2022) zeigten außerdem, dass lediglich ein Knockdown von Nrf2, nicht jedoch von Nrf1 das Überleben der H9c2-Zellen unter Komplex-III-Inhibierung beeinträchtigte ¹⁰². Auch wenn beide Transkriptionsfaktoren zwar ähnliche Zielgene haben, kommt es jedoch nur bei einem Nrf2-Knockdown zu einer Reduktion von HO-1. Neben Nrf2 ist auch ATF4 an der transkriptionellen Regulation von HO-1 beteiligt. Dey et al. (2015) konnten nachweisen, dass die gleichzeitige Aktivierung von ATF4 und Nrf2 zu einer Hochregulation von HO-1 in der menschlichen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 führte ²⁰⁷. So interagierten die beiden Transkriptionsfaktoren ATF4 und Nrf2 und banden an den HO-1-Promoter, um seine Expression zu verstärken. Yuan et al. (2021) zeigte, dass ein Knockdown von ATF4 zu einer signifikanten Reduktion der HO-1-Expression in Podozyten führte ²⁰⁸. Der Knockdown von ATF4 führte dabei zu einer gesteigerten Apoptose und einer verminderten, zytoprotektiven Autophagie bei Diabetischer Nephropathie. Genau gegenteilige Effekte hat eine Überexpression von HO-1. Somit könnte auch das in embryonalen Kardiomyozyten signifikant induzierte ATF4 (Abbildung 17) als Interaktionspartner von Nrf2 oder als Kompensation einer fehlenden Induktion von Nrf2 die transkriptionelle Regulation von HO-1 in embryonalen Kardiomyozyten beeinflussen.

In H9c2-Zellen ging ein Knockdown von Nrf2 mit einem schlechteren Überleben von H9c2-Zellen unter Antimycin A einher ¹⁰². Die signifikante Induktion verschiedener antioxidativer Schutzmechanismen bei nachweislich vermehrtem oxidativem Stress in embryonalen Kardiomyozyten unter AMA deutet ebenfalls auf deren Relevanz in Bezug auf ihre hohe Toleranz hin. Zur genaueren Identifizierung der Relevanz von HO-1 und Nrf2 in embryonalen Kardiomyozyten wären weitere Untersuchungen wie ein entsprechender Knockdown in embryonalen Kardiomyozyten mit anschließender Untersuchung einer Antimycin-A-Behandlung oder auch die Isolation embryonaler Kardiomyozyten aus NRF- oder HO-1-Knockout-Mäusen denkbar.

Vergleicht man die Aktivierung verschiedener Komponenten der ISR, so konnte sowohl in H9c2-Zellen ¹⁰², als auch in embryonalen Kardiomyozyten eine Induktion von ATF4 und CHOP unter AMA-Behandlung nachgewiesen werden. Eine vermehrte Expression von CHOP ließ sich auch in vivo in Hccs-defizienten Kardiomyozyten des embryonalen Hccs-Knockout-Herzens nachweisen ¹⁰¹. Unterschiede zwischen den Zelllinien und embryonalen

Kardiomyozyten zeigten sich in Hinblick auf eine Phosphorylierung von eIF2 α als initialer Schritt der ISR. Anders als embryonale Kardiomyozyten (Abbildung 17) zeigten H9c2-Zellen keine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α unter AMA¹⁰². Dies könnte durch die in H9c2-Zellen im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten nachgewiesene Induktion der Phosphatase GADD34 bedingt sein, welche als negativer Feedback-Loop eine effiziente Dephosphorylierung von eIF2 α in H9c2-Zellen bewirken könnte (siehe Abschnitt 1.3.3). Eine Studie von Novoa et al. (2003) zeigten in embryonalen Fibroblasten der Maus, dass der durch GADD34 gebildete Feedback-Loop für die Expression nachfolgender, stressinduzierter Proteine im Rahmen der UPR^{er} wichtig ist²⁰⁹. In Zellen, die durch eine induzierte Mutation kein GADD34 bildeten, kam es durch eine anhaltende Unterdrückung der Proteinsynthese bei Stressinduktion mithilfe von Thapsigargin oder Arsenit durch die fehlende Dephosphorylierung von eIF2 α zum einen zu einer Beeinträchtigung der Translation nachgeschalteter Ziele der Stressreaktion wie bspw. ER-Chaperonen, aber auch zu der Aktivierung stressinduzierter Genexpression wie beispielsweise von ATF4 und CHOP selbst. Dies beeinträchtigte auch das Überleben der Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Somit schützt eine Dephosphorylierung von eIF2 α durch GADD34 die gestressten Zellen durch regelrechte Induktion der stressinduzierten Genexpression vor einem Zelltod²⁰⁹. Die Ergebnisse werfen die Frage nach der zeitlichen Dynamik der Dephosphorylierung von eIF2 α bei mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten auf. Im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten war es bei H9c2-Zellen zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden bereits zu einer signifikanten Induktion von GADD34 gekommen. Möglicherweise besteht also eine andere zeitliche Dynamik der Stressreaktion zwischen Zelllinie und embryonalen Kardiomyozyten. Weitere Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten könnten Aufschluss über die genaue zeitliche Dynamik der Aufhebung der Translationsinhibition durch p-eIF2 α in embryonalen Kardiomyozyten geben. Offen bleibt die Frage nach dem zeitabhängigen Effekt, den eine frühe oder späte Dephosphorylierung auf die Zellen haben könnte. So könnte eine frühere Dephosphorylierung gegebenenfalls durch eine bessere Aktivierung stressinduzierter Genexpression positive Effekte auf die Zellen haben. Gleichzeitig besteht durch fehlende Inhibition der globalen Proteintranslation die Gefahr einer weiteren Akkumulation fehlgefalteter Proteine innerhalb der Mitochondrien oder anderer Zellorganellen (durch fehlende Entlastung der Faltungsmaschinerie innerhalb der Zellorganellen).

Ebenfalls im Rahmen der UPR^{mt} werden verschiedene Chaperone wie unter anderem HSP60 aktiviert, die außerdem die Hauptakteure der *Heat-Shock-Response* (siehe Abschnitt 1.3.2) bilden⁷⁵. Eine Induktion auf Proteinebene durch eine Behandlung mit Antimycin A behandelten, embryonalen und adulten Kardiomyozyten (Abbildung 37) konnte nicht nachgewiesen werden. In vivo zeigten embryonale Kardiomyozyten des *Hccs*-Knockout-Models eine deutliche Induktion von HSP60¹⁰¹. Dies unterschied sich von den H9c2-Zellen, in

denen HSP60 nach AMA-Behandlung nicht vermehrt nachgewiesen werden konnte. Trotzdem führte die Stummschaltung von HSP60 in mit AMA behandelten H9c2-Zellen zu einer moderaten, aber signifikanten Reduktion des Wachstums¹⁰². Fan et al. (2020) verdeutlichten die protektive Rolle von HSP60 im Herzen, in dem HSP60 für eine korrekte Faltung und damit für die Funktion vieler mitochondrialer Proteine verantwortlich war²¹⁰. Ein Verlust von HSP60 in adulten Kardiomyozyten hatte demnach massive Auswirkungen auf die mitochondriale Atmungskette. So kam es durch den Verlust von HSP60 zu Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials und einer Überproduktion von ROS. Resultat war Herzversagen und der Tod der HSP60-Knockout-Mäuse innerhalb von 14 Wochen unter Basal-Bedingungen.

Grün et al. (2022) zeigten in den differenzierten HL-1 Zellen bei mitochondrialer Dysfunktion auf molekularer Ebene ähnliche Ergebnisse wie in H9c2-Zellen¹⁰². ATF4, CHOP und p-eIF2 α zeigten sich in HL-1 Zellen signifikant induziert unter einer Behandlung mit 50 μ M Antimycin A und ähnelten damit in vielen Teilen den weniger differenzierten H9c2-Zellen. In den adulten Kardiomyozyten hingegen zeigte sich zwar eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α , aber auch eine signifikante Reduktion von CHOP bei einer Behandlung mit 1 μ M Antimycin A über 2 Stunden (Abbildung 34). Gemeinsam hatten die Zelllinie und die adulten Kardiomyozyten die signifikante Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38-MAP-Kinase unter AMA. Während Kuznetsov et al. (2015) eine erhöhte Toleranz von HL-1 Zellen gegenüber einer Hypoxie/Reoxygenierung im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens im Vergleich zu H9c2 Zellen nachwies¹¹⁴, zeigten HL-1 Zellen gegenüber einer Komplex-III-Inhibition eine deutlich geringere Toleranz¹⁰². Dies bedeutete keine grundsätzlich erhöhte Toleranz der undifferenzierten H9c2-Zellen gegenüber HL-1 Zellen, sondern zeigte eine Abhängigkeit gegenüber der Art des zellulären Stresses. Grün et al. (2022) konnte HL-1 Zellen durch eine medikamentöse Aktivierung der embryonalen Signalwege wie der ISR oder der *Heat-Shock-Response* nicht retten¹⁰². Aufgrund der in Abschnitt 2 näher beschriebenen, deutlichen Unterschiede zu Primärzellen lässt dies jedoch keine direkten Rückschlüsse auf mögliche positive Effekte auf das Überleben adulter Kardiomyozyten zu und müsste durch weitere Versuche geklärt werden.

Während H9c2-Zellen und embryonale Kardiomyozyten in der Aktivierung verschiedener stressreaktiver Signalwege bei mitochondrialer Komplex-III-Inhibition viele Gemeinsamkeiten aufwiesen, so zeigten die ebenfalls vorhandenen Unterschiede noch einmal, dass die Ergebnisse der Zelllinien nicht in ihrer Gänze auf Primärzellen übertragbar sind^{103,104,134,211}. Analysen des Transkriptoms zeigten, dass die immortalisierten Zelllinien grundlegenden Unterschiede in Bezug auf ihre kardialen und metabolischen Eigenschaften im Vergleich zu primären Zellkulturen aufweisen¹³⁴. So unterscheiden sie sich in

Genexpressionsmustern, ihrer mitochondrialen Aktivität und ihrem Metabolismus von Primärzellen, was sich auf die Ergebnisse der in-vitro-Studien auswirken kann ¹³⁴.

Die fehlende Kontraktion und der damit veränderte Metabolismus, die Unterschiede in der Sarkomerstruktur, dem Calcium-Handling, der Membranpotentiale und die potentielle Differenzierung von H9c2-Zellen hin zu Skelett-Myoblasten, sind mögliche Gründe für ein abweichendes Verhalten und Reaktion auf Stimuli wie einer mitochondrialen Dysfunktion der Zelllinien (siehe Abschnitt 2). Die H9c2-Zelllinien, das *Hccs*-Knockout-Modell und auch die primären embryonalen Kardiomyozyten bestätigten jedoch alle die hohe Toleranz der embryonalen Kardiomyozyten gegenüber einer Komplex-III-Inhibition.

5.5 Intrazelluläre Umverteilung von HSP60 und SOD2 in embryonalen Kardiomyozyten nach AMA-Behandlung

Die Komplex-III-Inhibition in embryonalen Kardiomyozyten zeigte neben der Induktion verschiedener Enzyme und Proteine zur Aufrechterhaltung der PQC und Redox-Homöostase auch eine veränderte intrazelluläre Verteilung mitochondrial lokalisierter Proteine. Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, die jederzeit fusionieren und sich wieder trennen können (Fission) und dadurch Größe, Anzahl und Vernetzung kontrollieren. Auch die Prozesse der Mitophagie, also der Entfernung geschädigter Mitochondrien und der mitochondrialen Biogenese, der Neubildung von Mitochondrien, sind Teil der mitochondrialen Dynamik ²¹². So variieren die Länge, Form, Größe und Anzahl der Mitochondrien innerhalb der Zellen ^{213,214}. Wie bereits erwähnt, durchlaufen auch Mitochondrien postnatale Veränderungen (siehe Abschnitt 5.1). Unmittelbar nach der Geburt kommt es zu einer vermehrten mitochondrialen Fusion und einer Biogenese innerhalb der Kardiomyozyten ²¹⁵. Ein vermindertes HIF-Signaling postnatal wirkt dabei als Auslöser für die mitochondrialen Reifungsprozesse des Herzens. Dieser führt zu morphologischen Veränderungen der eher fragmentierten pränatalen Mitochondrien hin zu in Länge und Breite vergrößerten Mitochondrien postnatal, die einen deutlich größeren prozentualen Anteil der Kardiomyozyten einnehmen. Des Weiteren führt der Abfall von HIF zu einer vermehrten oxidativen Phosphorylierung der postnatalen Kardiomyozyten ²¹⁵.

