

**Bedeutung von BACE1 und UCP2 für den Metabolismus
des Skelettmuskels**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Richter, Clara Christiane
aus Heidelberg

Gießen (2026)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachterin: Prof. Dr. Lips

Tag der Disputation: 20.08.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau des Skelettmuskels.....	1
1.1.1 Muskelfasertypen.....	5
1.2 Metabolismus des Skelettmuskels / myozytärer Energiestoffwechsel	7
1.3 Pathophysiologische Veränderung des Skelettmuskels (Muskelatrophie).....	9
1.4 Einfluss des oxidativen Stresses.....	9
1.4.1 Ätiologie und Folgen des oxidativen Stresses	10
1.4.2 Myozytäre exogene Regulation des oxidativen Stresses.....	13
1.4.3 Myozytäre endogenen Regulation des oxidativen Stresses	13
1.5 Die Bedeutung des Bluthochdruckes für die Skelettmuskulatur.....	14
1.5.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie einer Hypertonie.....	15
1.5.2 Pathophysiologische Folgen einer Hypertonie.....	16
1.6 Die Rolle der Entkopplerproteine (UCP) für die Funktion und den Metabolismus des Skelettmuskels	17
1.6.1 Entkopplerproteine	17
1.6.2 Myozytäre Expression von UCP2	18
1.6.3 Potentielle Rolle von UCP2 auf den Metabolismus des Skelettmuskels	19
1.7 Der Stellenwert der Beta-Sekretase (BACE) für die Funktion und den Metabolismus des Skelettmuskels	20
1.7.1 Beta-Sekretase (BACE).....	20
1.7.2 Myozytäre Expression von BACE1	22
1.7.3 Potentielle Rolle von BACE1 auf den Metabolismus des Skelettmuskels.....	22
1.8 Versuchstiere	24
1.8.1 Wistar Hannover und spontan hypertensive Ratten.....	24
1.8.2 Pharmakoinduzierter Hypertonus mittels N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	25
1.8.3 UCP2-Knockout Ratten	26
1.9 Arbeitshypothese.....	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	29

2.1.3	Geräte.....	30
2.1.4	Softwares	32
2.1.5	Small interfering RNA.....	33
2.1.6	Antikörper.....	33
2.1.7	Primer	35
2.1.8	Gewebeproben.....	37
2.1.9	AC16-Zellen.....	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	In-vitro-Untersuchungen an AC16-Zellen	39
2.2.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	46
2.2.3	Histologische Arbeitsmethoden	50
2.2.4	Statistische Auswertung	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Genexpression im Skelettmuskel adulter Ratten.....	53
3.1.1	Vergleich der basalen Genexpression im Typ I- und II-Skelettmuskel	53
3.1.2	Auswirkungen einer spontanen Hypertension auf den Skelettmuskel adulter Ratten	54
3.1.3	Auswirkungen einer UCP2-Deletion auf den Skelettmuskel adulter Ratten.....	58
3.1.4	Auswirkungen einer L-Name-Gabe auf den Skelettmuskel adulter Ratten	63
3.1.5	Posttranskriptionelle Regulation von BACE1 im Skelettmuskel adulter Ratten	66
3.2	Auswirkungen von UCP2 spezifischer siRNA auf AC16-Zellen	68
4	Diskussion.....	72
4.1	In-vivo Modelle zur Regulation der myozytären UCP2-Expression	72
4.1.1	Charakterisierung der UCP2-Expression im Skelettmuskel adulter Ratten	72
4.1.2	Spontan hypertensive Ratten.....	74
4.1.3	UCP2-Deletion	77
4.1.4	L-Name induzierte Hypertonie im Rattenmodell	81
4.2	Zwischenfazit.....	85
4.3	In-vitro Modell zur Regulation der UCP2-Expression	87
4.3.1	Herabregulation der BACE1-mRNA sowie posttranskriptionelle Reduktion von BACE1 infolge einer Suppression der UCP2-Translation	88
4.4	Fazit.....	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Summary.....	94

7	Abkürzungsverzeichnis	96
8	Abbildungsverzeichnis	99
9	Tabellenverzeichnis	100
10	Literaturverzeichnis	101
11	Anhang.....	120
11.1	Ehrenwörtliche Erklärung.....	120
12	Danksagung.....	121

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des mitochondrialen Entkopplerproteins UCP2 und der Beta-Sekretase (BACE1) für den Stoffwechsel des Skelettmuskels untersucht. In den folgenden Kapiteln wird deshalb einleitend zunächst der Aufbau und Metabolismus der Skelettmuskulatur detailliert beschrieben. Dann werden sowohl der Einfluss des oxidativen Stresses und einer Hypertonie auf die Skelettmuskulatur, als auch die Funktionen von UCP2 und BACE1 im Kontext des Skelettmuskelstoffwechsels näher beleuchtet.

1.1 Aufbau des Skelettmuskels

Die Grundlagen des Aufbaus und der Funktion des Skelettmuskels sind heute gut bekannt und Gegenstand der Lehrbücher. Die hier dargestellten Zusammenhänge sind den folgenden Lehrbüchern entnommen: „Physiologie“ von Pape et al. (Hg.) 2023, „Physiologie hoch2“ von Gründer und Schlüter (Hg.) 2023, „Biochemie“ von Müller-Esterl (Hg.) 2011, „Physiologie des Menschen“ von Brandes et al. (Hg.) 2019.

Der Aufbau des Skelettmuskels ist charakterisiert durch zahlreiche Faszikel, die sich aus Muskelfasern zusammensetzen. Die Bildung einer Muskelfaser kommt durch eine Fusion vieler undifferenzierter Muskelzellen zustande, welche eine vielkernige Riesenzelle bilden. Diese ist vom Sarkolemm, der elektrisch erregbaren Zellmembran der Muskelzelle, umgeben. Das Zytoplasma der Muskelfaser zeichnet sich durch parallel zur Muskellängsachse angeordnete Myofibrillen aus. Diese bilden in sich wiederholenden Segmenten Sarkomere, in welchen die Kontraktion also die Verschiebung der Myosinfilamente gegen die Aktinfilamente stattfinden und durch welche die lichtmikroskopisch sichtbare, charakteristische Querstreifung zustande kommt. (Brandes et al. 2019, S. 131–148; Müller-Esterl 2011, S. 117–118) Die Sarkomere setzen sich vor allem aus den zentralen, dicken Myosinfilamenten, welche an der Mittel-Linie (M-Linie) fixiert sind, den lateralen, dünnen Aktinfilamenten, welche wiederum an der Z-Scheibe fixiert sind, und dem zur Stabilisierung beitragenden Riesenmolekül Titin zusammen. Mithilfe von Dystrophiekomplexen sind die Sarkomere mit der extrazellulären Matrix und dem Sarkolemm verbunden. (Pape et al. 2023, S. 141–145)

Die Aktinfilamente setzen sich aus globulären Aktinmonomeren - sogenanntem G-Aktin - zusammen, die sich in einer doppelsträngigen Helix umeinander verdrillen und das sogenannte F-Aktin bilden. Das in der Z-Scheibe über α -Aktinin verankerte Ende der Aktinfilamente ist als Pluspol definiert, während das ins Sarkomer ragende Ende den Minuspol

darstellt. (Gründer und Schlüter 2023, S. 88) Der Bereich um die helikalen Längsrillen der Aktinfilamente ist von den Regulatorproteinen Tropomyosin und einem Troponinkomplex umgeben. Der Troponinkomplex setzt sich wiederum aus der Ca^{2+} -bindenden Untereinheit (UE) Troponin C, der Troponinmysosin-assoziierten UE Troponin T und der inhibitorischen UE Troponin I zusammen. (Pape et al. 2023, S. 141–145)

Die Myosinfilamente setzen sich aus bis zu 150 Myosinkomplexen zusammen, die wiederum jeweils aus zwei schweren (MHC) und vier leichten (MLC) nicht-kovalent aneinander gelagerten Ketten bestehen. Die beiden schweren, α -helikal umeinander gewundenen Ketten werden vom N- bis zum C-Terminus in drei wesentliche Abschnitte mit unterschiedlichen Aufgabenbereichen unterteilt. Der am N-Terminus lokalisierte Kopfbereich weist eine ATPase-Aktivität auf und bindet während eines Querbrückenzyklus vorübergehend an Aktin. Der mittig gelegene Halsbereich dient als Kraftarm, welcher über einen Konverter in der katalytischen Domäne verankert ist. Hier befinden sich die angelagerten MLC, die sich aus einer näher am Kopf befindlichen (proximal), essenziellen Untereinheit (UE) zur Stabilisierung der einwirkenden Kräfte und einer weiter vom Kopf entfernten (distal), regulatorischen UE zur Regulation der Kräfte zusammensetzt. Der am C-Terminus lokalisierte Schwanzbereich interagiert mit Myosinmolekülen und bildet so im Bereich der M-Linie zwei mit entgegengesetzter Polarität ausgerichtete Makromolekülkomplexe, welche zusammen als dickes Filament des Sarkomers bezeichnet werden.

Kopf- sowie Halsbereich werden auch als schweres Meromyosin (HMM) und der Schwanzbereich wird als leichtes Meromyosin (LMM) zusammengefasst. (Gründer und Schlüter 2023, S. 85–100; Müller-Esterl 2011, S. 117–119)

Das Sarkomer des Skelettmuskels wird zudem in sog. Banden unterteilt. Die anisotrope Bande (A-Bande) beinhaltet den gesamten Bereich der Myosinfilamente, den im entspannten Zustand überlappenden Bereich der Aktin- und Myosinfilamente, den Bereich ohne Überlappung der Filamente (H-Zone) und den zentralen Bereich, in welchem die Myosinfilamente an Myomesin binden (M-Linie). Die I-Bande, umfasst den Bereich, in dem ausschließlich Aktinfilamente lokalisiert sind, einschließlich der Z-Scheibe, an der das Aktin an α -Aktinin bindet. (Pape et al. 2023, S. 141–145)

Des Weiteren inkludiert das Sarkomer weitere, am Aufbau beteiligte akzessorische Proteine. Das Riesenmolekül Titin erstreckt sich über die gesamte Länge des Sarkomers. Die aneinandergereihten Fibronectin- und immunglobulinähnlichen Domänen reichen von der Z-Scheibe, an der Titin mittels Telethonin und α -Aktinin verankert ist, bis zur M-Linie und interagieren dabei mit den dicken Filamenten. Titin dient zum einen als molekulare Feder zur Stabilisierung und Rückstellfähigkeit der dicken Filamente bzw. des Sarkomers. Außerdem

weist es Phosphorylierungsstellen auf, die der Regulation der Funktion des Sarkomers dienen. (Gründer und Schlüter 2023, S. 85–90; Müller-Esterl 2011, S. 118)

Nebulin kann an bis zu 200 Aktinmonomere binden und trägt so zum einen zur Stabilisierung der Ausrichtung des Sarkomers bei und hemmt zum anderen die Ca^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität des Myosins. Desmin ist für den Aufbau der Z-Scheibe von Relevanz, da es die Ausrichtung der α -Aktinins beeinflusst. (Gründer und Schlüter 2023, S. 85–90; Müller-Esterl 2011, S. 118)

Das Protein α -Aktinin ist auch für die Organisation der Myofibrillen zuständig, indem es die Enden zweier Aktinfilamente von aneinandergrenzenden Sarkomeren überbrückt. (Müller-Esterl 2011, S. 118)

Der Querbrückenzyklus, die Interaktion zwischen Aktinfilament und Myosinkopf, stellt die molekulare Voraussetzung für die Muskelkontraktion dar. Dieser läuft mittels einer ATP-Hydrolyse ab, welche durch das Motorprotein Myosin induziert wird. Bindet ATP an das aktive Zentrum eines Myosinkopfes, wird die hochaffine Bindung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament unterbrochen. Durch die darauffolgende Spaltung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat, wird der Konverter und der darin verankerte Kraftarm umgeklappt, sodass die katalytische Domäne Richtung Z-Linie an ein neues Aktinmonomer verschoben wird. Dementsprechend findet eine Vergrößerung des Winkels zwischen Myosinkopf und -schwanz statt, wodurch sich wiederum die MHC federähnlich spannt. Danach bindet der Myosinkopf mit einer niedrigen Affinität an Aktin. Erst in Folge von strukturellen Umlagerungen am Myosinkopf nimmt die Bindung einen hochaffinen Charakter an. Nachdem der Kraftarm und der Konverter umorientiert wurden sowie das anorganische Phosphat abdissoziiert, verschieben sich die Aktin- und Myosinfilamente um ca. 6 - 8 nm gegeneinander. Dies stellt den ersten Teilschritt des Kraftschlages dar, während der zweite Teilschritt des Kraftschlages durch die Abdissoziation des ADPs indiziert wird. Folglich werden die Aktin- und Myosinfilamente durch ein weiteres Umklappen des Kraftarmes und des Konverters um weitere 2 - 4 nm gegeneinander verschoben. Anschließend befindet sich der Myosinkopf erneut im Bereich des aktiven Zentrums in einem nukleotidfreien Zustand, wobei er weiterhin hochaffin an Aktin gebunden ist und bereit für die nächste Bindung eines ATP-Moleküls ist. Sofern genügend ATP vorhanden ist, kann der Querbrückenzyklus beliebig oft erneut starten. Dementsprechend bedarf es der elektromechanischen Kopplung, die dem Aktionspotential am Sarkolemm und dem Querbrückenzyklus zwischengeschaltet ist. (Pape et al. 2023, S. 146–147; Gründer und Schlüter 2023, S. 85)

Das am Sarkolemm an der neuromuskulären Endplatte gebildete Endplattenpotenzial löst eine schnelle Öffnung der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle und der damit verbundenen

Depolarisation aus. Die Repolarisation erfolgt primär durch die Inaktivierung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle und den Ausstrom von K^+ über spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle. Zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und zur elektrischen Dämpfung tragen die hohe Cl^- -Leitfähigkeit über Cl^- -Kanäle, K^+ -Einwärtsgleichrichter und die Na^+ - K^+ -ATPase bei. (Brandes et al. 2019, S. 137)

Das Aktionspotential wird mittels röhrenförmiger Einstülpungen, den transversalen Tubuli, des Sarkolemm weitergeleitet. Die transversalen Tubuli wiederum stehen in jedem Sarkomer in Kontakt mit dem longitudinalen System sowie mit zwei terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, das Ca^{2+} -Ionen innerhalb seines Membransystemes im Intrazellularraum speichert. Dabei bilden im Längsschnitt ein transversaler Tubulus und zwei beidseits angeordnete terminale Zisternen eine Triade. Innerhalb der Triaden weisen die transversalen Tubuli spezifische Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) auf, die als spannungsgesteuerte Sensoren fungieren. Die in der Membran des transversalen Tubulus lokalisierte Untereinheit DHPR- $\alpha 1\text{S}$ und die im Zytosol lokalisierte Untereinheit DHPR- $\beta 1\text{a}$ übertragen durch ihre molekulare Umlagerung das Signal an die in der Membran der terminalen Zisternen lokalisierten, und den Spalt zwischen terminalen Zisternen und transversalen Tubuli überbrückenden Ryanodinrezeptoren (RyR1). Diese sind Ca^{2+} -Kanäle. Durch die mechanische Kopplung kommt es zur Öffnung der RyR1 und der damit verbundenen Freisetzung von gespeicherten Ca^{2+} -Ionen aus der terminalen Zisterne in das Sarkoplasma. In Folge der regelmäßigen Anordnung von DHPR und RyR1 ist elektronenmikroskopisch eine Verdichtung - sog. junctional feet - zu erkennen. (Pape et al. 2023, S. 149–151; Dulhunty et al. 2017)

Der Ca^{2+} -abhängige Querbrückenzyklus wird mittels der an die Aktinfilamente angelagerten Regulatorproteine Tropomyosin und des Troponinkomplexes reguliert. Die Ca^{2+} -bindende Untereinheit (UE) Troponin C weist 4 Bindungsstellen auf, von denen jeweils zwei erst bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $> 10^{-7} \text{ mol/l}$ belegt werden können und dadurch eine hochaffine Bindung des Myosinkopfes mit dem Aktinfilament ermöglichen. Dementsprechend können bei geringerer Konzentration ($< 10^{-7} \text{ mol/l}$) nur zwei Bindungsstellen besetzt werden, sodass nur eine niederaffine Bindung möglich ist, in welcher der Myosinkopf mit dem Spaltprodukt ADP und anorganischem Phosphat beladen ist. Dadurch bleibt der weitere Querbrückenzyklus aus. Erst bei Erreichen der Schwellenkonzentration von Ca^{2+} gibt Tropomyosin die zwei weiteren Bindungsstellen frei, wodurch zwei weitere Ca^{2+} -Ionen an die Troponin C UE binden können. Infolgedessen ändert der Troponinkomplex dann seine Konformation, Tropomyosin lagert sich auf dem Aktinfilament um und der Myosinkopf kann eine hochaffine Bindung mit dem Aktinfilament eingehen. (Pape et al. 2023, S. 146–147)

Mittels einer in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisierten Ca^{2+} -ATPase

(SERCA) werden zwei Ca^{2+} -Ionen unter Verbrauch von ATP bis Erreichen einer Konzentration von 1 mmol/l in das longitudinale System zurückbefördert. Fällt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erneut unter 10^{-7} mol/l ab, dissoziiert Ca^{2+} von Troponin C. Dadurch lagert sich Tropomyosin wieder zurück, blockiert zwei der vier Bindungsstellen und stoppt den in der hochaffinen Bindung stattfindenden Abschnitt des Querbrückenzyklus. Aufgrund einer Abdissoziation von ADP und der anschließenden Bindung von ATP am Myosinkopf, wird die hochaffine Bindung aufgehoben und es kommt zur Senkung der aktiven Muskelkraft. (Brandes et al. 2019, S. 136–138; Pape et al. 2023, S. 150–151)

In Folge der koordinierten Verkürzung seriell und parallel angeordneter Sarkomere wird die Kraft eines einzelnen Sarkomers in eine effiziente Gesamtmuskelkraft umgewandelt. Dieser Prozess beruht auf der teleskopartigen Bewegung der Aktinfilamente, die durch die Motoraktivität des Kopf- sowie Halsbreiches des Myosins (HMM) induziert wird. Aufgrund der Verankerung der Aktinfilamente in den Z-Scheiben, kommt es zu einer Verringerung ihres Abstandes der Z-Scheiben und der damit verbundenen Verkürzung des gesamten Sarkomers. Die dabei entstehende Zugkraft wird über die Membran weitergeleitet und schließlich an die extrazelluläre Matrix übertragen. (Gründer und Schlüter 2023, S. 85)

1.1.1 Muskelfasertypen

Das Muskelgewebe lässt sich auf der Grundlage physiologischer, morphologischer sowie molekularbiologischer Eigenschaften in drei primäre Fasertypen unterteilen: die langsamen Typ I-Fasern sowie die schnell kontrahierenden Typ IIA- und Typ IID-Fasern. Die Fasern unterscheiden sich in Bezug auf die Aktivität von oxidativen und glykolytischen Enzymen, die Anzahl der Mitochondrien sowie den Myoglobingehalt. (Brandes et al. 2019, S. 146–148)

Das in den Myozyten vorkommende Myoglobin kann ähnlich zu Hämoglobin Sauerstoff binden, wobei die Myoglobinkonzentration maßgeblich die Färbung der Muskelfasern bestimmt. Während die Typ IID-Fasern mit niedrigem Myoglobingehalt hell erscheinen, weisen Typ I- sowie Typ IIA-Fasern mit hohem Myoglobingehalt eine ausgeprägte rötliche Färbung auf. Skelettmuskeln bestehen stets aus mehreren Fasertypen - sog. Hybridfasern -, wobei deren jeweilige Verteilung von der spezifischen Funktion des Muskels abhängt, eine Anpassungsfähigkeit an verschiedene Belastungsarten ermöglicht und somit maßgeblich das Kontraktionsverhalten des Muskels bestimmen. (Brandes et al., 2019, S.147-148)

1.1.1.1 Typ I-Fasern

Skelettmuskulatur, die vorwiegend aus Typ I-Fasern besteht, wie beispielsweise der Musculus soleus, ist für langanhaltende, ausdauernde Belastungen optimiert und zeichnet sich aufgrund des hohen Myoglobingehaltes durch eine hohe oxidative Kapazität aus. Im M. soleus überwiegen dünne Muskelfasern, die an der I-Bande lokalisierte, stark entwickelte, rostartige Mitochondrienplatten aufweisen und miteinander in Verbindung stehen. Dadurch kann ein zusammenhängendes Gefüge aus Mitochondrien gebildet werden. Dementsprechend weisen langsame Typ I-Fasern eine hohe Dichte an Mitochondrien auf. Dies begünstigt eine effiziente ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung. Aufgrund ihrer Myosin-Isoform und der damit verbundenen niedrigen Myosin-ATPase-Aktivität wird jedoch weniger ATP pro Zeiteinheit gespalten. Zudem sind sie durch ein gut entwickeltes Kapillarnetzwerk mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, was ihre Eignung für langandauernde, ausdauerorientierte, aerobe Aktivitäten prädestiniert. Des Weiteren sind nur in den dünnen Fasern histologisch Triglyzeridtropfen nachzuweisen. (Schmalbruch 1967; Brandes et al. 2019, S. 146–147)

1.1.1.2 Typ II-Fasern

Im Gegensatz dazu dominieren in schnell kontrahierenden Muskeln, wie beispielsweise im Musculus gastrocnemius, Typ II-Fasern. Diese Fasern ermöglichen schnelle, kraftvolle Muskelkontraktionen durch eine Tetanisierbarkeit bei hoher Reizfrequenz. Des Weiteren sind sie auf eine im Zytosol stattfindenden, anaerobe, glykolytische ATP-Produktion spezialisiert. Folglich überwiegen im M. gastrocnemicus dicke Muskelfasern, die an den I-Bänder lokalisierte, gering entwickelte, siebartige Mitochondrienplatten aufweisen.

Innerhalb der Typ II-Fasern existieren weitere funktionelle Differenzierungen: Typ IIA-Fasern sind auf Ausdauerleistungen ausgelegt, während Typ IID-Fasern für sehr schnelle Bewegungen und kurzfristige, intensive Belastungen konzipiert sind. Beide weisen aufgrund ihrer Myosin-Isoform eine hohe Myosin-ATPase-Aktivität auf. Die ATP-Produktion in Typ II-Fasern ist primär anaerob und erfolgt überwiegend über glykolytische Prozesse, was eine schnelle, jedoch ineffiziente Bereitstellung von Energie für kurze, intensive Belastungen ermöglicht, wobei eine Laktatakkumulation und ein damit verbundener pH-Abfall begünstigt wird. (Schmalbruch 1967; Brandes et al. 2019, S. 146–147)

1.2 Metabolismus des Skelettmuskels / myozytärer Energiestoffwechsel

Die Skelettmuskulatur übernimmt neben der grundlegenden Funktion der Fortbewegung und der Thermogenese eine entscheidende Rolle für das Stoffwechselgleichgewicht des gesamten Körpers. Sie macht unter physiologischen Bedingungen 40 % der Körpermasse aus und trägt dementsprechend signifikant zum Grundumsatz bei. (Brandes et al. 2019, S. 132; Zurlo et al. 1990)

Darüber hinaus beeinflusst die Skelettmuskulatur wesentlich die Energiespeicherung und den Energieverbrauch des Organismus. Aufgrund ihrer Interaktion mit dem endokrinen System und ihrer Fähigkeit, auf metabolische Signale zu reagieren, trägt die Skelettmuskulatur wesentlich zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und der Insulinempfindlichkeit bei. Ihre Rolle als Zentrum der Glukoseverwertung und Fettoxidation macht sie zu einem wichtigen Akteur im Energiehaushalt des Körpers und in der Regulation von Stoffwechselprozessen. Pathologische Dysfunktionen dieser Prozesse können zu Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Adipositas führen. (Heinrich et al. 2022, S. 579-580, S. 1061)

Der Metabolismus des Skelettmuskels ist äußerst komplex und wird von einer Vielzahl von molekularen Mechanismen reguliert. Diese beinhalten sowohl katabole als auch anabole Prozesse, die durch hormonelle, enzymatische und metabolische Signale gesteuert werden. Insbesondere die Regulation der Mitochondrienfunktion und die Fähigkeit des Muskels, zwischen verschiedenen Energiequellen zu wechseln, sind hinsichtlich der Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels und der Anpassung an unterschiedliche physiologische Anforderungen von bedeutender Rolle. (Heinrich et al. 2022, S. 1059–1063)

Für die Stoffwechselleistung von wesentlicher Bedeutung ist dabei ATP, welches die Energiequelle für die Myosin-ATPase sowie für die im Sarkolemm und im SERCA befindlichen Ionenpumpen darstellt (Westerblad et al. 2010).

Aufgrund der hohen Umsatzrate bzw. der Qualitätskontrolle der Muskelproteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System, liegt im Vergleich zu anderen Zellen ein höherer Energiebedarf vor. Dies ist wegen der mechanischen Beanspruchung sowie der bei dem Stoffwechsel freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies nötig, um geschädigte Proteine zu eliminieren und durch neu synthetisierte zu ersetzen. Die im Sarkoplasma und in den Mitochondrien lokalisierte Produktion von ATP ist im Wesentlichen vom Funktionszustand des Muskels abhängig und lässt sich in drei verschiedene, zeitlich gestaffelte Mechanismen unterteilen: die mitochondriale Kreatinkinase-Reaktion, anaerobe Glykolyse sowie die aerobe Oxidation von Glukose, Fettsäuren und z.T. Aminosäuren. (Heinrich et al. 2022, S. 1059)

Die schnelle Überbrückung der Energieversorgung ist wiederum mittels Übertragung eines energiereichen Phosphats des in den Myozyten gespeicherten Phosphokreatins für die Rephosphorylierung von ADP möglich. Dies ist vor allem in den ersten Sekunden der Muskelkontraktion von Bedeutung. Liegt bereits eine hohe ATP-Konzentration vor oder befindet sich der Muskel in der Erholungsphase, findet mittels mitochondrialer Kreatinkinase eine Phosphorylierung von Kreatin zur Phosphokreatin statt. Folglich übersteigt die Phosphokreatinkonzentration im relaxierten Muskel die des ATPs. Zudem ist eine rasche Energieversorgung mittels Adenylatkinase, die sog. Myokinase, möglich. Diese ist von Bedeutung, wenn der steigende Energiebedarf nicht durch die ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung oder die Glykolyse gedeckt werden kann. Dabei wird das gebildete ADP von ATP-verbrauchenden Reaktionen als direkte Energiequelle zur Bildung von ATP + AMP verwendet. (Heinrich et al. 2022, S. 1060)

Fällt die Phosphokreatinkonzentration ab, wird die erforderliche ATP-Konzentration in Abhängigkeit der prädominierenden Muskelfasertypen mit Hilfe anaerober Glykolyse oder mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung gewährleistet (Heinrich et al. 2022, S. 1061). Die anaerobe Glykolyse führt im Zuge der ATP-Synthese zur Bildung von Protonen, wodurch der intrazelluläre pH-Wert sinkt und eine metabolische Azidose entsteht. Dieser Zustand ist mit einer Einschränkung der Muskelfunktion, der Wahrnehmung von Erschöpfung sowie Schmerzempfindungen assoziiert. Während der initialen Phase körperlicher Belastung, erfolgt die Bereitstellung metabolischer Energie hauptsächlich durch den Abbau von muskulärem Glykogen sowie muskulären Triacylglycerinen. Bei länger andauernder Belastung ist jedoch zunehmend eine Substratzufuhr über das Blutplasma erforderlich, da die intrazellulären Energiespeicher sukzessive erschöpft werden. Neben freien Fettsäuren aus dem Plasma stellt insbesondere die blutzirkulierende Glukose eine essenzielle Energiequelle dar. Der Import von Glukose in die Myozyten erfolgt über den sarkolemmalen, insulinabhängigen Glukosetransporter GLUT4 und dem insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT1. Die Translokation von GLUT4 kann sowohl durch Insulin als auch durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) induziert werden und ist hauptsächlich für den basalen Glukosetransport verantwortlich. GLUT1 ist vor allem bei der durch Überlastung induzierten Glukoseaufnahme und dem damit verbundenen fallendem Insulin von Relevanz. Bei anhaltend hohem Glukosebedarf der Muskulatur wird die hepatische Glykogenolyse aktiviert, um die Blutglukosekonzentration aufrechtzuerhalten. Ein vollständiger Verbrauch der hepatischen Glykogenspeicher kann zu einer Hypoglykämie führen, die wiederum mittels kontinuierlicher exogener Zufuhr von Kohlenhydraten unterbunden werden kann. (Heinrich et al. 2022, S. 1062; McMillin et al. 2017)

Unter Bedingungen maximaler muskulärer Belastung reicht die Verfügbarkeit von Sauerstoff nicht aus, um eine vollständige oxidative Verwertung der Glukose zu gewährleisten. Folglich

findet ein verstärkter anaerober Stoffwechsel statt, bei dem Glukose durch die anaerobe Glykolyse zusätzlich zu Laktat abgebaut wird. Das dabei entstandene Laktat wird über die Blutbahn abgegeben und in der Leber mit Hilfe der Gluconeogenese in Glukose umgewandelt. Diese kann anschließend erneut zur ATP-Synthese für die Muskelkontraktion genutzt werden (Cori-Zyklus). (Heinrich et al. 2022, S. 1062)

1.3 Pathophysiologische Veränderung des Skelettmuskels (Muskelatrophie)

Übersteigt über einen längeren Zeitraum der Abbau von Muskeleiweißen die Rate der Proteinsynthese, führt dies zur Muskelatrophie, die mit einer Reduktion der Muskelkraft einhergeht. Eine fortschreitende Atrophie kann unter anderem durch Immobilisierung, Nahrungsentzug, Denervierung oder altersbedingte physiologische Veränderungen hervorgerufen werden. (Brandes et al. 2019, S. 142)

Im Zuge der altersassoziierten Sarkopenie kommt es zu einer Degeneration motorischer Einheiten infolge der gestörten neuromuskulären Interaktion, einer Verringerung der Muskelzellgröße und -anzahl sowie einer zunehmenden Substitution von Muskelgewebe durch Fett- und Bindegewebe. (Brandes et al. 2019, S. 142)

Im Gegensatz dazu entsteht eine Kachexie bei unveränderten oder verringerten Fettmasse durch einen erhöhten Muskelproteinabbau sowie eines erhöhten Gesamtenergieverbrauchs (Dunne et al. 2019). Dies geht mit einem massiven Verlust an Skelettmuskelmasse einher und tritt häufig in fortgeschrittenen Stadien maligner Erkrankungen auf. Meist sind die Patienten jedoch gleichzeitig sarkopenisch (Wang et al. 2025). Bei einer vorliegenden Sarkopenie - als Teil kachektischer Zustände - ist v.a. bei gleichzeitiger Herzinsuffizienz die genetische Expression des B-Typ natriuretischen Peptid (BNP) im Skelettmuskel erhöht (Prokopidis et al. 2024). BNP wird primär im Herzen produziert und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Flüssigkeitshaushalts und des Blutdrucks (Prokopidis et al. 2024).