Gleichzeitig dient die mitochondriale Dynamik der Qualitätskontrolle der Zellorganellen ⁸. Die mitochondriale Dynamik ist dabei unter anderem abhängig vom zellulären Metabolismus, um so auf Nährstoffangebot und Energiebedarf der Zellen zu reagieren ²¹⁶. So zeigten Rambold et al. (2011) eine Fusion nach Nährstoffmangel in embryonalen Fibroblasten der Maus ²¹⁷. Kim et al. (2011) beschrieben die Fission beziehungsweise Fragmentierung von Mitochondrien in HL-1 Zellen als Reaktion auf Hypoxie, um dadurch eine Anpassung der Zellen an einen niedrigen Sauerstoffgehalt zu ermöglichen ²¹⁸. Auch in-vivo-Versuche in der Maus haben gezeigt, dass die adulte myokardiale Funktion von der Regulation von Fusion und Fission

abhängig ist und in Zusammenhang mit dem kardialen Stoffwechsel stehen ²¹⁹. Wai et al. (2015) zeigten, dass durch Vermeidung einer mitochondrialen Fragmentierung das Herz vor Zelltod und Herzversagen geschützt wird. Die mitochondriale Fragmentierung führte dabei zu einer Umstellung des Stoffwechsels im Herzen, von der Fettsäure- auf eine Glukoseverwertung ²¹⁹. Die mitochondriale Dynamik bildet damit einen wichtigen Mechanismus der mitochondrialen Qualitätskontrolle ²²⁰.

Unter physiologischen Bedingungen zeigten sich Mitochondrien in kultivierten, embryonalen Kardiomyozyten insbesondere perinukleär und wiesen nur ein gering ausgeprägtes Netzwerk in der Peripherie auf. HSP60 (Abbildung 29) und SOD2 (Abbildung 27), zwei primär mitochondrial lokalisierte Proteine zeigten in mit Antimycin A behandelten Zellen eine bis in die Peripherie reichende, diffuse Anfärbung in der Immunfluoreszenzanalyse, mit scheinbarem Verlust eines organisierten Netzwerkes. Wie in Abschnitt 4.2.4 erläutert, blieb die Induktion verschiedener Komponenten der UPR^{mt} auf Proteinebene, darunter YME1L1, PMPCB, ClpP und auch HSP60, aus (Abbildung 37). Dies lässt vermuten, dass die hier beschriebenen Veränderungen der HSP60-Immunfluoreszenzfärbung in AMA-behandelten, embryonalen Kardiomyozyten eher auf Veränderungen im intrazellulären mitochondrialen Netzwerk als auf Veränderungen der HSP60-Proteinexpression zurückzuführen waren.

Die nach Komplex-III-Inhibition sichtbare, periphere Anordnung kann auf eine Fragmentierung der Mitochondrien im Sinne einer Fission hindeuten. Die mitochondriale Fission ist für die Reparatur und Erhaltung der Zellorganellen von Bedeutung. Durch die Spaltung wird die Beseitigung von geschädigten, mitochondrialen Anteilen erleichtert, die im Anschluss durch Mitophagie abgebaut werden können ^{8,220}. Ashrafian et al. (2010) zeigten, dass eine Mutation des Gens *Dnm1l* (*Dynamamin-1-like*), das für die mitochondriale Fission essentiell ist, in einer autosomal dominant vererbten, dilatativen Kardiomyopathie in Mäusen resultierte ²²¹. Die betroffenen Kardiomyozyten zeigten reduzierte mitochondriale Enzymkomplexe und einen ATP-Mangel. Grund dafür könnte eine fehlende Qualitätskontrolle durch den Abbau defekter mitochondrialer Bestandteile sein. Um die Zellorganelle und ihre Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten, ist dabei immer ein Gleichgewicht aus Fission und Fusion erforderlich. Die Fusion ermöglicht den Austausch von verschiedenen Bestandteilen der Mitochondrien und ist für die bioenergetischen Eigenschaften wie dem mitochondrialen Membranpotential der Zellorganelle relevant ⁸. Weitere, mündlich vermittelte Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigten eine Fragmentierung der Mitochondrien auch in mit Rotenon und mit Antimycin A behandelten, neonatalen Kardiomyozyten. Mit Oligomycin behandelte Zellen hingegen zeigten eine Veränderung des mitochondrialen Netzwerkes im Sinne einer perinukleären Akkumulation in Clustern. Die Ergebnisse zeigten also eine Abhängigkeit der mitochondrialen Dynamik von der Art der mitochondrialen Dysfunktion beziehungsweise des jeweils beeinträchtigten Komplexes. Leonard et al. (2015) untersuchten die mitochondriale Dynamik

anhand einer Photorezeptor-Zelllinie eines retinalen Tumors der Maus, behandelt mit verschiedenen Inhibitoren der Atmungskette wie beispielsweise Antimycin A ²²². Bereits ab einer Konzentration von 1 nM führte Antimycin A zu einer Reduktion des mitochondrialen Netzwerkes und bei höheren Konzentrationen auch insgesamt zu einer Abnahme der gemessenen Mitochondrienfläche ²²². Man könnte also davon ausgehen, dass embryonale Kardiomyozyten eine Behandlung mit Antimycin A unter anderem deshalb tolerieren, weil sie eine hohe Plastizität der mitochondrialen Dynamik aufweisen und schnell zwischen Fusion und Fission wechseln können. Adulte Kardiomyozyten hingegen könnten durch eine Reduktion ihrer mitochondrialen Dynamik und einer ‚starrten‘ Mitochondrienmorphologie eine Behandlung mit Antimycin A weniger gut tolerieren.

Ebenfalls signifikant erhöht in embryonalen Kardiomyozyten war COXIV bei Behandlung mit Antimycin A (Abbildung 17). COXIV ist eine nukleär codierte Untereinheit der Cytochrom C Oxidase und durch die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt. Als Protein spezifisch für die mitochondriale Atmungskette, kann es als Hinweis für eine Neubildung von Mitochondrien im Sinne einer mitochondrialen Biogenese herangezogen werden ²²³. Yin et al. (2008) zeigten, dass es bei einer Hypoxie des neonatalen Gehirns in der Ratte bereits in einem Zeitraum von 6 Stunden durch mitochondriale Biogenese zu einer Zunahme der Mitochondrien mit gleichzeitigem Anstieg von HSP60 und COXIV kam ²²³. Als Bestandteil der mitochondrialen Dynamik kann durch gesteigerte mitochondriale Biogenese auf einen erhöhten Energiebedarf der Zelle reagiert werden. Dabei kommt es zu einer Neubildung der Zellorganellen aus bereits bestehenden Mitochondrien ²¹². Im Falle der embryonalen Kardiomyozyten könnte es also durch die mitochondriale Dysfunktion und einen resultierenden Energiemangel zu einer mitochondrialen Biogenese mit diffuser Verteilung in der Zelle gekommen sein.

Aktuell durchgeführte Analysen mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie von mit AMA behandelten, neonatalen Kardiomyozyten sollen erste Einblicke in die mitochondriale Dynamik bei Inhibition verschiedener Komplexe der Atmungskette bieten. Dabei können die Frage nach Fusion und Fission unter anderem in Abhängigkeit vom jeweils inhibierten Komplex beantwortet werden.

5.6 Die unterschiedlichen Effekte einer Komplex-I-, -III- und -V-Inhibition der mitochondrialen Atmungskette auf embryonale Kardiomyozyten

Die Effekte verschiedener Inhibitoren der Atmungskette unterscheiden sich bei Behandlung embryonaler Kardiomyozyten teilweise drastisch. Embryonale Kardiomyozyten hatten eine hohe Toleranz gegenüber einer Komplex-III-Inhibition mit 50 µM Antimycin A über 24 Stunden. Sie zeigten keine signifikante Reduktion ihrer Zellzahl, erhielten ihre Morphologie und Kontraktibilität und wiesen keine Veränderungen ihrer Zellzyklusaktivität auf. Anders verhielt es

sich mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon in einer Konzentration von 10 μM über 24 Stunden. Bei der Behandlung kam es bereits in der Analyse mittels Phasenkontrastmikroskopie (Abbildung 41) schnell zu sichtbaren morphologischen Veränderungen der embryonalen Kardiomyozyten, die auf einen massiven Zelluntergang hindeuteten. Die Zellen rundeten sich ab und verloren ihre Adhärenz, so dass die Zelldichte deutlich abnahm. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von Rotenon und Antimycin A bietet die bei Hemmung der Atmungskette entstehenden ROS. Bei mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten konnten wir durch den MitoSOX-Assay eine gesteigerte Produktion von mitochondrialen Hydroperoxydationen nachweisen (Abbildung 22), sowie eine Hydroperoxydation von PRDX im Western Blot (Abbildung 23). Die Frage nach einer gesteigerten Produktion von ROS in mit Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten wurde im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht. In H9c2-Zellen konnte jedoch eine vergleichbare Induktion von ROS zwischen mit Rotenon und mit Antimycin A behandelten Zellen festgestellt werden. Rotenon induzierte in H9c2-Zellen dabei einen Zellzyklusarrest und Apoptose¹⁰². Eine mögliche Begründung wäre die unterschiedliche Lokalisation der gebildeten ROS innerhalb der Mitochondrien²²⁴. An Komplex I, inhibiert durch Rotenon, kommt es zu einer Freisetzung von ROS in die mitochondriale Matrix²²⁵. Komplex III, inhibiert durch Antimycin A, setzt ROS sowohl in die Matrix als auch in den Intermembranraum in etwa gleichen Mengen frei²²⁵. Bei gleichen Mengen an ROS in mit Antimycin A und Rotenon behandelten H9c2-Zellen könnte auch in embryonalen Kardiomyozyten bei einer Komplex-III-Inhibition durch die unterschiedliche Verteilung eine mehrere Kompartimente übergreifende Entgiftung mit Nutzung paralleler antioxidativer Pfade der verschiedenen Kompartimente erreicht werden²²⁶. Die unterschiedliche Lokalisation und damit Beanspruchung verschiedener Zellkompartimente bzw. der jeweiligen antioxidativen Mechanismen könnte möglicherweise Einfluss auf das Überleben der Zellen haben²²⁶. Die in der mitochondrialen Matrix befindliche mitochondriale DNA ist dabei unter anderem aufgrund eines weniger gut entwickelten Reparatursystems besonders empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen (siehe auch Abschnitt 1.1)⁹, weshalb auch hier die Verteilung von ROS von Bedeutung für das Überleben der Zellen sein könnte. Wie in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, haben ROS jedoch nicht nur schädigende Wirkungen, sondern dienen außerdem als Signalmoleküle²²⁷. Madungwe et al. (2016) zeigten die schädigende Wirkung von entstandenen ROS bei Komplex-I-Inhibition, während pathologische Bedingungen, die zu einer Produktion von ROS an Komplex III führten, sogar einen kardioprotektiven Effekt hatten²²⁸. Letzteres könnte nach Ischämie-Reperfusion des Herzens durch eine Inhibition der Calcium-abhängigen Öffnung sogenannter *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) bedingt sein²²⁸. Untersucht wurden dazu isolierte Mitochondrien, gewonnen aus adulten Mausherzen. Durch Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität bei Öffnung der mPTP kam es zu einer Störung der

oxidativen Phosphorylierung und damit der ATP-Synthese, resultierend im Zelltod ²²⁸. ROS, gebildet durch Komplex III, konnten durch eine verbesserte mitochondriale Speicherfähigkeit von Calcium zu einer verbesserten funktionellen Erholung und einer reduzierten Infarktgröße Langendorff-perfundierter Maus-Herzen führen. Eine Inhibition von Komplex I hingegen führte zu einer reduzierten Speicherfähigkeit von Calcium, einhergehend mit einer schnelleren Öffnung der mPTP, resultierend in einer ausgedehnteren Infarktgröße und einer verminderten funktionellen Erholung ²²⁸.