1.4 Einfluss des oxidativen Stresses

Bei einer Hypertonie tritt aufgrund verstärkter intravasaler Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Zunahme des oxidativen Stresses innerhalb der Gefäßwand auf (Somers et al. 2000; Nakazono et al. 1991). Die schädigenden Effekte der ROS sind jedoch nicht auf vaskuläre Strukturen limitiert. Vielmehr kann eine übermäßige ROS-Konzentration

dazu führen, dass angrenzende Gewebekompartimente und Organe - wie die Skelettmuskulatur - beeinträchtigt werden können.

Aufgrund dessen wurde in dieser Promotionsarbeit der Zusammenhang eines Hypertonus und oxidativen Stresses sowie die damit assoziierten Auswirkungen des oxidativen Stresses auf den Skelettmuskel untersucht.

1.4.1 Ätiologie und Folgen des oxidativen Stresses

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) respektive reaktiver Stickstoffspezies (RNS) und der antioxidativen Kapazität des Körpers (Sies und Cadenas 1985; Di Lian et al. 2022).

Zu den ROS zählen Sauerstoff-Radikale, die eine hohe oxidative Reaktionsfreudigkeit aufweisen. Dazu gehören die Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2$), sehr reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$). (Valko et al. 2007)

ROS entstehen im Rahmen verschiedener enzymatisch katalysierter Prozesse, die sowohl unter physiologisch zellulären Bedingungen als auch infolge einer Hypoxie auftreten können. Die wesentliche Entstehung der intrazellulären Bildung von Superoxidanionen ist auf die Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zurückzuführen, welche aufgrund einer Autooxidation reduzierter Intermediate oder physikalisch durch UV-, Gamma- sowie Röntgen-Strahlung bedingt sein kann. Des Weiteren tragen die Nebenreaktion des Cytochrom P_{450} sowie der Komplexe I und III der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung der Superoxidanionen bei. Ca. 1-3 % des aufgenommenen molekularen Sauerstoffs werden dabei in Superoxidanionen umgewandelt, wobei die Superoxidkonzentration in direktem Zusammenhang mit dem intrazellulären Sauerstoff-Partialdruck steht. Darüber hinaus entstehen Superoxidanionen in Leukozyten und vaskulären Endothelzellen aufgrund zelltypspezifischer Isoformen der NADPH-Oxidasen, welche wiederum durch verschiedene Stimuli wie Angiotensin II oder mechanische Dehnung infolge erhöhten transmuralen Drucks eine gesteigerte Aktivität in Endothelzellen aufweisen können. Die Entstehung des im Vergleich zu den Superoxidanionen weniger reaktiven Wasserstoffperoxid ist auf das Produkt von zwei Superoxidanionen unter Verbrauch von zwei Protonen zurückzuführen. Diese Reaktion wird maßgeblich durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert, welches in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten in Form spezifischer Isoenzyme lokalisiert ist - unter anderem im Zytoplasma sowie in den Mitochondrien. (Heinrich et al. 2022, S. 332–333; Sies und Cadenas 1985; Brandes et al. 2019, S. 374)

Das Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) ist hoch reaktiv (Pastor et al. 2000). Es wird bei der Fenton-Reaktion, einer Spaltung von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Fe^{2+} in ein Hydroxylanion

sowie ein Hydroxylradikal gebildet (Smith et al. 1990).

Ein Übermaß an freien Radikalen kann entweder durch eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder durch eine verminderte Wirksamkeit endogener, antioxidativer Redoxpuffer entstehen. Dabei übersteigt die durch die ROS ausgelöste Belastung die Fähigkeit des Organismus, diese effektiv zu neutralisieren, wodurch es zu einer pathologisch erhöhten Konzentration dieser kommt (Sies 1997) .

Infolge dieses Ungleichgewichtes und des damit verbundenen, zellulären Stresses werden sowohl einzelne Zellen als auch komplexe Gewebestrukturen durch oxidative Prozesse geschädigt. Dies betrifft vor allem Makromoleküle wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren. (Halliwell 1987; Orrenius et al. 1989)

Die daraus resultierende oxidative Degeneration führt u.a. zur Denaturierung von Proteinen, zur Lipidperoxidation und zur Destabilisierung der DNA, was wiederum eine Vielzahl biologischer Funktionen beeinträchtigt und pathophysiologischer Zustände auslösen kann. Folglich werden enzymatische Aktivitäten inhibiert, die Integrität der Zellmembran wird aufgrund der betroffenen Membranlipide beschädigt und die genetische Stabilität kann durch DNA-Schäden gefährdet werden. Zudem können ROS direkt mit dem endothelialen Vasodilator NO interagieren, wodurch sie diesen hemmen und langfristig einen zellulären Umbau der Gefäßwand bewirken. (Heinrich et al. 2022, S. 333; Brandes et al. 2019, S. 375)

Unter physiologischen Bedingungen fungieren niedrige, intrazelluläre ROS-Konzentrationen wiederum als Bestandteile der Signaltransduktionswege, wodurch sie eine Vielzahl an intrazellulären Prozessen beeinflussen können. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit reaktiver Sauerstoffspezies wirken sie primär in unmittelbarer Umgebung ihres Entstehungsortes. (Heinrich et al. 2022, S. 334–335)

Neben den ROS tragen ebenso reaktive Stickstoffspezies zum oxidativen Stress bei. Zu den reaktiven Stickstoffspezies RNS gehören Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) und Peroxynitrit (ONOO^-). Stickstoffmonoxid wird bei der Oxidation von Arginin durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder bei der Reduktion von Nitriten durch verschiedene Reduktasen gebildet (Luschtschak und Lushchak 2021). Dabei sind v.a. die neuronale (nNOS) sowie die endotheliale (eNOS) Stickstoffmonoxid-Synthase im Skelettmuskel vertreten (Stamler und Meissner 2001). Bei einer Wechselwirkung von Stickstoffmonoxid mit Superoxidanionen führt diese zur Bildung des starken Oxidationsmittels Peroxynitrit (ONOO^-). Zudem kann bei der Interaktion von Stickstoffmonoxid mit Wasserstoffperoxid ein Hydroxylradikal gebildet werden. RNS bilden zusammen mit ROS die Gruppe der reaktiven Sauerstoff- sowie Stickstoffspezies (RONS). (Luschtschak und Lushchak 2021)

Zahlreiche Zelltypen innerhalb des vaskulären Systems - insbesondere Endothelzellen, glatte Muskelzellen der Gefäße sowie Fibroblasten - besitzen die Fähigkeit ROS zu bilden (Jones et al. 1996; Mohazzab und Wolin 1994; Rey und Pagano 2002).

Im kontraktile Gewebe des Skelettmuskels werden reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoffspezies (RONS) kontinuierlich aufgrund der Kontraktilität und der hohen Stoffwechselrate sowie des hohen Sauerstoffverbrauchs produziert. (Di Lian et al. 2022) Folglich ist das Gleichgewicht zwischen der ROS- bzw. RNS-Produktion und deren Eliminierung entscheidend.

ROS werden hauptsächlich in den Mitochondrien produziert. Diese erzeugen ROS vorwiegend über die Elektronentransportkette, insbesondere an den Komplexen I und III, als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung. (Chen et al. 2022) Dabei ist die gebildete ROS-Konzentration vom Muskelfasertyp abhängig. Im Mausmodell weisen Typ I-Fasern aufgrund ihrer oxidativen Energiegewinnung viele Mitochondrien auf (Schmalbruch 1967) und könnten folglich im Vergleich zu Typ II-Fasern vermehrt ROS bilden. Die Studie von Anderson und Neufer weist jedoch darauf hin, dass Muskelfasern vom Typ II - insbesondere vom Typ IIB - ebenso ROS bilden (Anderson und Neufer 2006).

Eine weitere ROS-Quelle im Skelettmuskel sind die NADPH-Oxidasen (NOX), wobei v.a. NOX2 und 4 im Skelettmuskel lokalisiert sind. Diese befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch im sarkoplasmatischen Retikulum und in den transversalen Tubuli, wobei sie für die Regulation der Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen bedeutend sind. (Xia et al. 2003; Powers und Jackson 2008)

Zudem produziert die Xanthine-Oxidase (XO) ROS. Die intrazellulär lokalisierte Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist am Purinkatabolismus beteiligt und setzt sich aus jeweils zwei Isoenzymen zusammen - der Xanthin-Dehydrogenase sowie der Xanthinoxidase (XO). XOR katalysiert die Reduktion von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure und einem Superoxidanion, wobei die XO als Elektronenakzeptor fungiert. Außerdem stellt die XO eine Hauptquelle für ROS bei Skelettmuskelschwund sowie bei einer vorliegenden Sarkopenie dar. (Le Moal et al. 2017; Ferrando et al. 2018)

Das endoplasmatische Retikulum sowie die NOX-stimulierende Phospholipase A2 stellen ebenso weitere Quellen der ROS-Produktion im Skelettmuskel dar (Le Moal et al. 2017; Malhotra und Kaufman 2007; Gong et al. 2006).

Der komplexe Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Skelettmuskulatur beeinflusst sowohl die physiologische Funktion als auch die strukturelle und metabolische Anpassungsfähigkeit des Muskels. In der Skelettmuskulatur bewirkt oxidativer Stress folglich sowohl destruktive als auch regulierende, signalvermittelnde Effekte durch die Förderung adaptiver Mechanismen. Niedrige ROS-Konzentrationen fördern adaptive antioxidative

Reaktionen und Zellsignalwege des Muskels. Dementsprechend wird die PGC-1 α und β aktiviert. Diese induziert antioxidative Schutzmechanismen, fördert die mitochondriale Biogenese und ist mit Mitofusin-2 assoziiert. Zudem wird die AMP-abhängige Kinasase (AMPK) aktiviert, die wiederum die PGC-1 α -abhängige Bildung neuer Mitochondrien stimuliert. Des Weiteren werden zur Adaption an aerobe Belastungen redoxsensitive Signalwege begünstigt. (Di Lian et al. 2022; Franco et al. 1999)

Eine Überproduktion von ROS kann wiederum im Skelettmuskel neben den oben genannten Effekten zu Funktionsverlust und pathologischen Zellschäden führen. Infolgedessen können Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes, ein degenerativer Abbau von Mitochondrien - einschließlich mitochondrialer DNA-Schäden, Anomalien in der Elektronentransportkette sowie Unterbrechung des Membranpotenzials - als auch eine Schädigung der Myogenese und Muskelregeneration ausgelöst werden. Des Weiteren kann eine hohe ROS-Konzentration Skelettmuskelerkrankungen wie Dystrophie, Atrophie als auch Hypertrophie bedingen. (Di Lian et al. 2022)

Folglich ist ein Gleichgewicht des Redoxstatus unabdingbar für die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur (Duranti 2023).

1.4.2 Myozytäre exogene Regulation des oxidativen Stresses

Zu den nicht-enzymatischen, exogenen Antioxidantien gehören u.a. Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie α -Tocopherol (Vitamin E).

Vitamin E zählt mit seiner Hemmung der Lipidperoxidation zu einer der Hauptantioxidantien. Es ist vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert und entfaltet seine antioxidative Wirkung durch eine Kettenunterbrechung, indem es unter Bildung von Tocopherylradikalen mit Oxidantien interagiert. Tocopherylradikale werden wiederum mittels Vitamin C zu radikalfreiem α -Tocopherolen reduziert. Folglich ist Vitamin E v.a. für die Integrität der Plasmamembran von Skelettmuskeln entscheidend. (Le Moal et al. 2017; Howard et al. 2011)

1.4.3 Myozytäre endogenen Regulation des oxidativen Stresses

Neben der nicht-enzymatischen, exogenen Eliminierung von ROS können diese auch mittels antioxidativer Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT) sowie die Glutathionperoxidase (GPX) neutralisiert werden (Heinrich et al. 2022, S. 334).

Die Superoxiddismutasen (SOD) lassen sich in drei Subtypen unterteilen, welche sich hinsichtlich des aktiven Zentrums und der Lokalisation unterscheiden: die Kupfer-Zink-enthaltene Superoxiddismutase SOD-1; die manganhaltige Superoxiddismutase SOD-2 sowie die extrazellulär lokalisierte Superoxiddismutase SOD-3 (Heinrich et al. 2022, S. 333). Sie sind vor allem für die Eliminierung von Superoxidanionen zuständig, indem sie die Reaktion von ROS mit Wasserstoffionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren (Chen et al. 2022).

Oxidative Muskeln vom Fasertyp I und II-A weisen die höchste SOD-Aktivität auf, wobei die Aktivität der SODs selbst im Skelettmuskel nicht konstant ist und sich anpasst (Powers und Jackson 2008).

Die Kupfer-Zink-enthaltene Superoxiddismutase SOD-1 ist ein Dimer. Ihre Bezeichnung ist auf das in ihrem aktiven Zentrum assoziierte Kupfer- sowie Zink-Ion zurückzuführen. SOD-1 ist hauptsächlich im Zytosol und im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist. (Okado-Matsumoto und Fridovich 2001)

Die manganhaltige Superoxiddismutase SOD-2 ist ein Tetramer. Sie ist mit einem Mangan-Ion assoziiert und hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. (Fridovich 1995) Zudem ist SOD-2 neben der Eliminierung von Superoxidanionen in der Lage, von den Mitochondrien erzeugte Redox-Signale ins Zytosol, in den Zellkern sowie nach extrazellulär weiterzuleiten (Palma et al. 2020).

Die extrazelluläre Superoxiddismutase SOD-3 ist ebenso ein Tetradimer, welche wiederum Kupfer-Zink als Cofaktor verwendet (Powers und Jackson 2008).

Die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPX) wiederum katalysieren die Reduktion des zuvor entstandenen Wasserstoffperoxids. Dabei wandelt die hauptsächlich in den Peroxisomen lokalisierte CAT das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um, während die vorwiegend im Zytosol befindliche GPX Wasserstoffperoxid oder organische Hydroperoxide unter Verwendung von Glutathion als Reduktionsmittel in Wasser bzw. die entsprechenden Alkohole katalysiert. (Rahman et al. 2006; He et al. 2017)

1.5 Die Bedeutung des Bluthochdruckes für die Skelettmuskulatur

Die Interaktion einer arterieller Hypertonie und der Skelettmuskulatur ist komplex, wobei der Skelettmuskel nicht nur passiv von der Hypertonie betroffen ist, sondern auch aktiv zur Pathophysiologie der Erkrankung beitragen kann.

1.5.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie einer Hypertonie

Die essenzielle arterielle Hypertonie ist definiert als ein dauerhaft erhöhter Blutdruck im systemischen Kreislauf. Diagnostisch liegt eine Hypertonie vor, wenn bei wiederholten Messungen systolische Blutdruckwerte von ≥ 140 mmHg und bzw. oder diastolische Werte von ≥ 90 mmHg erreicht werden (Williams et al. 2018).

Eine Hypertonie ist eine weltweit hochprävalente Erkrankung. Im Jahr 2015 lag die globale, altersstandardisierte Prävalenz bei adulten Frauen bei 20 % sowie bei adulten Männern bei 24 % (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2017).

Klinisch wird zwischen primärer respektive essentieller und sekundärer Hypertonie unterschieden.

Die primäre Hypertonie stellt mit einem Anteil von 85 bis 95 % die weitaus häufigste Form dar. Ihre Entstehung ist nicht auf eine Primärerkrankung zurückzuführen und multifaktoriell bedingt. Dementsprechend liegt eine Interaktion zwischen genetischer Prädisposition, Umwelteinflüssen sowie Lebensstilfaktoren vor. Wesentliche Risikofaktoren sind die Sympathikusaktivität steigernde Einflüsse wie ein hoher Kochsalzkonsum sowie chronischer psychosozialer Stress. (Pape et al. 2023, S. 258)

Demgegenüber steht die sekundäre Hypertonie, die etwa eine Prävalenz von 5 bis 15 % aufweist und auf eine diagnostisch ermittelbare Erkrankung zurückzuführen ist. Hierzu zählen vor allem Nierenerkrankungen sowie endokrine Störungen. (Pape et al. 2023, S. 258)

Die Blutdruckerhöhung ist primär auf eine Erhöhung des totalen peripheren Gefäßwiderstands, des Herzzeitvolumens oder einer Kombination beider Mechanismen zurückzuführen (Mayet und Hughes 2003). Die Regulierung des totalen peripheren Gefäßwiderstandes und des Herzzeitvolumens erfolgt wiederum durch hämodynamische, nervale, humorale und renale Prozesse (Jordan et al. 2018).

Die kurzfristige Blutdruckregulation wird mittels neurogener Kreislaufreflexe gesteuert. Dazu gehören der Pressorezeptorenreflex, der von den arteriellen Chemorezeptoren ausgelöste Kreislauffeffekt sowie die Ischämie-Reaktion des ZNS - der sogenannte Cushing-Reflex. Mit Hilfe dieser wird wiederum eine Sympathikusaktivierung induziert bzw. gehemmt. Der aktivierte Sympathikus setzt folglich Katecholamine frei, die wiederum die Perfusion der Organsysteme steuern und die Kontraktionskraft des Herzens erhöhen. (Brandes et al. 2019, S. 260)

Die langfristige Blutdruckregulation erfolgt über die Steuerung des zirkulierenden Blutvolumens, an der das Renin-Angiotensin Aldosteron-System (RAAS) beteiligt ist. Bei einer vorliegenden verminderten Herzauswurfleistung und dem damit verbundenen Abfall des

Blutdruckes, wird aufgrund der Minderperfusion der Niere RAAS aktiviert, wodurch Renin freigesetzt wird. Renin fungiert als Protease und erhöht durch die Spaltung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens die Konzentration des Angiotensin-I (Ang-I). Ang-I wird wiederum mit Hilfe des angiotensin-converting-enzyme (ACE) in Angiotensin-II (Ang-II) gespalten. Ang-II entfaltet seine blutdrucksteigernden Wirkung über den AT₁-Rezeptor. Dies führt zu einer Erhöhung der sympathisch-adrenerg vermittelten Vasokonstriktion. Außerdem stimuliert Ang-II die Aldosteronsekretion und die Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH), was aufgrund einer erhöhten Retention von Natrium und Wasser zu einer Steigerung des Blutvolumens führt. (Brandes et al. 2019, S. 270–271)

1.5.2 Pathophysiologische Folgen einer Hypertonie

Eine unbehandelte Hypertonie kann aufgrund der hypertoniebedingten Komplikationen zu schwerwiegenden organischen Schäden führen (Williams et al. 2018). Zudem ist sie bei der pathophysiologischen Entstehung einer kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von zentraler Bedeutung (Jordan et al. 2018). Zu den wesentlichen Folgeerkrankungen gehören hämorrhagische sowie ischämische Schlaganfälle, ischämische Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheiten und hypertensive Nephropathien (Williams et al. 2018).

Die Skelettmuskulatur betreffende pathophysiologische Folgen einer Hypertonie umfassen vor allem vaskuläre sowie metabolische Mechanismen.

Eine Hypertonie führt aufgrund einer hypertensiven Gefäßumstellung zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Widerstandsarterien, und somit auch der im Skelettmuskel lokalisierten Arteriolen (Brown et al. 2018).

Des Weiteren belegten Studien bezüglich einer pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH), die teilweise auf eine systemische Hypertonie übertragbar ist, dass die aus der hypertensiven Gefäßumstellung resultierende Endotheldysfunktion sowie die damit verbundene gesteigerte Gefäßsteifigkeit die Perfusion der Skelettmuskulatur und die damit assoziierte Sauerstoffversorgung beeinträchtigt (Menezes et al. 2025). Infolgedessen könnten ebenso metabolische Mechanismen und die Regenerationsfähigkeit des Skelettmuskels negativ beeinflusst sein. Des Weiteren können aufgrund einer PAH hypertone Patienten eine reduzierte Muskelmasse und -kraft haben und weisen häufig eine Verschiebung der Muskelfasertypen von den oxidativen Typ I-Fasern zugunsten der glykolytischen Typ-II-Fasern auf (Menezes et al. 2025; Malenfant et al. 2021).

Neben den pathophysiologischen Folgen einer Hypertonie auf die Skelettmuskulatur, kann der Skelettmuskel seinerseits ebenso zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie beitragen. Die von der arbeitenden Skelettmuskulatur sezernierten Myokine - wie beispielsweise IL-6 und Irisin - beeinflussen metabolische und vaskuläre Prozesse. (Qi et al. 2022) Eine aufgrund einer muskulären Inaktivität vorliegende gestörte Myokinproduktion könnte folglich inflammatorische Prozesse und vaskuläre Dysfunktion fördern.

1.6 Die Rolle der Entkopplerproteine (UCP) für die Funktion und den Metabolismus des Skelettmuskels

Für den Metabolismus des Skelettmuskels ist die mitochondriale Funktion von zentraler Bedeutung. Entkopplerproteine (Uncoupling Proteins, UCP) wiederum können Einfluss auf diese nehmen und sind dementsprechend ebenso für die myozytäre Funktion bedeutsam. Die genauen funktionellen Mechanismen der UCP-Subtypen im Muskelgewebe sind jedoch bislang nur unvollständig geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

1.6.1 Entkopplerproteine

Mitochondriale Entkopplerproteine bilden eine Subfamilie der mitochondrialen Anionentransporter. Bisher wurden fünf Isoformen (UCP1 bis UCP5) beschrieben, die zwar eine strukturelle Homologie aufweisen, jedoch gewebeabhängig unterschiedliche Funktionen übernehmen (Krauss et al. 2005). Diese Transportproteine sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und in der Lage, den zur ATP-Synthese genutzten Protonengradienten mittels passivem Rückstrom von Protonen vom Intermembranraum in die Matrix zu entkoppeln. Infolgedessen kann die Energie des Protonengradienten nicht im ATP gespeichert werden und zur Freisetzung von Energie in Form von Wärme führen. (Heinrich et al. 2022, S. 321–322)

Die erste und zugleich am besten erforschte Isoform UCP1 - auch Thermogenin genannt wurde bereits in den 1970er Jahren entdeckt und ist hauptsächlich im braunen Fettgewebe (Brown Adipose Tissue, BAT) lokalisiert. Dort spielt UCP1 eine zentrale Rolle bei der zitterfreien Thermogenese. (Ricquier und Kader 1976; Heaton et al. 1978; Heinrich et al. 2022, S. 322) Besonders postnatal ist BAT aufgrund der geringen Muskelmasse von Neugeborenen und dem mit der Geburt verbundenem Kälteschock sowie der dadurch erforderlichen Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bedeutsam. Zudem ist die zitterfreie Thermogenese

relevant, wenn der Organismus eines adulten Säugetiers zusätzlicher Wärme bedarf wie beispielsweise beim Eintreten eines Fieberzustandes oder beim Aufwachen aus dem Winterschlaf (Heinrich et al. 2022, S. 322; Cannon und Nedergaard 2004)

Auf einen Kältereiz hin erfolgt eine Stimulierung des Sympathikus, was zu einer erhöhten Freisetzung von Noradrenalin führt. Infolgedessen werden β_3 -adrenerge Rezeptoren der braunen Adipozyten aktiviert, wodurch die cAMP-vermittelte Lipolyse stimuliert wird. Die freigesetzten Fettsäuren aus den Triglyceriden werden in der Mitochondrienmatrix abgebaut und die dadurch gebildeten Reduktionsäquivalente werden über die Atmungskette oxidiert. Gleichzeitig induzieren die freien Fettsäuren die Aktivierung von UCP1. (Heinrich et al. 2022, S. 322; Cannon und Nedergaard 2004; Gründer und Schlüter 2023; Fedorenko et al. 2012)

Im Gegensatz zu UCP1 scheinen die anderen Isoformen - UCP2, UCP3, UCP4 und UCP5 - primär thermogenese-unabhängige Funktionen aufzuweisen und stattdessen unter anderem an der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie an der Regulation des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt zu sein (Ježek et al. 2018; Krauss et al. 2005; Fleury et al. 1997).

UCP2 weist eine 59 %-ige Sequenzanalogie mit UCP1 auf, während die für die humanen UCP2 und UCP3 kodierenden Aminosäuresequenzen eine Sequenzhomologie von 72 % aufweisen (Fleury et al. 1997; Ricquier und Bouillaud 2000).

UCP4 und UCP5 werden wiederum vor allem im Gehirn exprimiert und weisen nur partielle Homologien mit UCP1 auf (Ramsden et al. 2012; Mao et al. 1999; Sanchis et al. 1998).

Die Fähigkeiten bzw. Mechanismen von UCP2, UCP3, UCP4 und UCP5 bedürfen weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen (Ježek et al. 2018).

1.6.2 Myozytäre Expression von UCP2

Im Gegensatz zu UCP3, das primär im Skelettmuskel exprimiert wird, ist die myozytäre mRNA-Expression von UCP2 geringer, jedoch funktionell nicht zu vernachlässigen (Alán et al. 2009; Schrauwen und Hesselink 2002).

Die Expression von UCP2 konnte in verschiedensten Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden, unter anderem im Pankreas, in der Lunge, der Niere, im Fettgewebe, im zentralen Nervensystem, im Herzen, im Skelettmuskel sowie in Kolonozyten und Makrophagen (Ježek et al. 2018; Hurtaud et al. 2007).

Im Skelettmuskel konnte bereits nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von UCP2 durch metabolische Einflüsse wie oxidativem Stress, Alterungsprozessen, Fasten sowie

dem Fettsäurestoffwechsel stimuliert bzw. beeinflusst werden kann (Liu et al. 2013; Boss et al. 1997; Heinitz et al. 2018; Barazzoni und Nair 2001; Samec et al. 1999).

1.6.3 Potentielle Rolle von UCP2 auf den Metabolismus des Skelettmuskels

Es wird vermutet, dass UCP2 mittels „milder“ Entkopplung Einfluss auf die Regulation des mitochondrialen Protonengradienten nehmen kann. Hierbei erfolgt eine begrenzte Erhöhung der Protonenleitfähigkeit und einer darauffolgenden geringen Senkung der protonenmotorischen Kraft sowie einer leichten Erhöhung der Atmungsrate. Die mitochondriale ATP-Produktion ist demnach im Gegensatz zu einer vorliegenden, vollständigen Entkopplung noch weiterhin möglich. Aufgrund der dadurch resultierenden Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials vermindert UCP2 die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und wirkt folglich protektiv gegen oxidativen Stress. (Brand und Esteves 2005; Echay et al. 2002)

Eine weitere These ist, dass die Beeinflussung der ROS-Produktion durch UCP2 ohne eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgt und infolgedessen ROS unabhängig von der mitochondrialen Entkopplung reguliert werden könnte (Bouillaud 2009).

Diese antioxidative Funktion könnte insbesondere in hochmetabolischen Geweben wie dem Skelettmuskel von Relevanz sein, da die hohe Stoffwechselrate sowie der hohe Sauerstoffverbrauch bei intensivem Training mit einer verstärkten ROS-Produktion einhergehen können (Di Lian et al. 2022) und spricht dafür, dass UCP2 in der muskulären ROS-Homöostase sowie -Regulation von Relevanz ist.

Des Weiteren ist UCP2 an der Regulation der Glukosehomöostase beteiligt, indem es die Insulinsekretion durch pankreatische Betazellen moduliert (Nesci und Rubattu 2024). In einem Tiermodell mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von UCP2 mit einer reduzierten Insulinsekretion assoziiert ist, wohingegen eine Deletion von UCP2 in einem Mausmodell die Insulinsensitivität verbessert (Chan et al. 1999; Zhang et al. 2001).

Über seine Wirkung auf den mitochondrialen Stoffwechsel könnte es ebenso die Insulinwirkung im Muskelgewebe beeinflussen.

Zudem gibt es Hinweise, dass ein positiver Rückkopplungsmechanismus zwischen den freien Fettsäuren und den im oxidativen Skelettmuskelfasern exprimierten UCP vorliegt (Samec et al. 1999).

1.7 Der Stellenwert der Beta-Sekretase (BACE) für die Funktion und den Metabolismus des Skelettmuskels

Die Beta-Site APP-Cleaving Enzyme BACE1 und BACE2 sind hinsichtlich der physiologischen Insulinsignalkaskade von Relevanz. Diese kann wiederum auf das insulinempfindliche Gewebe der Skelettmuskulatur Auswirkungen nehmen (Taylor et al. 2022).

Den genauen funktionellen Mechanismus von BACE1 im Muskelgewebe gilt es jedoch weiter zu erforschen.