Li et al. (2003) zeigten, dass Antioxidantien wie Glutathion, N-Acetylcystein und Vitamin C eine Rotenon-induzierte Apoptose in der Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 reduzieren konnten ²²⁹. Die Frage, ob der Einsatz solcher Antioxidantien auch im Falle der embryonalen Kardiomyozyten das Überleben unter Rotenon oder auch von adulten Kardiomyozyten unter AMA verbessern könnte, wäre durch weitere Versuche zu klären.

Wie in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, bezeichnen ROS eine Gruppe verschiedener hochreaktiver Oxidantien, darunter Sauerstoffradikale wie O_2^- (Hyperoxidanionen) oder $^{\circ}OH$ (Hydroxyl-Radikale) und zum anderen nichtradikalische Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ⁴⁸. Auch von Interesse für die Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber Inhibitoren der Atmungskette könnte daher die Art der ROS sein, die bei einer mitochondrialen Dysfunktion in Abhängigkeit von dem jeweiligen Komplex entstehen. Weitere Aspekte, die einen Einfluss auf das Überleben und Wachstum der Zellen unter den verschiedenen Inhibitoren haben könnte, wäre unter anderem der Schweregrad des ATP-Mangels, eine Induktion von Apoptose und Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials. Während Rotenon in H9c2-Zellen eine Apoptose induzierte, konnte gleiches für eine Behandlung mit Antimycin A nicht nachgewiesen werden ¹⁰². TMRM-Assays in embryonalen Kardiomyozyten (Abbildung 22) konnten keine eindeutigen Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials von mit Antimycin A behandelten Zellen zeigen. In H9c2-Zellen reduzierten sowohl AMA als auch Rotenon die TMRM-Intensität in der Akutphase von einer Stunde nach Behandlung, nicht jedoch nach 24 Stunden ¹⁰². Tada-Oikawa et al. (2023) zeigten, dass Rotenon durch Bildung von H_2O_2 signifikante Veränderungen des Membranpotentials hervorrufen kann, einhergehend mit einem apoptotischem Zelluntergang in HL-60 Zellen, also menschlichen promyelozytären Leukämiezellen ²³⁰.

Eine Komplex-V-Inhibition mit 5 μM Oligomycin zeigte einen leichten Effekt auf die embryonalen Kardiomyozyten, der phasenkontrastmikroskopisch zwischen Antimycin A und Rotenon einzuordnen ist. Oligomycin wies sichtbare Veränderungen in der Phasenkontrastmikroskopie embryonaler Kardiomyozyten auf und zeigte ein signifikant geringeres Wachstum im MTT-Assay behandelter H9c2-Zellen (Abbildung 40). Eine verminderte Zellzahl der embryonalen Kardiomyozyten zeigte sich bereits durch eine Abnahme der Konfluenz in der Phasenkontrastmikroskopie und bestätigte sich durch die

Quantifizierung der Kardiomyozytendichte in der Immunfluoreszenz (Abbildung 43). Die verminderte Zellzahl embryonaler Kardiomyozyten bei einer Komplex-V-Inhibition konnte sich dabei zunächst durch einen Zellzyklusarrest erklären lassen, der durch Ki67-Quantifizierung der mit Oligomycin behandelten Zellen deutlich wurde (Abbildung 44). Die verminderte Anzahl Ki67-positiver Zellkerne in mit Oligomycin behandelten embryonalen Kardiomyozyten könnte für einen Austritt aus dem Zellzyklus sprechen. Damit zeigten sich bei den embryonalen Kardiomyozyten ähnliche Effekte wie in H9c2-Zellen, die in Reaktion auf Oligomycin und Rotenon ebenfalls ein signifikant vermindertes Wachstum und einen Zellverlust zeigten¹⁰². Auch in mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten besteht die Frage nach vermehrtem oxidativem Stress und dem Einfluss auf die embryonalen Kardiomyozyten, die in weiteren Versuchen geklärt werden müssten. Oligomycin beeinflusst außerdem die Na⁺/K⁺-ATPase (NKA). Bei der Na⁺/K⁺-ATPase handelt es sich um ein Membranprotein, welches mithilfe von ATP einen aktiven Transport von Na⁺ und K⁺ über die Zellmembran bewirkt. Die NKA bewegt dabei Na⁺-Ionen aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum und K⁺ in die entgegengesetzte Richtung²³¹. Oligomycin interagiert mit der Na⁺/K⁺-ATPase und bewirkt dadurch eine verzögerte Freisetzung von Natrium auf der extrazellulären Seite, während die Bindung oder der Transport von Kalium nicht beeinflusst zu sein scheint²³². Durch seine Rolle bei der Regulation des intrazellulären Natrium-Haushaltes, ist die NKA eng mit der kardialen Funktion verknüpft. Verändert sich die intrazelluläre Konzentration des Natriums, kann es unter anderem zu Veränderungen des Calcium-Haushaltes kommen, was wiederum die Kontraktilität des Herzens beeinflusst und zu Herzrhythmusstörungen und Zelltod führen kann²³¹. Die Inhibition der ATPase legt auch bei Oligomycin einen ATP-Mangel als Ursache für den Zellverlust nahe. Pinson et al. (1994) zeigten in kultivierten, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte eine deutliche Depletion des zellulären ATP unter einer Behandlung mit Oligomycin²³³. Die embryonalen Kardiomyozyten zeigten bei Behandlung mit Oligomycin eine deutliche Aktivierung von CHOP und ATF4 in der Immunfluoreszenz (Abbildung 45). Soweit aufgrund des massiven Zellverlustes beurteilbar, zeigten ATF4 und CHOP keine vermehrte Signalintensität in mit Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten in der Immunfluoreszenzanalyse (Abbildung 45). In H9c2-Zellen konnte bei Behandlung mit Oligomycin und auch Rotenon eine Induktion von CHOP und ATF4 in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden¹⁰². Dabei kann es durchaus sein, dass CHOP je nach Inhibitor eine unterschiedliche Funktion auf das Zellüberleben hat. Denn wie in Abschnitt 5.1 näher beschrieben, kann CHOP sowohl das Überleben der Zellen fördern, als auch bei anhaltendem Stress zu einem Zelluntergang führen.

5.7 LDH-Freisetzung bei Inhibition von Komplex I, III, und V in embryonalen Kardiomyozyten

Während Antimycin A in der Phasenkontrastmikroskopie keine morphologischen Unterschiede der embryonalen Kardiomyozyten hervorrief, ließen sich bei Oligomycin insbesondere in der Immunfluoreszenzmikroskopie strukturelle Veränderungen im Sinne eines Verlustes der Sarkomer-Organisation darstellen (Abbildung 42). Dabei handelte es sich um keine einheitliche morphologische Veränderung, sondern betraf nur einen Teil der behandelten Kardiomyozyten innerhalb eines Wells. Der Effekt von Oligomycin auf die embryonalen Kardiomyozyten wurde auch noch einmal durch die Zelldichte verdeutlicht, in der sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl pro Fläche der Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten und auch der Zellzyklusaktivität zeigte. Mit 50 μM Antimycin behandelte Zellen zeigten hingegen weder eine signifikante Reduktion der Zellzahl noch eine Abnahme ihrer Zellzyklusaktivität. Trotz der scheinbar höheren Toleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber einer Antimycin A Behandlung, zeigte der LDH-Assay eine signifikant höhere Freisetzung ins Kulturmedium bei Behandlung mit Antimycin A im Vergleich zu DMSO, während mit Oligomycin behandelte Zellen keine LDH-Freisetzung zeigten (Abbildung 46). Eine Erklärung für die erhöhten LDH-Werte bei Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A könnte ein Untergang von Nicht-Kardiomyozyten sein, die einen Anteil von rund 20–30 % im Zellverbund ausmachten (Abbildung 14). Die Zellzählung embryonaler Kardiomyozyten (Abbildung 14) zeigte eine leichte Reduktion der Gesamtzellzahl und Nicht-Kardiomyozyten, bei unveränderten Werten der Kardiomyozyten. Dies kann bedeuten, dass Antimycin A einen nicht signifikanten aber doch milden Effekt auf die Nicht-Kardiomyozyten hatte und in diesen einen Zelltod auslöste. Dadurch könnte es bei entsprechender Sensitivität des LDH-Assays zu erhöhten LDH-Werten im Kulturmedium kommen. Eine weitere mögliche Erklärung für einen Anstieg von LDH-Aktivität in Zellen mit einer mitochondrialen Dysfunktion ist der veränderte zelluläre Metabolismus. Zur Aufrechterhaltung der Energieversorgung der Zellen können andere Stoffwechselprozesse zur Produktion von ATP wie die Glykolyse aktiviert werden ²³⁴. Fibroblasten der Haut von Patienten mit MERRF, einer Mitochondriopathie, die mit einer Fehlfunktion der Komplexe der Atmungskette einhergeht, zeigten vermehrten oxidativen Stress im Vergleich zu gesunden Probanden ²³⁴. Dabei zeigte sich eine erhöhte Laktatproduktion und eine signifikante Induktion der Lactatdehydrogenase (LDH), die Laktat zu Pyruvat umwandelt ²³⁴. Wie bereits in Abschnitt 5.1 erläutert, besitzen fetale Kardiomyozyten eine hohe Proliferationskapazität, die postnatal schnell verloren geht. Als ein Grund hierfür wird unter anderem die postnatale Umstellung des zellulären Metabolismus von Glykolyse auf oxidative Phosphorylierung angesehen. Das Enzym Lactatdehydrogenase A (LDHA) soll unter anderem durch posttranslationale Modifikation von Proteinen an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sein und damit eine Möglichkeit bieten, die

Regenerationsfähigkeit des Herzens nach der Geburt zu fördern²³⁵. Chen et al. (2022) haben gezeigt, dass eine Überexpression der LDHA zu der Induktion verschiedener glykolytischer Metabolite und Gene führte, oxidativen Stress verminderte und die Proliferation von Kardiomyozyten der Maus förderte. Ein Kardiomyozyten-spezifischer Knockout im neonatalen Maus-Herzen führte zu einer vermehrten Fibrose und schlechteren Überlebensrate nach apikaler Resektion²³⁵. Zum einen könnte eine erhöhte LDH-Aktivität also im Rahmen des veränderten Metabolismus bei mitochondrialer Dysfunktion bedingt sein, zum anderen bietet sie sogar eine mögliche Strategie zum Schutz und zur Verbesserung der Proliferationskapazität der Kardiomyozyten.

Eine fehlende LDH-Erhöhung in mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten, trotz signifikant reduzierter Zelldichte und sichtbaren morphologischen Effekten, könnte unter anderem durch einen Proliferationsstopp begründet sein. Eine verminderte Zellzahl aufgrund eines Proliferationsstopps würde sich auch mit den Ergebnissen der Messung der Zellzyklusaktivität decken (siehe Abbildung 39). Des Weiteren besteht die Frage nach der Art eines möglichen Zelluntergangs. Bei einem kontrollierten, apoptotischen Zellverlust bleibt die Plasmamembran, anders als bei einem nekrotischen Zelltod, intakt¹⁷⁹, sodass es nicht zwangsläufig zu einer Freisetzung des intrazellulären LDH ins Medium kommt. Mit Oligomycin behandelte Zellen könnten also durchaus einen apoptotischen Zellverlust zeigen, ohne dass sich dieser mit einer massiven Erhöhung von LDH äußern müsste. Eine genauere Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen durch Apoptose-Assays wäre in weiterführenden Untersuchungen denkbar. Eine deutliche Erhöhung der LDH-Freisetzung zeigte sich bei einer Komplex-I-Inhibition in embryonalen Kardiomyozyten durch Rotenon. Hier deckten sich die Ergebnisse mit dem bereits in der Phasenkontrastmikroskopie deutlich sichtbarem Zelluntergang (Abbildung 46). Unter Rotenon schien es in embryonalen Kardiomyozyten zu einem Zelluntergang mit Verlust der Membranintegrität zu kommen, was zumindest in einem Teil der Zellen für eine Nekrose oder Nekroptose spräche.