1.7.1 Beta-Sekretase (BACE)

BACE1 und BACE2 sind glykolisierte Transmembranproteine und gehören zur Familie der Aspartylproteasen (Bennett et al. 2000). Sie weisen eine ähnliche Struktur auf sowie eine 51 %-ige Homologie ihrer kodierenden Aminosäuresequenzen (Wang et al. 2013). Jedoch übernehmen BACE1 und BACE2 trotz ihrer Homologie unterschiedliche Funktionen und weisen unterschiedliche transkriptionelle Regulationen auf (Sun et al. 2005).

Das hauptsächlich in Neuronen des Gehirns exprimierte BACE1 wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathogenese erforscht, während die mRNA-Expression von BACE2 im Gehirn vergleichsweise wesentlich geringer ist und BACE2 genetisch dem am Down-Syndrom beteiligten Chromosom 21 zuzuordnen ist sowie vor allem mit Diabetes in Zusammenhang gebracht wird (Wang et al. 2013; Acquati et al. 2000; Casas et al. 2010).

BACE1 lässt sich funktionell in fünf Domänen unterteilen: das Signalpeptid, die Pro-Domäne, die katalytische Domäne, die Transmembrandomäne sowie den zytoplasmatische C-Terminus (Wang et al. 2013).

Es produziert als β -Sekretase im Gehirn durch die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP) Amyloidbeta(A β)-Peptide, die sich in den für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen Plaques ansammeln und infolgedessen zum Verlust kognitiver Fähigkeiten beitragen könnten (Cole und Vassar 2007). Die erhöhte Konzentration von A β -Peptiden geht mit der Regulation synaptischer Funktionen sowie zerebrovaskulären Beeinträchtigungen einher (Taylor et al. 2022).

Neben der Produktion von A β -Peptiden weist BACE1 außerdem neuronale Substrate auf, die mit dem zentralen Nervensystem und dessen neurologischen Funktionen in Verbindung stehen. Die von BACE1 durchgeführte Spaltung von Neuroregulin-1 (NRG1) nimmt Einfluss auf die Myelinisierung und wird zudem mit Schizophrenie assoziiert. Infolgedessen kann BACE1 die Myelinisierung sowie die damit verbundene Myelinscheidendicke im zentralen und peripheren Nerv regulieren. (Hu et al. 2006; Vassar et al. 2009)

Weitere BACE1-Substrate sind das neurale Zelladhäsionsmolekül L1-like Protein (CHL1) und das L1-Zelladhäsionsmolekül (L1CAM), die an der Axonführung beteiligt sind, sowie das Seizure-Protein 6 (SEZ6), das leucinreiches Repeat-Neuronal 1 (LRRN1) und Neurotrimin, die wiederum das Neuritenwachstum beeinflussen. Des Weiteren reguliert BACE1 mittels Spaltung von spannungsgesteuerten Na⁺-Kanal-β2-Untereinheiten (Navβ2) den neuronalen Natriumkanalstoffwechsel. (Taylor et al. 2022; Zhou et al. 2012; Kuhn et al. 2012; Gersbacher et al. 2010)

Mittels nicht-neuronaler Substrate, wie Interleukin-1-Rezeptor II (IL-1R2) und P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), beeinflusst BACE1 zudem Entzündungen und Herz-Kreislauf-Funktionen (Kuhn et al. 2007; Lichtenthaler et al. 2003; Taylor et al. 2022). Ebenso wird BACE1 zunehmend hinsichtlich seiner Rolle als metabolischer Regulator und Modulator von Stoffwechselwegen in verschiedenen Geweben erforscht.

Aus einer von Wang et al. durchgeführten Studie mit BACE1-defizienten Mäusen, die eine reduzierte Gewichtszunahme, einen erhöhten Energieverbrauch sowie eine optimierte Leptin-Signalübertragung aufwiesen, sowie die Verbindung von BACE1 mit Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes und Adipositas, lässt sich schließen, dass BACE1 physiologische Funktionen in der Energiehomöostase sowie im Energiestoffwechsel und der Insulinsensitivität übernimmt (Wang et al. 2013; Meakin et al. 2012).

Unter physiologischen Bedingungen löst ein erhöhter Blutzuckerspiegel die Freisetzung von Insulin aus den β-Zellen der Bauchspeicheldrüse aus, das in insulin sensitiven Geweben wie der Leber, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe über den Insulinrezeptor eine Signalkaskade induziert. Diese führt sowohl zu einer verstärkten Glukoseaufnahme, zur Lipogenese sowie zur Glukoneogenese und Glykogensynthese, als auch einer gleichzeitigen Hemmung der Lipolyse. (Boucher et al. 2014; Taylor et al. 2022) Eine hohe, vorliegende Konzentration von BACE1 wiederum scheint mit einer Abschwächung der Insulinsensitivität sowie einer reduzierten Glukoseaufnahme zu korrelieren (Taylor et al. 2022).

BACE1 moduliert über die negativen Regulatoren PTEN und PTP1B PI3K/Akt-Signalwege (Taylor et al. 2022), die wiederum die insulinvermittelte Glukoseaufnahme modulieren. Zudem kann BACE1 die Ektodomäne des Insulinrezeptor spalten, wodurch ein lösliches Rezeptorfragment (IRsol) freigesetzt wird. Dieses kann Insulin binden und reduziert infolgedessen die Menge an bioverfügbarem Hormon, was in einer Störung der weiteren Signalübertragung resultiert (Meakin et al. 2018; Taylor et al. 2022). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit Typ-2-Diabetes sowohl erhöhte Plasmakonzentrationen von IRsol als auch eine erhöhte Expression von BACE1 aufweisen, was die pathologische Relevanz von BACE1 unterstreicht (Taylor et al. 2022).

BACE2 nimmt über ähnliche Mechanismen ebenso Einfluss auf die Insulinwirkung. Des

Weiteren führt die Hemmung von BACE2 in Mausmodellen zu einer gesteigerten β -Zellfunktion und einer damit verbundenen erhöhten Insulinproduktion sowie einem verbesserten Glukosestoffwechsel. (Esterházy et al. 2011; Taylor et al. 2022)

Außerdem kann das mittels BACE1 sowie BACE2 gebildete A β -Peptid aufgrund seiner ähnlichen Struktur zu Insulin ebenso an den Insulinrezeptor binden. Folglich fungiert es als kompetitiver Inhibitor, der die zelluläre Insulinbindung und -antwort blockieren kann. (Xie et al. 2002) Zudem kann aufgrund einer Akkumulation von A β -Peptiden und der damit einhergehenden Inflammation die über eine erhöhte SOCS-1-Expression - ein Insulinsignal-Inhibitor - die JAK/STAT3-Signalkaskade beeinflussen und daraus resultierend zu einer Hemmung der Insulinsignalisierung führen (Taylor et al. 2022; Liao et al. 2018; Zhang et al. 2012).

Dementsprechend fungieren sowohl BACE1, als auch BACE2 als Modulator der Insulinsignalkaskade.

1.7.2 Myozytäre Expression von BACE1

Neben der hohen mRNA-Expression von BACE1 im Gehirn, konnte sowohl BACE1-mRNA als auch -Protein in β -Zellen des Pankreas, in Hepatozyten, Adipozyten, Gefäßzellen, im Knochenmark sowie im Muskelgewebe nachgewiesen werden (Taylor et al. 2022).

Die Expression von BACE1 im Skelettmuskelgewebe ist jedoch wesentlich geringer als im zentralen Nervensystem (Vassar et al. 1999). Nichtsdestotrotz ist sie vor allem unter pathologischen Bedingungen von Relevanz und sowohl in Typ I, als auch in Typ II Muskelfasern nachgewiesen (Meakin et al. 2012).

1.7.3 Potentielle Rolle von BACE1 auf den Metabolismus des Skelettmuskels

BACE1 kann die Entwicklung der Muskelspindeln und die motorische Koordination beeinflussen. Muskelspindeln setzen sich aus spezialisierten, intrafusalen Muskelfasern zusammen und sind entscheidend für die Wahrnehmung der Muskelstellung und Bewegung. Sie werden von afferenten Nervenfasern sensorischer Neuronen innerviert. Ein Mangel an BACE1 beeinträchtigt die physiologische Funktion der Muskelspindeln und ist auf eine verringerte Spaltung von einer Neuregulin-1-Isoform und der damit assoziierten reduzierten Reifung sowie Anzahl an Muskelspindeln zurückzuführen. (Yan 2017; Cheret et al. 2013; Hunt 1990) Neuregulin-1 ist wiederum für die Differenzierung von Muskelspindeln bedeutsam (Hippenmeyer et al. 2002). Cheret et al. belegt damit, dass BACE1 für die Bildung als auch die Reifung der Muskelspindel relevant ist.

Des Weiteren konnte unter pathologischen Bedingungen eine Kolo-kalisation von BACE1 und A β -Peptiden im Muskelgewebe nachgewiesen werden (Vattemi et al. 2001).

Zudem nimmt BACE1 über die Modulation der PI3K-Akt-Signalkaskade Einfluss auf die Insulinsignalkaskade (Taylor et al. 2022), wodurch es gleichzeitig die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in den Muskelzellen steuern könnte.

Daten aus Tiermodellen und in vitro-Experimenten deuten darauf hin, dass eine Hemmung von BACE1 mit einer verbesserten Insulinssensitivität im Muskelgewebe und in der Leber sowie einer erhöhten Glukoseaufnahme in C2C12-Zellen assoziiert ist (Meakin et al. 2012). Im Umkehrschluss könnte dementsprechend eine Überexpression von BACE1 mit einer Insulinresistenz und einer reduzierter Glukoseaufnahme einhergehen (Taylor et al. 2022).

Da ein Teil der zirkulierenden Glukose über insulinempfindlichen GLUT4-Transporter, aufgenommen wird, könnte BACE1 und dessen Aktivität einen potenziell weitreichenden Einfluss auf den Glukosestoffwechsel nehmen (Taylor et al. 2022).

Bei Patienten mit Typ-2-Diabetes als auch bei diätinduzierter Adipositas (DIO) mittels Fütterung von fettreicher Nahrung im Mausmodell zeigte sich eine Beeinträchtigung des GLUT4-vermittelten Glukosetransports im Muskel, was mit einer eingeschränkten Insulinsignalisierung einherging (Alam et al. 2016; Hansen et al. 1998). Zudem weisen Studien an C2C12-Myotuben darauf hin, dass das für die Biosynthese von A β -Peptiden relevante APP die GLUT4-Translokation und die zelluläre Glukoseaufnahme im Skelettmuskel direkt beeinflussen kann (Hamilton et al. 2014; Taylor et al. 2022). Dies legt nahe, dass eine pathologische, lokal gesteigerte A β -Produktion durch BACE1 im Muskel als auch die von BACE1 durchgeführte Spaltung von Insulinrezeptoren die Insulinsignalkaskade und damit assoziierte metabolische Prozesse beeinflusst (Taylor et al. 2022).

Meakin et al. konnte nachweisen, dass eine BACE1-Hemmung sowohl die Glukoseaufnahme und die Insulinsensitivität des Skelettmuskels steigert, als auch mit erhöhter Expression der Gene *UCP1* im BAT sowie *UCP2*- und *UCP3* im Skelettmuskel verbunden ist. Infolgedessen postulierten die Autoren, dass eine BACE1-Hemmung mit einer erhöhten entkoppelten Atmung und metabolischer Ineffizienz einhergehe. (Meakin et al. 2012)

Diese Befunde weisen darauf hin, dass BACE1 nicht nur ein wichtiger Faktor im amyloidogenen Stoffwechsel des Gehirns ist, sondern auch ein potenzieller metabolischer Modulator im peripheren Muskelgewebe sein könnte und infolgedessen mögliche Ansätze für zukünftige Therapien metabolischer Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes bietet.

1.8 Versuchstiere

Die Bedeutung und Beeinflussung von UCP2 sowie BACE1 für den Metabolismus des Skelettmuskels unter Einfluss einer Hypertonie und oxidativen Stresses wurde mit Hilfe von Gewebeproben des M. soleus sowie M. gastrocnemicus folgender Tiermodelle untersucht.

1.8.1 Wistar Hannover und spontan hypertensive Ratten

Die in dieser Studie untersuchten Skelettmuskeln, der M. soleus und der M. gastrocnemius, stammten von weiblichen SHR und Wistar Hannover Ratten im Alter von vier Wochen bis drei Monaten. Diese Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und gehalten. Die Umgebungstemperatur lag konstant bei 23 °C und die Luftfeuchtigkeit bei $50 \pm 10\%$, wobei die Tiere einem natürlichen, 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt waren. Trinkwasser sowie Futter stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. In den Trainingsgruppen wurden die Tiere einzeln mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten. Die aus 6 bis 7 Tieren bestehenden Kontrollgruppen wurden in Eurostandard Typ III Käfigen auf Einstreu WH-Grade 6 gehalten.

1.8.1.1 Wistar Hannover Ratten

Der Wistar Hannover Rattenstamm, ein Albino-Typ, ist aufgrund der hohen Lebensspanne der Tiere und der niedrigen Inzidenz von Spontantumoren in der experimentellen Forschung ein häufig genutztes Tiermodell - v.a. hinsichtlich durchgeführter Langzeituntersuchungen. In Studien, die Spontan-Hypertonie-Ratten (SHR) untersuchen, wird häufig der Wistar Kyoto Rattenstamm als normotensives Referenzkollektiv herangezogen. Es zeigen sich jedoch, abhängig vom jeweiligen Lieferanten, signifikante Unterschiede in den Blutdruckparametern sowie der Wachstumsrate im Vergleich zu den Wistar Hannover Ratten. (Kurtz und Morris 1987)

1.8.1.2 Spontan hypertensive Ratten

Das Modell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle zur Untersuchung der essentiellen arteriellen Hypertonie bezüglich deren Progression und ihrer Langzeitfolgen auf die verschiedenen Organsysteme (Kurtz und Morris 1987).

Der SHR-Stamm wurde erstmals 1963 von Okamoto und Aoki mittels Kreuzung von Wistar Kyoto Ratten mit erhöhtem Blutdruck gezüchtet (OKAMOTO und AOKI 1963). Das Modell zeichnet sich durch eine monogene Vererbung der Hypertonie aus, wobei mehrere Gene die Krankheitsentwicklung beeinflussen (Pravenec und Kurtz 2010).

Zwischen der siebten und fünfzehnten Woche weisen die SHR-Ratten eine Hypertonie mit systolischen Werten zwischen 180 und 200 mmHg auf, wobei weibliche Tiere des SHR-Stammes im Vergleich zu den Männchen niedrigere systolische Werte von etwa 175 mmHg aufweisen (OKAMOTO und AOKI 1963; Yamori 1991; Yen et al. 1974). Die auftretenden systolischen Blutdruckwerte und die organischen Folgeschäden sind relevante Indikatoren, die in der Forschung genutzt werden können (Pinto et al. 1998; Doggrell und Brown 1998).

1.8.2 Pharmakoinduzierter Hypertonus mittels Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

Eine endotheliale Dysfunktion ist eine wesentliche, pathophysiologische Komponente bei der Entstehung einer arteriellen Hypertonie, wobei eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) charakteristisch ist (Davignon und Ganz 2004). Experimentell lässt sich eine Dysbalance im NO-System durch die Gabe von Nω-Nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid (L-Name) simulieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind auf die Wirkungsweise von NO zurückzuführen. (Kopincová et al. 2012) Die Wirkung von NO wird primär durch die Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase (GC) und der damit assoziierten Induktion einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur entfaltet, was wiederum zur Vasodilatation und folglich einer Senkung des Blutdrucks führt (Heinrich et al. 2022, 438, 1084-1085; Davignon und Ganz 2004). Ist die mit der endothelialen NO-Synthase (eNOS) assoziierte Freisetzung von NO jedoch gestört, folgt auf die dadurch anhaltende Vasokonstriktion ein Anstieg des arteriellen Drucks (Li et al. 2015). L-Name hemmt kompetitiv die Aktivität der eNOS, wobei es die Umsetzung von L-Arginin zu NO und Citrullin blockiert. Die aufgrund der chronischen Inhibition der eNOS ausgelösten Hyperkontraktilität führt bei Versuchstieren innerhalb von vier Wochen zur Entwicklung einer stabilen Hypertonie mit systolischen Blutdruckwerten oberhalb von 180 mmHg, wobei eine Fortsetzung der Behandlung über acht Wochen Werte von über 200 mmHg zur Folge haben kann. (Gardiner et al. 1993; Gennaro Colonna et al. 2005)

Die durch L-Name induzierte, reduzierte Bioverfügbarkeit von NO begünstigt bei langfristiger Gabe zudem die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies und den damit verbundenen oxidativen Stress. Dies ist auf die ausgelöste, erhöhte Expression des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) und die gesteigerte Bildung von Angiotensin II

zurückzuführen. (Suda et al. 2002)

Zudem manifestieren sich im kardiovaskulären Gewebe strukturelle Umbauprozesse, die u.a. arteriosklerotische Koronarläsionen verursachen (Suda et al. 2002). Diese Langzeitfolgen können wiederum die kardiale Funktion erheblich beeinträchtigen.

1.8.3 UCP2-Knockout Ratten

Die gezielte Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 ist eine häufig genutzte Methode zur Erzeugung genetisch veränderter Tiermodelle (Jinek et al. 2012). Mit Hilfe einer genetischen Deletion von UCP2 in Ratten ist es möglich, physiologische und pathophysiologische Vorgänge und genetische Veränderungen in Hinblick auf die Regulation des Energiehaushalts sowie des oxidativen Stresses zu analysieren.

1.9 Arbeitshypothese

Eine gestörte Glukose-Homöostase als auch eine Insulinresistenz fördern die Entstehung von Typ-2-Diabetes und gelten als Risikofaktor von Alzheimer-Erkrankungen (Meakin et al. 2012).

Forschungsergebnisse haben ergeben, dass BACE1 nicht nur an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer beteiligt ist, sondern ebenfalls einen wichtigen Regulator der Glukose-Homöostase des Skelettmuskels darstellt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine BACE1-Hemmung die Glukoseaufnahme und die Insulinsensitivität des Skelettmuskels steigert. (Meakin et al. 2012)

Interessanterweise ist das Fehlen von BACE1 im Skelettmuskel von BACE1-defizienten Mäusen gleichzeitig mit einer Heraufregulation des mitochondrialen Entkopplerproteins UCP2 verbunden, was auf eine erhöhte entkoppelte Atmung und metabolische Ineffizienz hinweist (Meakin et al. 2012). Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass eine UCP2-Defizienz mit einer gesteigerten BACE1-Expression sowie einer reduzierten Insulinssensitivität einhergeht. Die Arbeitsgruppe von Taylor et al. schlussfolgerten, dass eine gesteigerte Expression von BACE1 mit einer Insulinresistenz und einer reduzierter Glukoseaufnahme assoziiert ist (Taylor et al. 2022). Zhang et al. postulierten wiederum, dass eine Deletion von UCP2 im Mausmodell mit einer verbesserten Insulinsekretion einhergeht (Zhang et al. 2001).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität haben gezeigt, dass am Modell der Maus und Ratte sowie an humanem Probenmaterial die Funktion von UCP2 weniger auf seiner ursprünglich postulierten Eigenschaft beruht, sondern

vielmehr als molekularer Schalter des kardialen Energiestoffwechsels die Kopplung zwischen Glykolyse und Pyruvatoxidation regulieren kann und somit als ein wichtiger Regulator der Glukosehomöostase von Herzmuskelzellen fungiert (Kutsche et al. 2020).

Der Skelettmuskel exprimiert im Gegensatz zum Herzmuskel jedoch primär die Isoform UCP3 ohne jedoch gleichzeitig auf die Expression von UCP2 zu verzichten (Kutsche et al. 2022).

Dies könnte darauf hindeuten, dass UCP2 andere Funktionen im Skelettmuskel übernimmt als UCP3 und lässt vermuten, dass über eine UCP2-BACE1-Achse der Glukosestoffwechsel des Skelettmuskels beeinflusst wird. Die genauen Mechanismen über die BACE1 möglicherweise als Interaktionspartner von UCP2 die Glukose- bzw. Fettsäureverwertung reguliert sind derzeit nicht bekannt und aufgrund der zentralen Rolle des Skelettmuskels für die systemische Homöostase des Glukosestoffwechsels Gegenstand der geplanten Studie.

Die daraus abgeleitete **Arbeitshypothese** lautete dementsprechend:

Eine Verbesserung der skelettmuskulären mitochondriellen Effizienz durch UCP2-Defizienz senkt die Expression von BACE1 und trägt so zur Glukosehomöostase bei.

Das Ziel des Projektes war es die oben genannte Arbeitshypothese zu verifizieren oder zu falsifizieren. Um dies zu erreichen, wurde die Bestimmung der skelettmuskulären mRNA-Expression von BACE1 sowie UCP2 im M. gastrocnemius und M. soleus, die Validierung der Befunde auf Proteinebene durch Western-Blots, die Bestimmung des oxidativen Stresses anhand von DHE-Färbungen und die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben vorgenommen.

Dafür kamen verschiedene Tiermodelle zum Einsatz. Zum einen wurde das Modell UCP2-defizienter Ratten und ihrer Wildtyp-Kontrollen herangezogen und zum anderen wurden aufgrund einer pharmakologischen Gabe von N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertone Ratten sowie spontan hypertensive Ratten (SHR) untersucht. Zudem erfolgte eine in-vitro Untersuchung an mit siUCP2-RNA transfezierten AC16-Zellen, eine Analyse deren mRNA-Expression und posttranskriptioneller Regulation mittels molekularbiologischer Methoden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Chemikalien, Materialien sowie Geräte aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Name	Bezugsquelle
All stars negative control siRNA	QIAGEN, Venlo (NL)
Antibiotic Medium (AM)	Corning In., Glendale (USA)
Antibiotic Antimycotic Solution, 100X	Corning In., Corning (USA)
Aqua bidest.	B. Braun, Melsungen
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
DakoCytomation Pen	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
dATP solution	Invitrogen, Darmstadt
dCTP solution	Invitrogen, Darmstadt
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel Glaser/Schott AG, Mainz
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM F12 mit Hepes)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dGTP solution	Invitrogen, Darmstadt
Dihydroethidium (5 mM stabilized solution in DMSO)	Invitrogen, Darmstadt
(D)PBS (ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+})	Bio&SELL GmbH, Feucht/ Nuremberg
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Darmstadt
dTTP solution	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Corning In., Corning (USA)
FlexiTube siRNA Hs_UCP2_5 (siRNA gegen UCP2)	QIAGEN, Venlo (NL)
Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
iQ SYBR Green supermix	Bio-Rad, München

Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Laemmli 2x Concentrate Sample Buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamine (200 mM, sterile filtered)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Lipofectamin RNAiMAX Reagent	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
NuPAGE™ Antioxidant	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer 20x	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE™ Transfer Buffer 20x	Invitrogen, Darmstadt
Oligo dt	Roche, Mannheim
OPTI-MEM I	Gibco by Invitrogen, Darmstadt
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Phenylmethylsulfonylfluorid (0,1 M PMSF)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RNasin Plus (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spectra Multicolor Broad Range Protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
TBS 20x, A5001	AppliChem GmbH, Darmstadt
TrypLE™ Express	Gibco by Invitrogen, Roskilde (DK)
TRITidy G™	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween20®	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Blotting Paper 70	VWR International GmbH, Darmstadt
Cell scraper	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon 35 3001 Zellkulturschalen	Corning In., Corning
Falcon Zentrifugenröhrchen	Thermo Scientific, Schwerte
Filter Tips	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/ Luhe

Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka (JP)
Filter 0,2 µM	Sartorius Group, Göttingen
Filter Tips	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Keramikkügelchen	peqlab, Erlangen
Pasteurpipetten Plastibrand	Brand, Wertheim
Microplate 96 wells, U-Bottom, crystal clear	Greiner bio-one, Kremsmünster (A)
Mikrotiterplatten Lesegerät Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Multiply-µStripPro	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nitrocellulose transfer membrane Protran BA85 (0,45 µm Porengröße)	Whatman GE Healthcare, Freiburg
NuPAGE 10% Bis-Tris-Gel (10 well, 15 well)	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel (10 well, 15 well)	Invitrogen, Darmstadt
Parafilm	Bemis Company, Wisconsin (USA)
Pasteur Pipetten (230 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt
Precell Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Superfrost™ Plus Adhesion Microscope Slides, Pink Tab	epredia, Portsmouth (USA)
Tissue-Tek O.C.T.TM Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn (NL)
VWR Tissue Culture Dish 100mm	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.3 Geräte

2.1.3.1 Isolation und Kultivierung der AC16-Zellen

Tabelle 3: Geräte zur Isolation und Kultivierung

Name	Bezugsquelle
Allegra 21 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Aqualine AL 25 Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen

Brutschrank BBD 6220 (5%-ig CO ₂)	Heraeus, Hanau
FireBoy Bunsenbrenner	Integra Biosciences, Fernwald
HeraSafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
HERAcell 240 CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel (FR)
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt

2.1.3.2 Proteinisolation und Western Blot

Tabelle 4: Geräte zur Proteinisolation und Durchführung von Western Blots

Name	Bezugsquelle
Analysenwaage Acculab	Sartorius Group, Göttingen
Brutschrank BP 400	Memmert, Schwabach
Chemilumineszenzgerät ChemiDoc 5000	peglab, Erlangen
Entwicklerschalen	Labor Products, Gaithersburg (US)
Hamilton Pipette 100 µl (Mikroliterspritze Typ 710)	Hamilton Germany GmbH, Gräfelfing
Heizplatte Dri Block DB-2B	Techne, Wertheim-Bestenheid
Plattform (Plattformschüttler, wippend)	Gibco by Invitrogen, Darmstadt
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph instruments, Schwabach
Präzisionswaage PCB M Memory	Kern & Sohn GmbH, Balingen
PS 608 electrophoresis power supply	Biometra, Göttingen
Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Western Blot Glasplatte	Biometra, Göttingen
Western Blot Roller	Novex by life technologies, Carlsbad (US)
Western Blot Schwämme	Novex by life technologies, Carlsbad (US)
XCell II blot module	Novex by life technologies, Carlsbad (US)
XCell SureLock mini-cell electrophoresis system	Novex by life technologies, Carlsbad (US)

2.1.3.3 cDNA-Synthese und qPCR

Tabelle 5: Geräte für die cDNA-Synthese und qPCR

Name	Bezugsquelle
CFX Connect Real-Time PCR System	Bio-Rad, München
Techne, Wertheim-Bestenheid	Techne, Wertheim-Bestenheid
Kühlzentrifuge Sigma 1-16K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Precellys 24 lysis & homogenization	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam (NL)
MS1 Minishaker	IKA, Staufen

2.1.3.4 Geräte zur Anfertigung von Kryoschnitten und histologische Beurteilung

Tabelle 6: Geräte zur Anfertigung von Kryoschnitten und zur histologischen Beurteilung

Name	Bezugsquelle
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
BZ-X810 Fluorescence Microscope	Keyence Corporation, Osaka (JP)
BZ-X Series Fluorescence Microscope	Keyence Corporation, Osaka (JP)
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch

2.1.4 Softwares

Tabelle 7: Softwares

Name	Bezugsquelle
Bio-Rad CFX Maestro Version 1.1	Bio-Rad, München
BZ-X800 Analyzer	Keyence Corporation, Osaka (JP)
BZ-X800 Image Converter	Keyence Corporation, Osaka (JP)
BZ-X800 WideImage Viewer	Keyence Corporation, Osaka (JP)
BZ-X800 Viewer	Keyence Corporation, Osaka (JP)
ChemiCapt5000	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
ImageJ	National Institutes of Health (NIH), Bethesda (USA)

Microsoft Excell 2016	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft Office 2010 und Office 365	Microsoft Deutschland GmbH, München
ND-100 Version 3.5.1	Coleman Technologies, Inc., Newton Square (US)
Python 3.13.2	Python Software Foundation, Fairfield (USA)
Tecan Magellan Version 6	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Quantity One Version 4.6.6	Bio-Rad, München
QuantaSmart	Perkin Elmer, Waltham (US)

2.1.5 Small interfering RNA

Die Reduktion der ribosomalen Translation von UCP2 in AC16-Zellen wurde mit Hilfe von lypophilisierter siRNA umgesetzt. Diese siRNA ist ein Oligonukleotid, das sich gezielt komplementär an einen bestimmten Abschnitt der mRNA des Zielproteins anlagert und in Folge dessen zu einer Blockade der ribosomalen Translation führt. Die verwendete siRNA (FlexiTube siRNA Hs_UCP2_5) sowie das RNase-freie Wasser wurden von der Firma QIAGEN (Venlo, NL) bezogen. Die siRNA wurde in 250 µl RNase-freiem Wasser gelöst. All stars negative control siRNA (QIAGEN) wurde in der gleichen Konzentration als Negativkontrolle verwendet.

2.1.6 Antikörper

Die in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper wurden in einer Tris-gepufferter Salzlösung (TBS-Puffer, s. Tabelle 1) mit 5-prozentigem BSA und 0,1-prozentigem Tween20 inkubiert.

Kommerziell erhältliche Antikörper gegen UCP2 weisen nicht die nötige Spezifität auf. Folglich stellte uns freundlicherweise Frau Prof. Dr. Elena Pohl (Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik, Abteilung für Physiologie und Biophysik, Veterinärmedizinische Universität Wien) einen geeigneten Antikörper sowie humanes rekombinantes UCP2-Protein (hUCP2) als Positivkontrolle zur Verfügung. Die Validation der Spezifität des Antikörpers wurde bereits in Mäusen nachgewiesen. Der UCP2-Antikörper bindet an die Peptidsequenz „VGFKATDVPPTATVKF“. (Rupprecht et al. 2012)

Ebenso wurden die Antikörper gegen GLUT-1 und GLUT-4 nicht kommerziell bezogen,

sondern freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach (Physiologisches Institut, JLU Gießen) bereitgestellt.