5.8 Weitere Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beruht auf Vorarbeiten anhand der H9c2- und HL-1-Zelllinien, sowie dem herzspezifischen *Hccs*-Knockout-Modell der Maus. Durch die Vorarbeiten konzentrierte die Studie sich bei der Charakterisierung der molekularen Mechanismen in embryonalen und adulten Kardiomyozyten bei mitochondrialer Dysfunktion auf Signalwege, die bereits in den vorherigen Studien identifiziert werden konnten. Untersuchungen wie die ‚omics‘-Technologien könnten weitere Signalwege aufdecken, die unvoreingenommen aufzeigen, welche molekularen Mechanismen für die Stressresistenz bzw. -Anfälligkeit von Kardiomyozyten von Relevanz sein könnten und bisher nicht beachtet wurden. Der Begriff ‚omics‘ bezeichnet einen umfassenderen und genomweiten Blick auf verschiedene Moleküle.

Während bei der Genetik beispielsweise einzelne Gene untersucht werden, können durch die Genomik ganze Genome betrachtet werden. Weitere Ansätze sind beispielsweise Proteomics, Metabolomics oder Transcriptomics. Eine weitere Möglichkeit sind sogenannte *Single-Cell*-Analysen, die weiterführend noch einmal eine genauere Analyse von Kardiomyozyten, getrennt von Nicht-Kardiomyozyten, ermöglichen würde. Komplexere zelluläre Vorgänge und molekulare Zusammenhänge in Kardiomyozyten als Reaktion auf mitochondriale Funktionsstörungen, oxidativen Stress und Energie-Mangel könnten damit womöglich aufgedeckt und besser verstanden werden.

Ein wichtiger Aspekt sind bei der in-vitro-Untersuchung isolierter und kultivierter Kardiomyozyten mögliche Unterschiede zu Bedingungen in vivo, die Einfluss auf die Reaktion der Zellen unter Stress haben können. Ein Aspekt ist dabei der Verlust der natürlichen Umgebung der Kardiomyozyten innerhalb des Myokardgewebes, der zwar häufig eine genauere Analyse und kontrollierte Bedingungen der Zellen in vitro ermöglicht, aber auch Einfluss auf die Ergebnisse nehmen kann. So besteht die kardiale Funktion in vivo aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen des Herzgewebes wie beispielsweise Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen oder Neuronen, die verschiedene zelluläre, molekulare und regulatorische Funktionen besitzen^{236,237}. Die Umgebung der Kardiomyozyten und die Kommunikation mit anderen Zellen spielt eine entscheidende Rolle bei der kardialen Entwicklung und der postnatalen Funktion und könnte so auch Einfluss auf das Verhalten der Zellen gegenüber Stress und pathologischen Bedingungen wie einer Komplex-III-Inhibition haben. Einige könnten dabei protektiv sein, während andere vielleicht den Stress und damit einen Zelltod verstärken. Daneben können weitere exogene Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren oder die Zusammensetzung des Zellkulturmediums das Verhalten in vivo und in vitro unterschiedlich beeinflussen und so auch die Reaktion auf eine mitochondriale Dysfunktion mitbestimmen. Grün et al. (2022) zeigten beispielweise, dass je nach FBS-Charge (*fetal bovine serum*) als Zusatz im Zellkulturmedium das Zellwachstum von H9c2-Zellen bei AMA-Behandlung unterschiedlich beeinflusst wird¹⁰². Zusammenfassend ist es also durchaus möglich, dass adulte Kardiomyozyten in vivo eine nicht so drastische Reaktion auf eine mitochondriale Dysfunktion zeigen wie in den hier gezeigten in vitro Experimenten. Hierfür könnte man *Hccs* in adulten Stadien durch einen induzierbaren Knockout im Mausherzen inaktivieren (siehe Abschnitt 1.4). Umgekehrt könnten embryonale Kardiomyozyten in vivo anfälliger sein als in vitro.

5.9 Fazit und Ausblick

Der mitochondriale Metabolismus gilt als einer der zentralen Faktoren, die zu einer erhöhten Anfälligkeit des adulten Herzens gegenüber Stress führen. Mit dem Alter kommt es zu einem veränderten mitochondrialen Metabolismus, einer vermehrten Produktion von ROS und damit

einhergehend zu oxidativen Schäden von DNA, Proteinen und Lipiden, die zu verschiedenen zellulären Funktionseinschränkungen führen¹⁶². Eine Regeneration des adulten Herzens ist dabei aufgrund der fehlenden Proliferation von Kardiomyozyten nur eingeschränkt möglich. Ein solcher Verlust der Regenerationsfähigkeit tritt bei Mäusen bereits eine Woche postnatal ein (siehe Abschnitt 5.1)²³⁸. Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen, darunter der Ischämie-Reperfusionsschaden und verschiedene Kardiomyopathien. Des Weiteren sind sie entscheidend an der Kardiotoxizität von Doxorubicin beteiligt, einem Chemotherapeutikum der Gruppe der Anthrazykline (siehe Abschnitt 1.1). Im Rahmen der in Abschnitt 2 näher erläuterten Kardioprotektion könnten myokardiale Schädigungen minimiert oder kardiale Ereignisse sogar verhindert werden. Mitochondrien rücken dabei immer wieder in den Vordergrund, wenn es um die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen kardialer Erkrankungen geht. Die Ergebnisse der Arbeit bieten spannende Erkenntnisse zu der hohen Stresstoleranz embryonaler Kardiomyozyten gegenüber einer mitochondrialen Dysfunktion, die im Verlauf der Entwicklung verloren zu gehen scheint. Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer und präventiver Strategien ist eine genaue Identifizierung zum einen der Gründe für eine verminderte Stresstoleranz in differenzierten Kardiomyozyten und zum anderen der möglichen protektiven Signalwege. Die Reaktivierung einer embryonalen Zellprotektion könnte im Herzen beispielsweise zu einer Reduktion des Kardiomyozytenverlustes innerhalb eines Infarktareal führen. Andererseits könnten Kardiomyozyten im Randbereich eines Infarktes nach gegebenenfalls temporärem Verlust ihrer Funktion/Kontraktilität trotzdem überleben, sich erholen und ihre Funktion zurückerlangen, bestenfalls sogar proliferieren und damit aktiv zur Regeneration beitragen. Gleichzeitig könnten sie auch ohne vollständigen Erhalt ihrer Funktion durch das Sezernieren von bspw. Wachstumsfaktoren und Zytokinen als wichtige Aktivatoren der Regeneration dienen und somit benachbarte Kardiomyozyten zur Proliferation anregen. Weitere mögliche Ansätze wäre der Schutz von Herzmuskelzellen vor Behandlung mit kardiotoxischen Medikamenten wie Doxorubicin und um langfristig Schäden abzumildern. Ähnlich wie embryonale Kardiomyozyten zeigten unsere Versuche auch in neonatalen Kardiomyozyten keine größeren Unterschiede in der Zelldichte oder morphologische Anzeichen für einen Zelltod wie nicht mehr adhärente, schwimmende Zellen und auch ihre Kontraktilität blieb erhalten. Eine Abnahme der Regenerationsfähigkeit der neonatalen Kardiomyozyten zeigten Porrello et al. (2011) 7 Tage nach Geburt. Die stark eingeschränkte Proliferationskapazität von Kardiomyozyten postnatal geht auch mit einem Verlust der Regenerationskapazität nach Gewebeschäden einher. Dabei wurde die Regenerationskapazität nach partieller chirurgischer Resektion der Herzspitze im Maus-Herzen evaluiert. Durch eine gesteigerte Proliferation konnte im Herzen zwei Monate später

in einer durchgeführten Echokardiografie eine normale systolische Funktion nachgewiesen werden.

Neonatale Kardiomyozyten können auch nach Interventionen eine erstaunliche funktionelle Erholung zeigen. Haubner et al. (2016) berichteten von einem Neugeborenen-Patienten mit einem schweren Myokardinfarkt und akutem Linksherzversagen mit Durchführung einer Thrombolyse-Therapie circa 28 Stunden nach Auftritt der Symptomatik. Innerhalb des Krankenhausaufenthaltes von eineinhalb Monaten kam es zu einer laborchemischen und funktionellen kardialen Verbesserung auf Werte, die altersgleichen, gesunden Kindern entsprachen. Die weitere Entwicklung des Patienten unterschied sich nicht von anderen Kindern seines Alters. Auf der Grundlage der erhobenen klinischen Daten hatte das Kind keine offensichtlichen Anzeichen für strukturelle Herzerkrankungen mit vollständiger Erholung seiner Herzfunktion²³⁹. Besonders interessant wäre hierbei daher auch die genaue Identifizierung des Zeitpunktes bzw. des Differenzierungsstadiums, an dem es zu einer Abnahme der Stresstoleranz der Kardiomyozyten im Laufe der Herz-Entwicklung kommt.

Die Erkenntnisse zu der hohen Stresstoleranz der embryonalen Kardiomyozyten könnten zudem interessante Einblicke in die pränatale Herzentwicklung bieten und werfen die Frage auf, ob die Resistenz und Plastizität der Zellen Einfluss auf die Vermeidung kardialer Fehlbildungen, angeborener Herzfehler oder frühkindlicher Herzerkrankungen haben. Während der pränatalen Entwicklung muss das embryonale und fetale Herz immer wieder eine hohe Anpassungsfähigkeit an sich ändernde intrauterine Bedingungen wie einer Hypoxie oder ein sich änderndes Nährstoffangebot beweisen (siehe Abschnitt 2)^{107,108}. So scheinen eine mitochondriale Dysfunktion und damit einhergehender ER- und unkompensierter oxidativer Stress an der Pathogenese eines Hypoplastischen Linksherzsyndroms beteiligt zu sein²⁴⁰.

Die in unserer Arbeit gezeigte Resistenz der embryonalen Zellen könnte Voraussetzung für eine regelrechte intrauterine Entwicklung sein, insbesondere im Fall pathologischer Bedingungen, um das Wachstum des Herzens auch unter (temporär) ungünstigen Verhältnissen aufrecht zu erhalten.

Zu den in embryonalen Kardiomyozyten unter Komplex-III-Inhibierung identifizierten Signalwegen zählen die *Integrated-Stress-Response*, antioxidative Mechanismen der Redox-Homöostase und Hinweise auf eine Aktivierung der ER-Stress-Achse. Eine Aktivierung der in H9c2-Zellen identifizierten, mitochondrialen *unfolded-protein-response*¹⁰² konnte in den primären embryonalen Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden. Ein wichtiger Aspekt weiterer Untersuchungen wäre daher insbesondere die Identifikation der Signalwege, die im Endeffekt wirklich relevant für das Überleben der Zellen sind. Wie in Abschnitt 5.8 näher erläutert, könnten dazu ‚omics‘-Analysen und unbiased Screening dienen. Eine Stummschaltung der Schlüsselfaktoren von ISR oder *Heat-Shock-Response* hatten keinen Einfluss auf das Überleben oder das Zellwachstum von H9c2-Zellen unter AMA¹⁰². Beachtet

man die Unterschiede zu den Primärzellen (siehe Abschnitt 2), kann auf dieser Grundlage jedoch noch nicht in den embryonalen Kardiomyozyten von einer gleichen Reaktion ausgegangen werden und müsste durch weitere Untersuchungen bestätigt oder widerlegt werden. Eine Aktivierung der ISR und *Heat-Shock-Response* wurde bereits in einer Reihe von Publikationen als protektiv gegenüber verschiedensten Organpathologien beschreiben (siehe Abschnitt 5.2). Im nächsten Schritt wäre zu identifizieren, ob das Überleben der adulten Kardiomyozyten unter einer Komplex-III-Inhibition durch Aktivierung der einzelnen Signalwege verbessert werden kann.

Als besonders relevant für das Wachstum und Überleben stellte sich in H9c2-Zellen der Transkriptionsfaktor Nrf2 dar ¹⁰². Mit den Mitochondrien als Hauptproduzent der intrazellulär gebildeten ROS stellt die Abwehr von oxidativem Stress einen häufigen Ansatz kardioprotektiver Strategien dar. Dabei können zum einen das Abfangen bzw. die Neutralisierung von ROS, aber auch eine von vornerein verminderte Bildung von ROS mögliche Strategien zur Vermeidung eines oxidativen Schadens der Zellen bieten ²⁴¹. Die embryonalen Kardiomyozyten haben dabei eine beeindruckende Resistenz gegenüber der nachgewiesenen Bildung von ROS und dem resultierenden oxidativen Stress.

Insbesondere vor diesem Hintergrund ist eine genauere Identifizierung von Nrf2 und seiner transkriptionellen Zielgene auch in embryonalen Kardiomyozyten entscheidend. Die Induktion von HO-1 in embryonalen Kardiomyozyten konnten wir bereits nachweisen, weshalb die Auswirkungen eines Fehlens von HO-1 oder auch einer Überexpression in adulten Kardiomyozyten spannende Optionen weiterer Versuche bieten. Hierbei sind noch einmal die kardioprotektive Rolle von HO-1 und damit einhergehend die therapeutischen Optionen hervorzuheben, die in unterschiedlichen Studien für HO-1 belegt werden konnten (siehe Abschnitt 5.4). Eine pharmakologische Induktion von HO-1 ist durch cobalt protoporphyrin (CoPP) möglich. Für die Behandlung mit CoPP konnten bereits kardioprotektive Effekte bei Hypoxie ²⁴² oder auch bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden ²⁴³ nachgewiesen werden. Ebenfalls wäre eine Aktivierung von Nrf2 als vorausgehender Transkriptionsfaktor der HO-1 Expression denkbar. Auch Nrf2 bietet durch die in der Literatur häufig beschriebenen kardioprotektiven Effekte (siehe Abschnitt 5.4) vielversprechende Möglichkeiten therapeutischer oder präventiver Strategien verschiedenster Pathologien.

6. Zusammenfassung

Mitochondrien als zelluläre Energielieferanten sind wesentlich an der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt. Mit seinem hohen Energiebedarf ist das Herz auf eine regelrechte Funktion der Zellorganelle angewiesen. Doch insbesondere mit zunehmendem Alter kommt es zu mitochondrialen Funktionseinschränkungen. Mitochondriale Dysfunktionen äußern sich unter anderem in einer erhöhten Konzentration von ROS und einer verminderten Bildung von ATP. Mit kardiovaskulären Erkrankungen als eine der Haupttodesursachen weltweit, können die Erkenntnisse über das zelluläre Überleben im Hinblick auf eine Schädigung der Mitochondrien wichtige therapeutisch und präventive Optionen bieten. Durch ihre Beteiligung an der Pathogenese kardialer Erkrankungen rücken Mitochondrien daher immer wieder in den Fokus der sogenannten Kardioprotektion. Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen die Unterschiede embryonaler und adulter Kardiomyozyten bei einer mitochondrialen Dysfunktion. Embryonale Kardiomyozyten zeigen eine hohe Resistenz gegenüber einer Komplex-III-Inhibition. Die Phasenkontrastmikroskopie zeigt einen konfluenten und synchron schlagenden Zellverbund ohne den Nachweis eines signifikanten Zellverlustes in der Zellzählung, trotz einer nachweislich vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffe. Dabei aktivieren die embryonalen Kardiomyozyten verschiedene molekulare Schutzmechanismen, darunter die *Integrated-Stress-Response*, die *Heat-Shock-Response*, antioxidative Proteine und Enzyme oder auch die ER-Stress-Achse. Dabei handelt es sich um Signalwege zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und der Proteinhomöostase. Im Gegensatz dazu kommt es bei adulten Kardiomyozyten bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen des verwendeten Inhibitors schnell zu einem Zellverlust. Auch im Hinblick auf die Aktivierung der verschiedenen Signalwege zeigen sie deutliche Unterschiede zu den embryonalen Kardiomyozyten, sodass sich daraus mögliche Erklärungen der verminderten Toleranz adulter Kardiomyozyten ergeben. Sowohl für die pränatale Entwicklung des Herzens, als auch für das Verständnis und den Umgang mit kardiovaskulären Erkrankungen im Alter, kann eine genauere Differenzierung der molekularen Hintergründe und der zellulären Veränderungen bei mitochondrialen Funktionseinschränkungen wesentliche Möglichkeiten bieten.

7. Summary

Mitochondria as cellular energy suppliers are significantly involved in the pathogenesis of various cardiovascular diseases. With its high energy demand, the heart is dependent on proper cellular organelle function. However, mitochondrial dysfunction occurs especially with age. Mitochondrial dysfunction manifests itself, among other things, in an increased concentration of ROS and reduced formation of ATP. With cardiovascular disease as a major cause of death worldwide, insights into cellular survival regarding mitochondrial damage may provide important therapeutic and preventive options. Due to their involvement in the pathogenesis of cardiac diseases, mitochondria are therefore increasingly becoming the focus of so-called cardioprotection. The results of our work confirm the differences of embryonic and adult cardiomyocytes in mitochondrial dysfunction. Embryonic cardiomyocytes show high resistance to complex III inhibition. Phase contrast microscopy shows confluent and synchronously beating cell layers without evidence of significant cell loss in cell counting. This is all despite a demonstrable increase in the formation of reactive oxygens. In this context, embryonic cardiomyocytes activate various molecular protective mechanisms, including the integrated stress response, the heat-shock response, antioxidant proteins and enzymes, or the ER stress axis. These are signaling pathways to maintain cellular integrity and protein homeostasis. In contrast, adult cardiomyocytes experience rapid cell loss even at much lower concentrations of the inhibitor used. They also show marked differences from embryonic cardiomyocytes with respect to activation of the various signaling pathways, thus providing possible explanations for the reduced tolerance of adult cardiomyocytes. Both for the prenatal development of the heart and for the understanding and management of cardiovascular disease in old age, a more precise differentiation of the molecular background and cellular changes in mitochondrial dysfunction may offer significant opportunities.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat, Adenosindiphosphat
AMA	Antimycin A
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	activating transcription factor 4
ATF5	activating transcription factor 5
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BiP	Binding immunoglobulin protein
BSA	Bovines Serumalbumin, Bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
CHOP	C/EBP homology protein
CLpP	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit
CoPP	cobalt protoporphyrin
Cox IV	Cytochrome c Oxidase Subunit 4 Isoform 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, 4',6-Diamidin-2-phenylindol
Ddit3	DNA damage-inducible transcript
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium high Glucose
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post coitum
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eiF2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETC	Electron transport chain, Elektronentransportkette
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GADD 34	Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible protein 34
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA4	GATA binding protein 4, GATA binding protein 4

GPX.....	Glutathion-Peroxidase
GSH.....	Glutathion
GSR.....	Glutathion Reduktase
Hccs	Holocytochrom-C-Synthetase
HMOX1.....	heme oxygenase 1 Gen
Ho-1.....	Hämoxygenase-1
HO-1.....	Hämoxygenase-1
HSF	Heat shock factor
HSF1	heat shock factor 1, Hitzeschockfaktor 1
HSP.....	heat shock protein, Hitzeschockprotein
INT.....	Iodnitrotetrazoliumchlorid
IRE1	Inositol-requiring Enzyme 1
ISR	Integrated Stress Response
JNK.....	c-Jun N-terminal kinase
JNK2.....	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	Kelch-like ECH associated protein
LAD	left anterior descending
LDH	Lactatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEF2.....	myocyte enhancer factor 2, myocyte enhancer factor 2
MELAS	mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes
MERRF.....	myoclonic epilepsy with ragged red fibres
Mfn	Mitofusin
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
mtDNA.....	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thizoly)-2,5-
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NFE2L2	NFE2 like bZIP transcription factor 2
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS.....	Normal-Goat-Serum
NKA.....	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
Nkx2.5	NK2 homeobox 5
NRF2	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
OSCP	Oligomycin sensitivity conferral Protein
OXPHOS.....	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PERK.....	protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase

PFA *Paraformaldehyd*
 PMPCB..... *peptidase, mitochondrial processing subunit beta*
 PQC.....*Protein quality control, protein quality control*
 PRDX*Peroxiredoxin*
 ROS..... *reactive oxygen species*
 RPKM..... *Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads*
 rRNA..... *ribosomale RNA*
 SDS *sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat*
 SEM..... *standard error of the mean*
 SOD..... *Superoxiddismutase*
 Tbx20 *T-Box-Transkriptionsfaktor 20*
 TEM..... *Transmissionselektronenmikroskopie*
 TMRM..... *tetramethylrhodamine methyl ester*
 Tris *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*
 tRNA..... *Transfer-RNA*
 Trx *Thioredoxin*
 UPR..... *Unfolded Protein Response*
 WHO *World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation), World Health Organization*
 WPC *weeks post conception*
 YME1L1..... *YME1 like 1 ATPase*

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die mitochondriale Ultrastruktur	4
Abbildung 2: Die mitochondriale Atmungskette	7
Abbildung 3: Reaktionen der Superoxiddismutasen und Katalasen	10
Abbildung 4: Umwandlung von H₂O₂ zu H₂O durch Peroxiredoxine	11
Abbildung 5: Grafische Darstellung der Hitzeschock-Antwort (Heat Shock Response) 13	
Abbildung 6: Grafische Darstellung der Integrated-Stress-Response und ihrer Verbindung zu der mitochondrialen Unfolded-Protein-Response	17
Abbildung 7: LDH-Assay zur Beurteilung von Zellviabilität und Zytotoxizität	40
Abbildung 8: Beurteilung der Kontraktilität Antimycin A behandelter embryonaler Kardiomyozyten	42
Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen von H9c2-Zellen unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A	52
Abbildung 10 Wachstum von H9c2-Zellen unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A	53
Abbildung 11 Grafische Darstellungen der Western-Blot-Analysen molekularer Stressantworten in H9c2-Zellen nach Behandlung mit AMA bzw. DMSO	55
Abbildung 12 Phasenkontrastmikroskopie embryonaler Kardiomyozyten nach 24- stündiger Behandlung mit Antimycin A bzw. DMSO	57
Abbildung 13 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung embryonaler Kardiomyozyten in Kultur	59
Abbildung 14 Kernzahl embryonaler Kardiomyozyten unter der Behandlung mit Antimycin A	60
Abbildung 15 Analyse der Zellzyklusaktivität embryonaler Kardiomyozyten und Nicht- Kardiomyozyten unter einer Komplex-III-Inhibition durch Antimycin A anhand von XYZ	62
Abbildung 16 Auswertung des Kontraktionsverhaltens embryonaler Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A	64
Abbildung 17 Auswertungen von Western-Blot-Analysen stressreaktiver Signalwege in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A	66
Abbildung 18 Immunfluoreszenzanalysen von ATF4 als Marker molekularer Stressantworten in mit AMA behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	67
Abbildung 19 Immunfluoreszenzanalysen von CHOP als Marker molekularer Stressantworten in embryonalen Kardiomyozyten	68
Abbildung 20 Auswertung der Western-Blot-Analysen der Proteasen YME1L1, PMPCB und ClpP der UPR^{mt} unter Antimycin A in embryonalen Kardiomyozyten	69

Abbildung 21 Untersuchung des ER-Chaperons BiP (GRP78) mittels Western Blot in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A	71
Abbildung 22 Fluoreszenzanalysen zum Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen und dem mitochondrialem Membranpotential in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	73
Abbildung 23 Auswertungen der Western-Blot-Analysen von PRDX-SO ₃ in embryonalen Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A	74
Abbildung 24 Grafische Darstellungen der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von HO-1 und p38 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition	76
Abbildung 25 Auswertungen der Western-Blot-Analysen von SOD1 und SOD2 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition	77
Abbildung 26 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von NRF2 in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	78
Abbildung 27 Immunfluoreszenzanalysen von SOD2 in mit Antimycin A behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	80
Abbildung 28 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von HSP60 in embryonalen Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition	81
Abbildung 29 Immunfluoreszenzanalyse von HSP60 in embryonalen Kardiomyozyten unter Antimycin A	82
Abbildung 30 Morphologie adulter Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A (AMA)	84
Abbildung 31 Adulte Kardiomyozyten zeigten keine Aktivierung ISR spezifischer Marker nach hochdosierter AMA-Behandlung	85
Abbildung 32 Morphologie adulter Kardiomyozyten nach Behandlung mit 1 µM Antimycin A	86
Abbildung 33 Western-Blot-Analysen von p-eIF2 α in mit Antimycin A behandelten, embryonalen und adulten Kardiomyozyten	87
Abbildung 34 Western-Blot-Analysen von CHOP und ATF4 in adulten und embryonalen Kardiomyozyten nach 2-stündiger Behandlung mit Antimycin A	88
Abbildung 35 Western-Blot-Analyse der MAP-Kinase p38 in AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten	89
Abbildung 36 Western-Blot-Analyse von HSF1 in mit AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten	90
Abbildung 37 Western-Blot-Analyse von antioxidativen Mechanismen sowie Effektoren von mitochondrialem Stress und ER-Stress in mit AMA behandelten, adulten und embryonalen Kardiomyozyten	91