2.1.6.1 Primärantikörper

Tabelle 8: Primärantikörper

Name	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-BACE1 (Maus/ Ratte) Polyclonal Rabbit IgG	Novus Biologicals, Wiesbaden	1:1000
Anti-GAPDH (Maus/Ratte) Polyclonal Mouse IgG	Calbiochem Merck, Darmstadt	1:4000
Anti-GLUT1 (Maus/Ratte/Human) Polyclonal Rabbit IgG	Nicht kommerziell erhältlich	1:1000
Anti-GLUT4 (Maus/Ratte/Human) Polyclonal Rabbit IgG	Nicht kommerziell erhältlich	1:4000
Anti-panAktin (Maus/Ratte/Human/Zebrabärbling Affe) Polyclonal Rabbit IgG	Cell Signaling Technology Inc., Leiden (NL)	1:1000
Anti-PDHA1 (Maus/Ratte/Human/Zebrabärbling) Polyclonal Rabbit IgG	GeneTex Inc., Irvine (USA)	1:1000
Anti-PDK1 (Maus/Ratte/Human) Polyclonal Rabbit IgG	ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried	1:1000
Anti-UCP2 (Maus/Ratte/Human) Polyclonal Rabbit IgG	Nicht kommerziell erhältlich	1:1000

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Name	Bezugsquelle	Verdünnung
Goat-Anti-Mouse HRP conjugated, polyclonal	Dako Agilent (Hamburg)	1:2000
Goat-Anti-Rabbit HRP conjugated, polyclonal	Dako Agilent (Hamburg)	1:2000

2.1.7 Primer

Die für diese Promotionsarbeit verwendeten Primer wurden von Invitrogen (Darmstadt) bezogen. Sie wurden in einem Verhältnis von 15 µl forward (100 µM), 15 µl reverse (100 µM) sowie 270 µl Aqua bidest angesetzt.

Tabelle 10: Primersequenzen

Spezies	Primer	Produktlänge	Annealing-Temperatur	Sequenz (5' zu 3') Obere Zeile: forward; Untere Zeile: reverse
Ratte	UCP2	176 bp	59,0 °C	CAA TGT TGC CCG AAATGC CA TCT TGA CCA CAT CAA CGG GG
Human	UCP2	183 bp	60°C	AAGGATGCCCTCCTGAAAGC AAGGATGCCCTCCTGAAAGC
Ratte	UCP3	187 bp	62°C	GATCTCCTCACCTTCCCCCT AGGCAAAACTCATCTGGCGA
Human	UCP3	145 bp	60°C	ATGACTCCGTCAAGCAGGTG CTGGCCTGAAATCGGACCTT
Ratte	HPRT	132 bp	63,0 °C	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC
Human	HPRT	137 bp	60°C	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA CGAGCAAGACGTTCACTCCT
Ratte	betaAktin	bp	60°C	GAA GTG TGA CGT TGA CAT CCG TGC TGA TCC ACA TCT GCT GGA
Human	betaAktin	192 bp	61°C	AACTGGGACGACATGGAGAAAA GGATAGCACAGCCTGGATAGCA

Ratte	B2M	117 bp	65,0 °C	GCCGTCGTGCTTGCCATTC CTGAGGTGGGTGGAAGTGAAGAC
Human	B2M	138 bp	59°C	TGTCTTTCAGCAAGGACTGGT ACATGTCTCGATCCCACTTAAC
Ratte	BACE1	200 bp	62°C	CCACAGACGCTCAACATCCT CATGAGGGATGCTCACCAG
Human	BACE1	159 bp	60,0 °C	CTGGCTCCTGCTGTGGATG GACTTGCCCCTCAGGTTGTC
Ratte	BACE2	159 bp	60,5°C	ACCACAGAGCCTCAACTGTTC GCATCTCCAGGTAGTAGCCG
Human	BACE2	175 bp	60,0 °C	CACGAACCGCGTAGTTGC CATCTCCAGGTAGTAGCCGC
Ratte	SLCA1 (GLUT1)	185 bp	60,0 °C	ACC GTC TTC ACG TTG GTC TC ATC AAG ATG GCA CAG CCA CA
Human	SLCA1 (GLUT1)	176 bp	61°C	GGCTTCTCCAAGTGGACCTC CCGGAAGCGATCTCATCGAA
Ratte	SLCA4 (GLUT4)	101 bp	59,0 °C	ACC GTC TTC ACG TTG GTC TC ATC AAG ATG GCA CAG CCA CA
Human	SLCA4 (GLUT4)	101 bp	60°C	TCTCCAAGTGGACGAGCAAC CAGCAGGAGGACCGCAAATA
Ratte	GAPDH	176 bp	60,5°C	CTTCTCTTGACAAAGTGGACA CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
Human	GAPDH	158 bp	60°C	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
Ratte	Pdhx	188 bp	59°C	TCGCTGACGCTGTAAAGGTT GAGTTTCAGCACTGGACGGA
Ratte	Pdhh	128 bp	60°C	GAAAGGCAAGGGACCCACAT GGTCTGATGGTCCGCAGATT
Ratte	PDK4	106 bp	60°C	GAGCTGGTACATCCAGAGCC TCGAACCTTGACCAGCGTGT
Ratte	PDK1	193 bp	62°C	GCCAGGTGGACTTCTATGCG TGTACGGATGGGGTCCTGAG
Human	PDK1	120 bp	61°C	CAGCTTCAGCTCGGACTCG CCGAAGTCCAGGAAGTCTT
Ratte	PDHA1	198 bp	59,5°C	CAGAAGCCGGCAAGCAG ATACAGCTGATCCGCCTTGAG

Human	PDHA1	123 bp	60°C	TTCTCAGAAGCCGGCAAGC AGCACTGTTGTGACAGGAGG
Ratte	MCP1	137 bp	60°C	ATGTCCGGAGCAAGGACTTC GAAAGTCATCCGCCCACTGA
Ratte	MCP2	163 bp	60°C	GTGCTGATGGCTACAGGGTT ACTGGATTCTTTAGATTTGAGTTC
Ratte	Mfn-2	122 bp	59°C	CTCTGTGCTGGTTGACGAGT AGCGGTCAGACATGTTTCGT
Ratte	SOD1	134 bp	63,0 °C	AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA ACA TGG AAC CCA TGC TCG CCT
Ratte	SOD2	169 bp	63,0 °C	ATG TTG TGT CGG GCG GCG TG TCG CGT GGT GCT TGC TGT GG
Ratte	SOD3	163 bp	63,0 °C	TGC TGC CTC CCG ATC AGC CA CCC TGG CTC AGG TCC CCG AA

Abkürzungen: UCP2: uncoupling protein 2, UCP3: uncoupling protein 3, HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, betaAktin: , B2M: , BACE1: β -site of APP cleaving enzyme, BACE2: Beta-Sekretase 2, SLC2A1: solute carrier family 2 member 1, SLC2A4: solute carrier family 2 member 4, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Pdhx: pyruvate dehydrogenase complex component X, Pdhb: pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta, PDK4: Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4, PDK1: Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1, PDHA1: Pyruvat-Dehydrogenase Alpha 1, MCP1: Monozyte Chemoattractant Protein-1, MCP2: Monozyte Chemoattractant Protein-2, Mfn-2: Mitofusin 2, SOD1: Superoxid-Dismutase 1, SOD2: Superoxid-Dismutase 2, SOD3: Superoxid-Dismutase 3

2.1.8 Gewebeproben

Im Zuge der durchgeführten Untersuchungen wurden Gewebeproben aus verschiedenen experimentellen Serien analysiert. Es wurden keine Tierversuche oder Tiertötungen im Rahmen dieser Studie vorgenommen.

2.1.8.1 L-NAME behandelte Tiere

Die Gewebeproben von den L-NAME-behandelten Tieren und deren entsprechenden Kontrollen entstammen dem Projekt GI 20/1 Nr. 58/2005 (JLU-Nummer 266). Zu Beginn der Versuche waren die Ratten drei Monate alt und die Versuchsdauer betrug vier Wochen.

2.1.8.2 UCP2-Knockout Tiere

Die Gewebeproben von den UCP2-Knockout Tieren und deren entsprechenden Kontrollen entstammen dem Projekt 752_M 752_M UCP2-Ratte.

2.1.8.3 SHR-Tiere

Die Gewebeproben von den SHR-Tieren und deren entsprechenden Kontrollen entstammen dem Projekt V54-19 c 20 15 h 01 GI Nr. 76/2014 und V54-19 c 20 15 h 01 GI 20/1 Nr. 77/2014.

Zu Beginn der Versuche waren die Ratten 6 Wochen alt und die Versuchsdauer betrug sechs Monate.

2.1.8.4 Wistar-Tiere

Die Gewebeproben von den Wistar-Tieren entstammten dem Projekt RP V54-19 c 20 15h 01 GI 20/1 Nr. 77/2014.

2.1.9 AC16-Zellen

Die AC16-Zelllinie stellte uns freundlicherweise Herr Prof. Dr. Péter Ferdinandy (Institut für Pharmakologie und Pharmakotherapie, Semmelweis-Universität Budapest) zur Verfügung. Sie ist eine humane Kardiomyozyten-Zelllinie, die aus einer Fusion von adulten, aus dem Ventrikel stammenden Primärzellen und SV40-transformierten, uridin-auxotrophen menschlichen Fibroblasten ohne mitochondriale DNA entstand. Nachdem nicht fusionierte Fibroblasten durch Selektion in einem uridinfreien Medium entfernt wurden, wurden die fusionierten Zellen weiter subkloniert und auf das Bestehen von SV40-T-Antigen, β -Myosin aus schweren Ketten und Connexin-43 geprüft. Diese Zelllinie weist eine Fähigkeit zur Proliferation auf und ihre Differenzierung lässt sich durch Anpassung der Kulturbedingungen sowie durch Blockierung der SV40 T-Antigen-Expression steuern. AC16-Zellen eignen sich zur Analyse von Genexpression und Herzfunktionen sowohl unter physiologisch als auch unter pathologischen Umständen auf zellulärer und molekularer Ebene. (Davidson et al. 2005; Litzkas et al. 1984)

2.2 Methoden

2.2.1 In-vitro-Untersuchungen an AC16-Zellen

Zur Vermeidung von Kontaminationen und Förderung des Zellwachstums wurde die Kultivierung, die Untersuchungen sowie die an den AC16-Zellen durchgeführten Versuche sämtlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von AC16-Zellen

Zum Auftauen der im Cellfreezer eingefrorenen AC16-Zellen wurde zu Beginn in je zwei 50er Falcons 50 ml sowie 10 ml Medium im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C aufgewärmt (s. Tabelle 11).

Im Anschluss wurde nicht aufgewärmtes Zellmedium auf drei 100er Zellkulturschalen vorgelegt und jeweils im Brutschrank warmgestellt.

Das mit den gefrorenen Zellen enthaltende Cryotube wurde kurz unter der Sterilbank geöffnet, um potentiell vorhandenen Stickstoff zu entfernen. Danach wurden die Zellen unter Sicht unter Verbleib eines kleinen, gefrorenen Anteils im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen abpipettiert und in ein mit 10 ml Medium befülltes Falcon gegeben und einmalig unter Vermeidung von Schaumbildung mit Medium gespült. Danach wurden die befüllten Falcons bei 900 rpm (156 xg) für 5 min zentrifugiert, um so das Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Pellet in 600 µl Medium resuspendiert. Darauffolgend konnten je 100er Zellkulturschale 200 µl der Zell-Medium-Suspension appliziert werden. Zuletzt wurden die Zellkulturschalen für eine gleichmäßige Verteilung sternförmig bewegt sowie in den Brutschrank gestellt. Nachdem die Zellen nach 24 h adhärent waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurde bis zu einer Erreichung von einer circa 95-prozentigen Konfluenz alle zwei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Qualitäts- und Konfluenzkontrolle erfolgte mittels Lichtmikroskop.

Tabelle 11: Ansatz für 500 ml Zellmedium

Chemikalie	Angabe in ml
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM F12 mit HEPES)	427,5 ml
Glutamin	5 ml
Antibiotic Medium (AM)	5 ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	62,5 ml

Das angesetzte Medium ist circa 1 Woche haltbar und wird bei 4 °C gelagert.

2.2.1.2 Passagieren der AC16-Zellen

Bei Erreichen einer circa 95-prozentigen Konfluenz wurden die Zellen auf zwei 100er Zellkulturschalen sowie auf zwölf 30er Zellkulturschalen passagiert. Zur Durchführung der Zellpassage wurde das Zellmedium sowie (D)PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung) für 30 min im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C sowie Trypsin auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vorherigem Kreisen der 100er Zellkulturschale wurde der Überstand abgesaugt, einmalig mit 8 ml (D)PBS gespült und nach wiederholtem Absaugen circa 4 ml Trypsin appliziert. Danach erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank mit einer anschließenden lichtmikroskopischen Kontrolle. Bei vollständiger Detachierung der Zellen wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 15 ml Zellmedium gestoppt.

Die Zell-Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 900 rpm (156 xg) für 5 min zentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Pellet mit 1 ml Zellmedium resuspendiert.

Diese Zell-Suspension wurde auf die neuen Zellkulturschalen aufgeteilt: je 100 µl/1 ml auf eine 100er Zellkulturschale sowie 70 µl/1 ml auf eine 30er Zellkulturschale.

Nachdem die Zellen nach 24 h adhärent waren, wurde ein Mediumwechsel (1 ml Medium je 35er Zellkulturschale) sowie eine erneute lichtmikroskopische Kontrolle zur Überprüfung des Wachstums und der Zellmorphologie durchgeführt.

2.2.1.3 Transfektion

Circa 24 h nach der Zellpassage erfolgte die siUCP2- sowie scRNA-Transfektion der auf den 35er Zellkulturschalen befindlichen AC16-Zellen.

Unmittelbar vor der Transfektion wurde die gelöste siRNA mit OptiMEM und Lipofectamin angesetzt (s.Tabelle 12), gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 306 µl Transfektionsreagenz tröpfchenweise und in einer Konzentration von 20nM auf die Zellkulturschalen appliziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 bis 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h sowie 48 h erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle zur Überprüfung des Wachstums und der Zellmorphologie.

Tabelle 12: Ansatz für siRNA- und scRNA-Transfektion

	Komponente 1		+	Komponente 2		=	Gesamtvolumen
	siRNA	Opti-MEM		Lipofectamin	Opti-MEM		
scRNA (10 µM)	1,5 µl	150 µl		4,5 µl	150 µl		306 µl
siUCP2 (20 µM)	1,5 µl	150 µl		4,5 µl	150 µl		306 µl

2.2.1.4 Western Blot Verfahren

Zur Durchführung der Western Blots wurde das semidry-Blotting-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewandt, welches der Identifikation und Quantifizierung von Proteinen aus Zell- oder Gewebeproben dient. Es basiert auf der Kombination der elektrophoretischen Proteinauftrennung nach ihrem Molekulargewicht und einem immunologischen Nachweis zur spezifischen Darstellung der Zielproteine.

Nachfolgend werden die notwendigen Arbeitsschritte zur Untersuchung der in den AC16-Zellen und Gewebeproben exprimierten Proteine mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens dargestellt.