Abbildung 38 Vergleich der Basisexpression verschiedener Stressmarker in embryonalen Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten	93
Abbildung 39 Expressionsanalyse verschiedener stressreaktiver Gene in humanen und murinen Herzen im Laufe der embryonalen und postnatalen Entwicklung	95
Abbildung 40 Wachstum von H9c2-Zellen unter Oligomycin-Behandlung	98
Abbildung 41 Phasenkontrastmikroskopie embryonaler Kardiomyozyten 24 Stunden nach Behandlung mit Oligomycin und Rotenon	99
Abbildung 42 Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des Sarkomerproteins α-Actinin embryonaler Kardiomyozyten nach 24 h Behandlung mit Oligomycin	100
Abbildung 43 Kernzählung und Bestimmung des Kardiomyozytenanteils von mit Oligomycin behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	101
Abbildung 44 Zellzyklusaktivität embryonaler Kardiomyozyten unter Oligomycin-Behandlung	102
Abbildung 45 Immunfluoreszenzanalysen der ISR/UPR von mit Oligomycin bzw. mit Rotenon behandelten, embryonalen Kardiomyozyten	104
Abbildung 46 LDH-Assay embryonaler Kardiomyozyten nach Behandlung mit Antimycin A, Rotenon und Oligomycin	106
Abbildung 47 Phasenkontrastmikroskopie neonataler Kardiomyozyten bei Komplex-III-Inhibition	108

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen und Chemikalien	25
Tabelle 2: Substanzen der Zellkultur	26
Tabelle 3: Medien der Zellkultur	27
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	28
Tabelle 5: Geräte	29
Tabelle 6: Software und Online Programme	31
Tabelle 7: Verbrauchsmaterial.....	31
Tabelle 8: Kits.....	32
Tabelle 9: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz.....	33
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz.....	34
Tabelle 11: Inhibitoren	35
Tabelle 12: Größenstandards Western Blot	35
Tabelle 13: Deckflüssigkeit Immunfluoreszenz	35
Tabelle 14: Pipettierschema der Standardreihe zur Proteinbestimmung mit BSA-Standard	44
Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel. Menge entspricht 2 Gelen..	45

11. Literaturverzeichnis

1. Partridge, L., Deelen, J. & Slagboom, P. E. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature* **561**, 45–56 (2018).
2. Leong, D. P. *et al.* Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2. *Circ Res* **16** (2017) doi:DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311849.
3. Shirakabe, A., Ikeda, Y., Sciarretta, S., Zablocki, D. K. & Sadoshima, J. Aging and Autophagy in the Heart. *Circ. Res.* **118**, 1563–1576 (2016).
4. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2021) (abgerufen am 18.03.2025).
5. Hedda, N. Infografik: Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen höchste Kosten. *Statista Infografiken* <https://de.statista.com/infografik/11301/herz-kreislauf-erkrankungen-verursachen-hoechste-kosten/> (2017).
6. Neubauer, S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1140–1151 (2007).
7. Rosca, M. G. & Hoppel, C. L. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **88**, 40–50 (2010).
8. Vásquez-Trincado, C. *et al.* Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease: Mitochondria and cardiovascular disease. *J. Physiol.* **594**, 509–525 (2016).
9. Dominic, E. A. *et al.* Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. *Heart* **100**, 611–618 (2014).
10. Viscomi, C. & Zeviani, M. Strategies for fighting mitochondrial diseases. *J. Intern. Med.* **287**, 665–684 (2020).
11. Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchon, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–723 (2012).
12. Colina-Tenorio, L., Horten, P., Pfanner, N. & Rampelt, H. Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *J. Intern. Med.* **287**, 645–664 (2020).
13. Finsterer, J. Mitochondriopathies. *Eur. J. Neurol.* **11**, 163–186 (2004).

14. Yeh, E. T. H. & Chang, H.-M. Oncocardiology—Past, Present, and Future. *JAMA Cardiol.* **1**, 1066–1072 (2016).
15. Armstrong, G. T. *et al.* Comprehensive Echocardiographic Detection of Treatment-related Cardiac Dysfunction in Adult Survivors of Childhood Cancer: Results from the St. Jude Lifetime Cohort Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 2511–2522 (2015).
16. Larsen, R. Akutes Koronarsyndrom (ACS) und akuter Myokardinfarkt. in *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege* 680–690 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016). doi:10.1007/978-3-662-50444-4_50.
17. Deutsche Herzstiftung (Hg.). Deutscher Herzbericht 2022. (2022).
18. Hochman, J. S. One-Year Survival Following Early Revascularization for Cardiogenic Shock. *JAMA* **285**, 190 (2001).
19. Hochman, J. S. *et al.* Early Revascularization in Acute Myocardial Infarction Complicated by Cardiogenic Shock. *N. Engl. J. Med.* **341**, 625–634 (1999).
20. Ibáñez, B., Heusch, G., Ovize, M. & Van de Werf, F. Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 1454–1471 (2015).
21. Han, M.-X., Xu, X.-W., Lu, S.-Q. & Zhang, G.-X. Effect of olprinone on ischemia-reperfusion induced myocardial injury in rats. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 1005–1012 (2019).
22. Ernster, L. & Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* **91**, 227s–255s (1981).
23. Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**, 225-IN6 (1967).
24. Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A. & Kamikawa, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.* **27**, R1177–R1192 (2017).
25. Valera-Alberni, M. & Canto, C. Mitochondrial stress management: a dynamic journey. *Cell Stress* **2**, 253–274 (2018).
26. Vercellino, I. & Sazanov, L. A. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 141–161 (2022).

27. Ulivieri, C. Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue Cell* 9 (2010).
28. Palade, G. E. AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF THE MITOCHONDRIAL STRUCTURE. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 188–211 (1953).
29. Sjostrand, D. F. S. ELECTRON MICROSCOPY OF MITOCHONDRIA AND CYTOPLASMIC DOUBLE MEMBRANES. **2** (1953).
30. Heinrich, Peter C., Müller, Matthias, & Greave, Lutz. Biochemie und Pathobiochemie. in 235–251 (Springer Medizin, 2014).
31. Cooper, Geoffrey M. *The Cell, A Molecular Approach*. (Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000).
32. Devin, A. *et al.* Mitochondria: Ultrastructure, Dynamics, Biogenesis and Main Functions. in *Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes* 3–32 (Elsevier, 2019).
doi:10.1016/B978-0-12-811752-1.00001-8.
33. Krishnan, K. J., Greaves, L. C., Reeve, A. K. & Turnbull, D. M. Mitochondrial DNA Mutations and Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1100**, 227–240 (2007).
34. Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 655–667 (2010).
35. Daems, W. Th. & Wisse, E. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J. Ultrastruct. Res.* **16**, 123–140 (1966).
36. Manella, C. A., Marko, M. & Buttle, K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci* 37–38 (1997).
37. Frey, T. G. & Mannella, C. A. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 319–324 (2000).
38. Ahmad, M., Wolberg, A. & Kahwaji, C. I. Biochemistry, Electron Transport Chain. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
39. Nath, S. & Villadsen, J. Oxidative phosphorylation revisited: Oxidative Phosphorylation Revisited. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 429–437 (2015).
40. Saraste, M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 1488–1493 (1999).

41. Mitchell, P. The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137–139 (1975).
42. Mitchell, P. PROTONMOTIVE REDOX MECHANISM OF THE CYTOCHROME b-c₁ COMPLEX IN THE RESPIRATORY CHAIN: PROTONMOTIVE UBIQUINONE CYCLE. *FEBS Lett.* **56**, 6 (1975).
43. Mazat, J.-P., Devin, A. & Ransac, S. Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 455–465 (2020).
44. Quinlan, C. L., Gerencser, A. A., Treberg, J. R. & Brand, M. D. The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-inhibited Mitochondrial Q-cycle. *J. Biol. Chem.* **286**, 31361–31372 (2011).
45. Schagger, H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783 (2000).
46. Dudkina, N. V., Kudryashev, M., Stahlberg, H. & Boekema, E. J. Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15196–15200 (2011).
47. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. **301**, 10 (2011).
48. Zorov, D. B., Juhaszova, M. & Sollott, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol. Rev.* **94**, 909–950 (2014).
49. Rochette, L. *et al.* Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 326–348 (2015).
50. Larosa, V. & Remacle, C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci. Rep.* **38**, BSR20171492 (2018).
51. Dahl, J.-U., Gray, M. J. & Jakob, U. Protein Quality Control Under Oxidative Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* **427**, 1549–1563 (2015).
52. Sarvazyan, N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **271**, H2079–H2085 (1996).

53. Songbo, M. *et al.* Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Lett.* **307**, 41–48 (2019).
54. Octavia, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 1213–1225 (2012).
55. Sinha, K., Das, J., Pal, P. B. & Sil, P. C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.* **87**, 1157–1180 (2013).
56. Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 1–12 (2009).
57. Lei, X. G. *et al.* Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol. Rev.* **96**, 307–364 (2016).
58. Miao, L. & St. Clair, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 344–356 (2009).
59. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 435–445 (2015).
60. Lu, J. & Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 75–87 (2014).
61. Waza, A. A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S. A. & Bhat, M. A. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflamm. Res.* **67**, 579–588 (2018).
62. Chen, Q. M. & Maltagliati, A. J. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiol. Genomics* **50**, 77–97 (2018).
63. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A. & Donato, R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1865**, 721–733 (2018).
64. Voos, W. Chaperone–protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 388–399 (2013).
65. dok

66. Richter, K., Haslbeck, M. & Buchner, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell* **40**, 253–266 (2010).
67. Mayer, M. P. & Bukau, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 670–684 (2005).
68. Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T. & Thiele, D. J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 4–19 (2018).
69. Hahn, J.-S., Hu, Z., Thiele, D. J. & Iyer, V. R. Genome-Wide Analysis of the Biology of Stress Responses through Heat Shock Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5249–5256 (2004).
70. Katiyar, A. *et al.* HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response. *FEBS Open Bio* **10**, 1135–1148 (2020).
71. Baker, B. M., Nargund, A. M., Sun, T. & Haynes, C. M. Protective Coupling of Mitochondrial Function and Protein Synthesis via the eIF2 α Kinase GCN-2. *PLoS Genet.* **8**, e1002760 (2012).
72. Melber, A. & Haynes, C. M. UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res.* **28**, 281–295 (2018).
73. Martinus, R. D. *et al.* Selective Induction of Mitochondrial Chaperones in Response to Loss of the Mitochondrial Genome. *Eur. J. Biochem.* **240**, 98–103 (1996).
74. Pellegrino, M. W., Nargund, A. M. & Haynes, C. M. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 410–416 (2013).
75. Jovaisaite, V., Mouchiroud, L. & Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867496/?report=reader> (2014).
76. Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M. & Haynes, C. M. Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation. *Science* **337**, 587–590 (2012).

77. Anderson, N. S. & Haynes, C. M. Folding the Mitochondrial UPR into the Integrated Stress Response. *Trends Cell Biol.* **30**, (2020).
78. Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S. & Samali, A. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3493–3511 (2013).
79. Rozpedek, W. *et al.* The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr. Mol. Med.* **16**, 533–544 (2016).
80. Pakos-Zebrucka, K. *et al.* The integrated stress response. *EMBO Rep.* **17**, 1374–1395 (2016).
81. Vögtle, F. Open questions on the mitochondrial unfolded protein response. *FEBS J.* febs.15569 (2020) doi:10.1111/febs.15569.
82. Guo, X. *et al.* Mitochondrial stress is relayed to the cytosol by an OMA1–DELE1–HRI pathway. *Nature* **579**, 427–432 (2020).
83. Fessler, E. *et al.* A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol. *Nature* **579**, 433–437 (2020).
84. Teske, B. F. *et al.* CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2477–2490 (2013).
85. Zhou, D. *et al.* Phosphorylation of eIF2 Directs ATF5 Translational Control in Response to Diverse Stress Conditions. *J. Biol. Chem.* **283**, 7064–7073 (2008).
86. Young, S. K. & Wek, R. C. Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. *J. Biol. Chem.* **291**, 16927–16935 (2016).
87. Fiorese, C. J. *et al.* The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Curr. Biol.* **26**, 2037–2043 (2016).
88. Melber, A. & Haynes, C. M. UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res.* **28**, 281–295 (2018).

89. Persengiev, S. P. Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors. *Genes Dev.* **16**, 1806–1814 (2002).
90. Aldridge, J. E., Horibe, T. & Hoogenraad, N. J. Discovery of Genes Activated by the Mitochondrial Unfolded Protein Response (mtUPR) and Cognate Promoter Elements. *PLoS ONE* **2**, (2007).
91. Zhao, Q. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **21**, 4411–4419 (2002).
92. Horibe, T. & Hoogenraad, N. J. The Chop Gene Contains an Element for the Positive Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *PLoS ONE* **2**, e835 (2007).
93. Kaspar, S. *et al.* Adaptation to mitochondrial stress requires CHOP-directed tuning of ISR. *Sci. Adv.* **7**, eabf0971 (2021).
94. Quirós, P. M. *et al.* Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J. Cell Biol.* **216**, 2027–2045 (2017).
95. Sánchez-Díaz, M., Nicolás-Ávila, J. Á., Cordero, M. D. & Hidalgo, A. Mitochondrial Adaptations in the Growing Heart. *Cell Press Rev.* **31**, (2020).
96. Günthel, M., Barnett, P. & Christoffels, V. M. Development, Proliferation, and Growth of the Mammalian Heart. *Mol. Ther.* **26**, 1599–1609 (2018).
97. Bergmann, O. *et al.* Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* **324**, 98–102 (2009).
98. Drenckhahn, J.-D. *et al.* Compensatory Growth of Healthy Cardiac Cells in the Presence of Diseased Cells Restores Tissue Homeostasis during Heart Development. *Dev. Cell* **15**, 521–533 (2008).
99. Babbitt, S. E. *et al.* Mechanisms of Mitochondrial Holocytochrome c Synthase and the Key Roles Played by Cysteines and Histidine of the Heme Attachment Site, Cys-XX-Cys-His. *J. Biol. Chem.* **289**, 28795–28807 (2014).
100. Lyon, M. X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr.* **91**, 107–112 (2007).

101. Magarin, M. *et al.* Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 1–14 (2016).
102. Grün, B. *et al.* Inhibition of mitochondrial respiration has fundamentally different effects on proliferation, cell survival and stress response in immature versus differentiated cardiomyocyte cell lines. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 1011639 (2022).
103. Peter, A. K., Bjerke, M. A. & Leinwand, L. A. Biology of the cardiac myocyte in heart disease. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2149–2160 (2016).
104. Hescheler, J. *et al.* Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* **69**, 1476–1486 (1991).
105. Kubler, W. & Haass, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. *Heart* **75**, 330–333 (1996).
106. Heusch, G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet* **381**, 166–175 (2013).
107. Tan, C. M. J. & Lewandowski, A. J. The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life. *Fetal Diagn. Ther.* **47**, 373–386 (2020).
108. Sedaghat, K., Zahediasl, S. & Ghasemi, A. Intrauterine programming. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **18**, 212–220 (2015).
109. Fajersztajn, L. & Veras, M. M. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Res.* **109**, 1377–1385 (2017).
110. Bhatti, J. S., Bhatti, G. K. & Reddy, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1863**, 1066–1077 (2017).
111. Zhou, B. & Tian, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J. Clin. Invest.* **128**, 3716–3726 (2018).
112. Vander Heide, R. S. & Steenbergen, C. Cardioprotection and Myocardial Reperfusion: Pitfalls to Clinical Application. *Circ. Res.* **113**, 464–477 (2013).

113. Claycomb, W. C. *et al.* HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 2979–2984 (1998).
114. Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S. & Grimm, M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 276–284 (2015).
115. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-35997-2.
116. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. & Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* **69**, 581–593 (1997).
117. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12827 (2021).
118. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 265–275 (1951).
119. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
120. Sjöblom, B., Salmazo, A. & Djinović-Carugo, K. α -Actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2688–2701 (2008).
121. Gautel, M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 39–46 (2011).
122. Auchampach, J. *et al.* Measuring cardiomyocyte cell-cycle activity and proliferation in the age of heart regeneration. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **322**, H579–H596 (2022).
123. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

124. Creed, S. & McKenzie, M. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). in *Cancer Metabolism* (ed. Haznadar, M.) vol. 1928 69–76 (Springer New York, New York, NY, 2019).
125. Vasilev, A. *et al.* Feasibility of Photodynamic Therapy for Glioblastoma with the Mitochondria-Targeted Photosensitizer Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). *Biomedicines* **9**, 1453 (2021).
126. Gündüz, D., Hamm, C. W. & Aslam, M. Simultaneous Isolation of High Quality Cardiomyocytes, Endothelial Cells, and Fibroblasts from an Adult Rat Heart. *J. Vis. Exp.* 55601 (2017) doi:10.3791/55601.
127. Robinson, K. M., Janes, M. S. & Beckman, J. S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat. Protoc.* **3**, 941–947 (2008).
128. Kimes, B. & Brandt, B. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* **98**, 367–381 (1976).
129. Babbitt, S. E., Sutherland, M. C., Francisco, B. S., Mendez, D. L. & Kranz, R. G. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 446–455 (2015).
130. Miyoshi, H., Tokutake, N., Imaeda, Y., Akagi, T. & Iwamura, H. A model of antimycin A binding based on structure-activity studies of synthetic antimycin A analogues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1229**, 149–154 (1995).
131. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G. & Pacher, P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 203–208 (2007).
132. Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 3460–3470 (2013).
133. Koul, H. K., Pal, M. & Koul, S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer* **4**, 342–359 (2013).
134. Onódi, Z. *et al.* Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious

- limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **165**, 19–30 (2022).
135. Rodgers, L. S., Schnurr, D. C., Broka, D. & Camenisch, T. D. An improved protocol for the isolation and cultivation of embryonic mouse myocytes. *Cytotechnology* **59**, 93–102 (2009).
136. Sobecki, M. *et al.* Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* **77**, 2722–2734 (2017).
137. Klöppel, G. & La Rosa, S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* **472**, 341–349 (2018).
138. Uxa, S. *et al.* Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ.* **28**, 3357–3370 (2021).
139. Ribeiro, A. J. S. *et al.* Contractility of single cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells depends on physiological shape and substrate stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12705–12710 (2015).
140. Chesnokova, E., Bal, N. & Kolosov, P. Kinases of eIF2a Switch Translation of mRNA Subset during Neuronal Plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2213 (2017).
141. Oliva, C. R., Markert, T., Gillespie, G. Y. & Griguer, C. E. Nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunit 4 regulates BMI1 expression and determines proliferative capacity of high-grade gliomas. *Oncotarget* **6**, 4330–4344 (2015).
142. Maurel, M. & Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **304**, C1117–C1126 (2013).
143. Jadiya, P. & Tomar, D. Mitochondrial Protein Quality Control Mechanisms. *Genes* **11**, 563 (2020).
144. Rowland, A. A. & Voeltz, G. K. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–615 (2012).
145. Celardo, I. *et al.* Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson’s disease. *Cell Death Dis.* **7**, e2271–e2271 (2016).

146. Kopp, M. C., Larburu, N., Durairaj, V., Adams, C. J. & Ali, M. M. U. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 1053–1062 (2019).
147. Jeong, S.-Y. & Seol, D.-W. The role of mitochondria in apoptosis. 12.
148. Zamzami, N. & Kroemer, G. Methods to Measure Membrane Potential and Permeability Transition in the Mitochondria During Apoptosis. in *Apoptosis Methods and Protocols* vol. 282 103–116 (Humana Press, New Jersey, 2004).
149. Veal, E. A., Underwood, Z. E., Tomalin, L. E., Morgan, B. A. & Pillay, C. S. Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 574–590 (2018).
150. Flynn, J. M. & Melov, S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 4–12 (2013).
151. Cardoso-Moreira, M. *et al.* Gene expression across mammalian organ development. *Nature* **571**, 505–509 (2019).
152. Evo-devo mammalian organs. <https://apps.kaessmannlab.org/evodevoapp/>.
153. Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* **583**, 3966–3973 (2009).
154. Giorgio, V., Fogolari, F., Lippe, G. & Bernardi, P. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 4247–4257 (2019).
155. Radad, K. *et al.* Rotenone: from modelling to implication in Parkinson’s disease. *Folia Neuropathol.* **57**, 317–326 (2019).
156. Farhana, A. & Lappin, S. L. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
157. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, pdb.prot095497 (2018).
158. Branco, A. F., Sampaio, S. F., Wieckowski, M. R., Sardão, V. A. & Oliveira, P. J. Mitochondrial disruption occurs downstream from β -adrenergic overactivation by

- isoproterenol in differentiated, but not undifferentiated H9c2 cardiomyoblasts: Differential activation of stress and survival pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2379–2391 (2013).
159. Guo, Y. & Pu, W. T. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ. Res.* **126**, 1086–1106 (2020).
160. Maroli, G. & Braun, T. The long and winding road of cardiomyocyte maturation. *Cardiovasc. Res.* **117**, 712–726 (2021).
161. Lopaschuk, G. D. & Jaswal, J. S. Energy Metabolic Phenotype of the Cardiomyocyte During Development, Differentiation, and Postnatal Maturation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **56**, 130–140 (2010).
162. Lesnefsky, E. J., Chen, Q. & Hoppel, C. L. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ. Res.* **118**, 1593–1611 (2016).
163. Uosaki, H. *et al.* Transcriptional Landscape of Cardiomyocyte Maturation. *Cell Rep.* **13**, 1705–1716 (2015).
164. Schaper, J., Meiser, E. & Stämmler, G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ. Res.* **56**, 377–391 (1985).
165. Puente, B. N. *et al.* The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response. *Cell* **157**, 565–579 (2014).
166. Chen, Y.-R. & Zweier, J. L. Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation. *Circ. Res.* **114**, 524–537 (2014).
167. Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* **115**, 500–508 (2005).
168. Fadeel, B. & Orrenius, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* **258**, 479–517 (2005).
169. Xu, X., Lai, Y. & Hua, Z.-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20180992 (2019).

170. Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D. & Sadoshima, J. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu. Rev. Physiol.* **80**, 1–26 (2018).
171. Zhang, G. *et al.* Integrated Stress Response Couples Mitochondrial Protein Translation With Oxidative Stress Control. *Circulation* **144**, 1500–1515 (2021).
172. Zhang, G., Wang, X., Rothermel, B. A., Lavandero, S. & Wang, Z. V. The integrated stress response in ischemic diseases. *Cell Death Differ.* **29**, 750–757 (2022).
173. Rouschop, K. M. *et al.* PERK/eIF2 α signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4622–4627 (2013).
174. Place, D. E., Samir, P., Malireddi, R. S. & Kanneganti, T.-D. Integrated stress response restricts macrophage necroptosis. *Life Sci. Alliance* **5**, e202101260 (2022).
175. Li, R.-J. *et al.* Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α . *Mol. Med. Rep.* **12**, 1043–1049 (2015).
176. Boyce, M. *et al.* A Selective Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science* **307**, 935–939 (2005).
177. Chun-Lei, L. *et al.* Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathwaySalubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway: Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathwaySalubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. *J. Geriatr. Cardiol.* **9**, 258–268 (2012).
178. Puthalakath, H. *et al.* ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* **129**, 1337–1349 (2007).
179. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916 (2005).

180. Sutandy, F. X. R., Gößner, I., Tascher, G. & Münch, C. A cytosolic surveillance mechanism activates the mitochondrial UPR. *Nature* **618**, 849–854 (2023).
181. Zou, Y. *et al.* Heat Shock Transcription Factor 1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* **108**, 3024–3030 (2003).
182. Neef, D. W., Turski, M. L. & Thiele, D. J. Modulation of Heat Shock Transcription Factor 1 as a Therapeutic Target for Small Molecule Intervention in Neurodegenerative Disease. *PLoS Biol.* **8**, e1000291 (2010).
183. Huang, C.-Y. *et al.* Doxorubicin attenuates CHIP-guarded HSF1 nuclear translocation and protein stability to trigger IGF-IIR-dependent cardiomyocyte death. *Cell Death Dis.* **7**, e2455–e2455 (2016).
184. Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F. & Burchill, S. A. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol. Med.* **15**, 369–379 (2009).
185. Romero-Becerra, R., Santamans, A., Folgueira, C. & Sabio, G. p38 MAPK Pathway in the Heart: New Insights in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7412 (2020).
186. Kumphune, S., Surinkaew, S., Chattipakorn, S. C. & Chattipakorn, N. Inhibition of p38 MAPK activation protects cardiac mitochondria from ischemia/reperfusion injury. *Pharm. Biol.* **53**, 1831–1841 (2015).
187. Yokota, T. & Wang, Y. p38 MAP kinases in the heart. *Gene* **575**, 369–376 (2016).
188. Meyer, B. A. & Doroudgar, S. ER Stress-Induced Secretion of Proteins and Their Extracellular Functions in the Heart. *Cells* **9**, 2066 (2020).
189. Fujii, J., Homma, T., Kobayashi, S. & Seo, H. G. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Biol. Chem.* **9**, 1–15 (2018).
190. Luan, Y. *et al.* Structure and Function of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAMs) and Their Role in Cardiovascular Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 1–19 (2021).

191. Lu, F., Langenbacher, A. & Chen, J.-N. Tbx20 drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish. *Dev. Biol.* **421**, 139–148 (2017).
192. Xiang, F., Guo, M. & Yutzey, K. E. Overexpression of Tbx20 in Adult Cardiomyocytes Promotes Proliferation and Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation* **133**, 1081–1092 (2016).
193. Cai, C.-L. *et al.* T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Development* **132**, 2475–2487 (2005).
194. Das, S. *et al.* ER stress induces upregulation of transcription factor Tbx20 and downstream Bmp2 signaling to promote cardiomyocyte survival. *J. Biol. Chem.* **299**, 103031 (2023).
195. Shen, T. *et al.* Tbx20 regulates a genetic program essential to adult mouse cardiomyocyte function. *J. Clin. Invest.* **121**, 4640–4654 (2011).
196. Grün, B. F. Untersuchungen zur Rolle der Integrated Stress Response, der Heat Shock Response und NRF2-vermittelter Mechanismen bei der Stressresistenz embryonaler Kardiomyoblasten gegenüber mitochondrialer Komplex-III-Inhibierung. (Universitätsklinikum Münster, 2020).
197. Sun, X. & Kaufman, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* **127**, 175–186 (2018).
198. van Rijnberk, L. M. *et al.* Endomitosis controls tissue-specific gene expression during development. *PLOS Biol.* **20**, e3001597 (2022).
199. Leone, M., Magadum, A. & Engel, F. B. Cardiomyocyte proliferation in cardiac development and regeneration: a guide to methodologies and interpretations. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **309**, H1237–H1250 (2015).
200. Ang, K.-L. *et al.* Limitations of conventional approaches to identify myocyte nuclei in histologic sections of the heart. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **298**, C1603–C1609 (2010).
201. Dittrich, G. M. *et al.* Fibroblast GATA-4 and GATA-6 promote myocardial adaptation to pressure overload by enhancing cardiac angiogenesis. *Basic Res. Cardiol.* **116**, 26 (2021).

202. Firulli, A. B. *et al.* Myocyte Enhancer Binding Factor-2 Expression and Activity in Vascular Smooth Muscle Cells: Association With the Activated Phenotype. *Circ. Res.* **78**, 196–204 (1996).
203. Otterbein, L. E., Foresti, R. & Motterlini, R. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival. *Circ. Res.* **118**, 1940–1959 (2016).
204. Maruhashi, T., Kihara, Y. & Higashi, Y. Bilirubin and Endothelial Function. *J. Atheroscler. Thromb.* **26**, 688–696 (2019).
205. Hull, T. D. *et al.* Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart. *JCI Insight* **1**, (2016).
206. Yet, S.-F. *et al.* Cardiac-Specific Expression of Heme Oxygenase-1 Protects Against Ischemia and Reperfusion Injury in Transgenic Mice. *Circ. Res.* **89**, 168–173 (2001).
207. Dey, S. *et al.* ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J. Clin. Invest.* **125**, 2592–2608 (2015).
208. Yuan, S. *et al.* ATF4-dependent heme-oxygenase-1 attenuates diabetic nephropathy by inducing autophagy and inhibiting apoptosis in podocyte. *Ren. Fail.* **43**, 968–979 (2021).
209. Novoa, I. *et al.* Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* **22**, 1180–1187 (2003).
210. Fan, F. *et al.* Deletion of heat shock protein 60 in adult mouse cardiomyocytes perturbs mitochondrial protein homeostasis and causes heart failure. *Cell Death Differ.* **27**, 587–600 (2020).
211. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur.* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-35997-2.
212. Popov, L. Mitochondrial biogenesis: An update. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 4892–4899 (2020).
213. Detmer, S. A. & Chan, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 870–879 (2007).

214. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* **62**, 341–360 (2018).
215. Neary, M. T. *et al.* Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **74**, 340–352 (2014).
216. Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* **337**, 1062–1065 (2012).
217. Rambold, A. S., Kostelecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10190–10195 (2011).
218. Kim, H. *et al.* Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Mol. Cell* **44**, 532–544 (2011).
219. Wai, T. *et al.* Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* **350**, aad0116 (2015).
220. Li, A., Gao, M., Jiang, W., Qin, Y. & Gong, G. Mitochondrial Dynamics in Adult Cardiomyocytes and Heart Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 584800 (2020).
221. Ashrafian, H. *et al.* A mutation in the mitochondrial fission gene Dnm1l leads to cardiomyopathy. *PLoS Genet.* **6**, e1001000 (2010).
222. Leonard, A. P. *et al.* Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 348–360 (2015).
223. Yin, W. *et al.* Rapidly Increased Neuronal Mitochondrial Biogenesis After Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Stroke* **39**, 3057–3063 (2008).
224. Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472 (2010).
225. Muller, F. L., Liu, Y. & Van Remmen, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 49064–49073 (2004).

226. Dey, S., Sidor, A. & O'Rourke, B. Compartment-specific Control of Reactive Oxygen Species Scavenging by Antioxidant Pathway Enzymes. *J. Biol. Chem.* **291**, 11185–11197 (2016).
227. Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* **48**, 158–167 (2012).
228. Madungwe, N. B., Zilberstein, N. F., Feng, Y. & Bopassa, J. C. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **6**, 93–108 (2016).
229. Li, N. *et al.* Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *J. Biol. Chem.* **278**, 8516–8525 (2003).
230. Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, M. & Kawanishi, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci.* **73**, 3277–3288 (2003).
231. Shattock, M. J. *et al.* Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart: Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J. Physiol.* **593**, 1361–1382 (2015).
232. Teruyo, A.-O., Matsui, H., Wakizaka, A. & Homareda, H. Mechanism Responsible for Oligomycin-induced Occlusion of Na⁺ within Na/K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 25604–25610 (1996).
233. Pinson, A., Zilberman, Y., Tirosh, R., Trembovler, V. & Shohami, E. High oligomycin concentrations augment 6-keto-PGF1 α production in ventricular cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1211**, 283–288 (1994).
234. Wu, S.-B. & Wei, Y.-H. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: Implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 233–247 (2012).
235. Chen, Y. *et al.* LDHA-mediated metabolic reprogramming promoted cardiomyocyte proliferation by alleviating ROS and inducing M2 macrophage polarization. *Redox Biol.* **56**, 102446 (2022).

236. Usategui Calderon, M., Gonzalez, B. A. & Yutzey, K. E. Cardiomyocyte-fibroblast crosstalk in the postnatal heart. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, 1163331 (2023).
237. Kofron, C. M. & Mende, U. *In vitro* models of the cardiac microenvironment to study myocyte and non-myocyte crosstalk: bioinspired approaches beyond the polystyrene dish: Cardiac *in vitro* models for myocyte and non-myocyte crosstalk. *J. Physiol.* **595**, 3891–3905 (2017).
238. Porrello, E. R. *et al.* Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science* **331**, 1078–1080 (2011).
239. Haubner, B. J. *et al.* Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **118**, 216–221 (2016).
240. Xu, X. *et al.* Uncompensated mitochondrial oxidative stress underlies heart failure in an iPSC-derived model of congenital heart disease. *Cell Stem Cell* **29**, 840-855.e7 (2022).
241. Lisa, F. D., Canton, M., Menabò, R., Kaludercic, N. & Bernardi, P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* **12**, 249–260 (2007).
242. Issan, Y. *et al.* Heme Oxygenase-1 Induction Improves Cardiac Function following Myocardial Ischemia by Reducing Oxidative Stress. *PLoS ONE* **9**, e92246 (2014).
243. Katori, M. *et al.* HEME OXYGENASE-1 OVEREXPRESSION PROTECTS RAT HEARTS FROM COLD ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY VIA AN ANTIAPOPTOTIC PATHWAY1: *Transplantation* **73**, 287–292 (2002).

12. Publikationsverzeichnis

Schraps N, Heger J, Reis A, Jux C, Drenckhahn JD. Fundamental Differences in Cell Survival and Molecular Stress Response in Embryonic Compared to Adult Cardiomyocytes Subjected to Mitochondrial Dysfunction. Thorac Cardiovasc Surg. 2022, doi: 10.1055/s-0042-1742955. (ausgezeichnet mit dem **Young Investigator Award** der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK) 2022)

Schraps N, Tirre M, Pyschny S, Reis A, Schlierbach H, Seidl M, Kehl HG, Schänzer A, Heger J, Jux C, Drenckhahn JD. Cardiomyocyte maturation alters molecular stress response capacities and determines cell survival upon mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med. 2024, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.01.034.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichte Schriften entnommen sind, und 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 Grunds.tze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grunds.tze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Ich habe in den letzten Jahren nicht nur viel gelernt und eine Vielzahl neuer Erfahrungen gesammelt, sondern habe vor allem auch eine riesengroße Menge an Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. Allen voran möchte ich mich für die Betreuung von Jörg Drenckhahn bedanken. Danke, dass ich so viel an theoretischem Wissen und praktischer Arbeit im Labor von Dir lernen durfte. Du hast es geschafft, mich mit deiner Begeisterung für die Forschung immer wieder aufs Neue anzustecken und zu motivieren. Der Einblick, den ich durch Dich in die Forschung gewinnen durfte, hat mich nicht nur während meiner Doktorarbeit begleitet, sondern auch bei meinen weiteren Forschungsprojekten, zu denen mich die Zusammenarbeit und die Zeit mit Euch im Labor ermutigt haben. Ein großes Dankeschön gilt außerdem Prof. Christian Jux für die Unterstützung, die Förderung und den stetigen Input. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, die nicht nur für eine lehrreiche Zeit gesorgt haben, sondern auch für eine, an die ich mich immer wieder gern zurückerinnern werde. Danke auch Ebru und Kirstin, für alles, was Ihr mir über die Arbeit im Labor beigebracht habt und an Philip und Paniz, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke Anna, dass Du dich auch über lange Nächte im Labor nie beschwert hast. Danke, dass ich mich bei allen Höhen und Tiefen immer an Euch wenden durfte.

Ein wahnsinnig großer Dank gilt zudem meinen Eltern. Mit eurer Geduld, euren Ermutigungen, eurer Investition in uns ist jeder Erfolg, den ich erziele, auch eurer. Ihr seid meine größten Vorbilder und meine größten Unterstützer. Dafür werde ich Euch nie genug danken können. Danke an meine Schwester Taina. Wir wissen beide, solche Texte zu schreiben gehört viel mehr zu deinen Stärken. Umso mehr möchte ich Dir hier Danke sagen – dafür, dass ich weiß, ich habe mit Dir jemanden an meiner Seite, auf den ich immer zählen kann. Danke für Dein offenes Ohr, Deine Unterstützung und Deinen stets guten Rat.

Danke auch an meine Freunde, die mich seit Kindestagen begleiten und mich auch nach vielen Jahren in einer anderen Stadt nicht vergessen haben. Und danke an meine neuen Freunde in Gießen – allen voran an Nora. Wenn ich an die Zeit in Gießen denke, denke ich zuerst einmal an Dich. Deine Freundschaft hat mich durch lange Nächte in der Bibliothek gebracht und die Zeit in Gießen unvergesslich gemacht.

Abschließend möchte ich mich auch bei allen bedanken, die ich nicht namentlich erwähnt habe, deren Unterstützung jedoch ebenso wichtig für mich war.