2.2.1.4.1 Proteinisolation aus Gewebeproben

Zur Durchführung der Proteinisolation aus Gewebeproben des Skelettmuskels wurde circa 0,03 respektive 0,1 g eines tiefgefrorenen und zuvor bei -80 °C gelagerten Gewebestückes in ein mit Keramikkügelchen befülltes Precell-Röhrchen gegeben. Danach wurden 250 µl beziehungsweise 500 µl eines Lysis-Puffers (s. Tabelle 13) hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Homogenisieren der Proben mit Hilfe des Precellys24-Systemes für jeweils 20 Sekunden bei 6.000 U/min. Danach wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte das Homogenisieren mittels Ultraschallprozessor (Hielscher Ultraschall Technologie, bei einer Amplitude von 60% sowie einem Cycle von 0,7 für circa 30 s). Nachfolgend wurden die Proben bei 4°C und 14.000 xg für 10 min zentrifugiert. Das sich im Überstand befindliche Proteinextrakt wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80 °C gelagert.

Tabelle 13: Lysis-Puffer, Ansatz für ca. 1 ml Lysis-Puffer

Chemikalie	Angabe in µl
10x Lysis Puffer	100 µl
Phenylmethylsulfonylfluorid (0,1 M PMSF)	10 µl
Aqua bidest.	900 µl

2.2.1.4.2 Proteinisolation aus AC16-Zellen

Zur Durchführung der Proteinisolation aus AC16-Zellen wurden diese nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle sowie einer 60- bis 80-prozentigen Konfluenz zu Beginn zweimalig mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium entnommen und auf jede Zellkulturschale jeweils 120 µl eines Lysis-Puffers (s. Tabelle 13) appliziert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte mittels Zellschabers eine mechanische Lösung der AC16-Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Anschließend wurden sie in ein neues Precell-Röhrchen gegeben und bis zum weiteren Vorgehen bei -80 °C gelagert.

Ein sich daran anschließender Arbeitsschritt ist das zweimalige Homogenisieren der Proben mittels Precellys24-System für jeweils 20 Sekunden bei 6.000 U/min. Danach wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine homogene Lysis mittels Ultraschallprozessor (Hielscher Ultraschall Technologie, bei einer Leistung von 60%/Pulsfrequenz von 0,7 für ca. 30 s). Darauffolgend wurden die Proben bei 4°C und 14.000 xg für 10 min zentrifugiert. Das sich im Überstand befindliche Proteinextrakt wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

Schließlich wurden 50 µl je Probe mit 25 µl Laemmli versetzt und für 5 min bei 80 °C im Heizblock denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltende SDS dient der Neutralisation der Eigenladung der Proteine, sodass die Auftrennung der Proteine während der Gelelektrophorese ausschließlich nach Molekulargewicht erfolgen kann.

Bis zur Durchführung des Western-Blots werden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebelysate erfolgte durch einen BCA-Assay. Zu Beginn wurden die Proben mit sterilem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:20 verdünnt (s. Tabelle 14 und Tabelle 15) und davon je Probe 25 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zudem wurde eine BSA-Standardreihe verwendet, um die Proteinkonzentration zu berechnen, während gleichzeitig ein Leerwert ohne Zell- oder Gewebeinhalt zur Korrektur der

Messwerte diene. Nach Zugabe von 200 µl BCA-Reagenz (s. Formel 1) pro Well wurden die Platten für wenige Sekunden auf dem Schüttler positioniert und im Anschluss für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Darauffolgend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH) gemessen. Danach wurden die Proben zur Erzielung einer einheitlichen Proteinkonzentration mit Aqua bidest. verdünnt (Gewebe 40 µg/10 µl). Nachfolgend wurden die Proben mit Laemmli-Puffer in einem Verhältnis von 1:2 versetzt sowie für 5 min bei 80 °C im Heizblock denaturiert.

Nachdem die Proben abkühlten, wurden sie bis zur Durchführung des Western-Blots bei -20 °C gelagert.

Tabelle 14: Verdünnung des Gewebelysates zur Proteinbestimmung im Verhältnis 1:20 bei einer Gewebeprobe von etwa 0,1 g

Chemikalie	Angabe in µl
Gewebelysat	10 µl
Aqua bidest.	190 µl

Tabelle 15: Verdünnung des Gewebelysates zur Proteinbestimmung im Verhältnis 1:10 bei einer Gewebeprobe von etwa 0,03 g

Chemikalie	Angabe in µl
Gewebelysat	10 µl
Aqua bidest.	90 µl

Formel 1: Ansatz des BCA-Reagenz

$$(Standards + nProben) \times (2 Replicants) \times (0,2 ml pro Well)$$

2.2.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung des NuPAGE-Systems des Herstellers Novex elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde zu Beginn aus dem konzentrierten 20x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer der benötigte 1x MOPS Laufpuffer hergestellt. Im Anschluss daran wurden die vorgefertigten Geltaschen der 4 bis 12%- bzw. 10%-Bis-Tris-Gele mit je 10 bzw. 15 Wells mit dem Laufpuffer gespült. Danach wurden die Fertiggele in die Gelkammer eingesetzt und festgeklemmt. Zudem

wurde 200 ml Laufpuffer mit 500 µl Antioxidans angesetzt und in die innere Kammer, der Raum zwischen den beiden Gelen, gegeben. In die äußere Kammer wurde mit etwa 600 ml Laufpuffer befüllt. Mittels Hamilton-Pipette erfolgte die Taschenbeladung der Gele, wobei jeweils 15 µl (für 10-well) respektive 10 µl (für 15-well) der Proben sowie 8 µl des Proteinmarkers appliziert wurden. Die elektrophoretische Auftrennung entsprechend des Molekulargewichtes der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 50 Minuten.

2.2.1.6 Western Blot

Anschließend erfolgte das Transferieren - das sogenannte Blotten - der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Zur Blotvorbereitung wurde ein Transferpuffer (siehe Tabelle 17) angesetzt. In diesem wurden nachfolgend die Filterpapiere, die Nitrozellulosemembranen sowie die Schwämme eingeweicht (s. Tabelle 17). Der Transfer erfolgte mittels Aufbau des Blotes als luftblasenfreies „Gelsandwich“, welches sich von unten nach oben wie folgt zusammensetzt: zwei Schwämme, ein Filterpapier, das Gel, die Nitrocellulosemembran, ein erneutes Filterpapier sowie drei Schwämme oben. Bei einer Durchführung eines zeitgleichen Blotes zweier Gele wurde dieses Gefüge durch einen zusätzlichen Schwamm unterteilt. Um eine Luftblasenfreiheit zu gewähren, wurden die einzelnen Schichten nach jedem Auftrag vorsichtig ausgerollt.

Das gesamte Gelsandwich wurde anschließend in das Blotmodul eingesetzt und in die innere Kammer eingespannt. In die äußere Kammer wurde etwa 600 ml destilliertes Wasser als Kühlmittel gegeben. Das Blotmodul wurde dagegen mit circa 50 ml Transferpuffer befüllt. Danach wurde durch ein einstündiges Anlegen einer Spannung von 30 V ein Proteintansfer von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erzielt.

Tabelle 16: Transfer-Puffer für 0,5 l

Chemikalie	Angabe in ml
Aqua bidest.	375 ml
Methanol	100 ml
NuPAGE Antioxidant	0,5 ml
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	25 ml

Tabelle 17: Transferpufferaufteilung

Verbrauchsmaterialien	Angabe in ml
Filterpapier	10 ml
Nitrozellulosemembran	10 ml
Schwämme	ca. 250 ml
Innere Blotkammer	50 ml

2.2.1.7 Proteindetektion

Die Detektion der Zielproteine erfolgte mit Hilfe einer immunologischen Markierung unter Verwendung spezifischer primärer Antikörper. Zur Minimierung von unspezifischen Antikörper-Bindungen wurden zu Beginn die proteinfreien Bereiche der Nitrozellulosemembran mit Proteinen gesättigt. Dies erfolgte durch eine einstündige Inkubation der Membran in mit 5 prozentigem BSA angereicherten 5 ml TBS-Puffer. Anschließend erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran in 5 ml TBS-Puffer mit 5 prozentigem BSA, 0,1-prozentigem Tween20 sowie dem entsprechenden Primärantikörper (s. Tabelle 8) über Nacht bei 4 °C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler. Danach wurde die Membran dreimal aufeinanderfolgend für je 10 Minuten in mit 0,1-prozentigem Tween20 versetzten TBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten und gegen den Primärantikörper gerichteten, sekundären Antikörper (s. Tabelle 9), sodass der Sekundär- an den Primärantikörper binden konnte. Darauffolgend wurde das dreimalige Waschen der Nitrozellulosemembran wiederholt, wobei bei dem letzten Waschgang nur TBS-Puffer ohne Tween20 verwendet wurde, bevor schließlich die Applikation der ECL-Lösung und dessen 2-minütige Inkubation zur Visualisierung der Zielproteine mittels induzierter Chemilumineszenzreaktion zwischen Substrat und der an den Antikörper-gekoppelten HRP erfolgte. Mittels Kamera-System (ChemiDoc 5000, pglab) und der dazugehörigen Software (ChemiCapt 5000) wurde die Intensität des Lumineszenzsignals erfasst. Diese ermöglichte eine semiquantitative Analyse der Zielproteine durch Densitometrie der Banden mittels der Software Quantity One. Die Proteinmenge des Zielproteins wurde hierbei stets relativ zur Menge des Housekeeping-Gens beta-Aktin bestimmt.

2.2.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Analyse der Expression von Zielgenen in AC16-Zellen und Skelettmuskelproben erfolgte durch die molekularbiologische Methode der real-time quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Hierzu wird die aus den Zell- bzw. Gewebeproben extrahierte RNA in komplementäre cDNA transkribiert. Sie basiert auf der Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts mittels zyklischer Denaturierung, Primerbindung und Elongation. Während der Amplifikation der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion erfolgt eine Echtzeitüberwachung der Produktbildung durch Fluoreszenzmessungen, wobei die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge der PCR-Produkte ist. Die initiale Menge an Ziel-DNA kann dementsprechend durch eine Standardkurve quantitativ bestimmt werden. (Livak und Schmittgen 2001b; Heinrich et al. 2022, S. 868–870; Higuchi et al. 1993)

Nachfolgend werden die relevanten Arbeitsschritte detailliert beschrieben.

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Gewebeproben

Zur Durchführung der RNA-Extraktion aus Skelettmuskelgewebe wurde zu Beginn ein ca. 0,05 bis 0,1 g schweres, bei zuvor -80°C gelagertes, tiefgefrorenes Gewebestück in ein mit Keramikkügelchen befülltes Precell-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurde 1 ml TRIzol G™ hinzu pipettiert und es erfolgte mittels Precellys24-Systems eine zweimalige Homogenisierung der Proben für jeweils 20 Sekunden bei 5.000 U/min. Danach wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben wurden bis zum Auftreten einer milchigen Trübung gevortext. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.500 U/min. Dies führte zu einer Auftrennung der Proben in drei Phasen. Die mittlere, milchige Phase enthielt die Proteine sowie die DNA, während die obere, klare Phase die RNA enthielt. Die RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und im gleichen Verhältnis mit Isopropanol gemischt, um eine Ausfällung der RNA zu erzielen. Die Proben wurden daraufhin für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 12.500 U/min für 15 Minuten. Der dabei entstandene Überstand wurde dekantiert und das zurückgebliebene RNA-Pellet in 70-prozentigem Ethanol gereinigt sowie erneut bei 4°C und 12.500 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Ethanols wurden die Proben für mindestens eine Stunde bei geöffnetem Deckel gelagert, um restliches Ethanol verdampfen zu lassen. Das gereinigte RNA-Pellet wurde je nach Größe der Gewebeprobe in circa 50 µl Aqua bidest. resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2 RNA-Isolation aus AC16-Zellen

Zur Durchführung der RNA-Extraktion aus AC16-Zellen wurde zu Beginn eine lichtmikroskopische Kontrolle der Konfluenz, der 48 h zuvor mit scRNA oder einer UCP2-siRNA inkubierten, auf 35er Zellkulturschalen befindlichen Zellen vorgenommen. Bei einer 60- bis 80-prozentigen Konfluenz wurden das Zellmedium dekantiert und die AC16-Zellen zweimalig mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden das PBS dekantiert und auf jede Zellkulturschale jeweils 1 ml TRltidy G™ appliziert. Die darauffolgende mechanische Lösung der adhären Zellen erfolgte mittels Zellschaber, wodurch die gewonnene Zellsuspension in ein neues Precell-Röhrchen überführt wurde, gevortext und bis zum weiteren Vorgehen bei -80 °C gelagert wurde.

Ein sich daran anschließender Arbeitsschritt ist das Zentrifugieren der Proben bei 4°C und 12.500 U/min für 15 Minuten. Danach wurde 200 µl Chloroform hinzu pipettiert und die Proben wurden bis zum Auftreten einer milchigen Trübung gevortext.

Darauffolgend werden dieselben Arbeitsschritte wie bei der RNA-Isolation für Gewebeproben durchgeführt (s.2.2.2.1). Zuletzt wurde das gereinigte RNA Pellet in 20 µl Aqua bidest. aufgelöst und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Quantifizierung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der Konzentration der aus dem Skelettmuskel oder AC16-Zellen isolierten RNA erfolgte photometrisch unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers (peqlab), welches bei einer Wellenlänge von 260 nm das Absorptionsmaximum aufweist. Für die Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2 µl jeder Probe auf den Sensor des Spektralphotometers pipettiert. Die angestrebte RNA-Konzentration betrug 1000 ± 200 ng/µl. Im Anschluss wurde diese durch eine Verdünnung mit Aqua bidest. auf 1 µg/µl normiert. In Abhängigkeit von der RNA-Konzentration der Proben wurden 5 µl (einfacher Ansatz), 10 µl (zweifacher Ansatz) oder 15 µl (dreifacher Ansatz) RNA für die cDNA-Synthese verwendet (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Berechnung des Ansatzes der Proben

Einfacher Ansatz	$(1000 \div \text{RNA Konzentration der Probe}) \times 1 =$ Probenmenge	→5 µl - Probenmenge=Menge an Aqua bidest.
-------------------------	--	---

Zweifacher Ansatz	$1000 \div \text{RNA Konzentration der Probe} \times 2 =$ Probenmenge	→10 µl - Probenmenge=Menge an Aqua bidest.
Dreifacher Ansatz	$(1000 \div \text{RNA Konzentration der Probe}) \times 3 =$ Probenmenge	→15 µl - Probenmenge=Menge an Aqua bidest.

2.2.2.4 cDNA-Synthese

Zur Synthese von komplementärer cDNA aus RNA mittels reverser Transkriptase wurde zunächst die Denaturierung der angesetzten RNA-Proben (s. Tabelle 18) bei 60 °C für 15 Minuten im Cyclogene Thermal Cycler (Techne) vorgenommen, sodass eine Auflösung der RNA-Sekundärstruktur sowie in ihrer linearen Form vorliegende RNA-Moleküle sichergestellt werden konnten. Im Anschluss erfolgte die Zugabe eines Reaktionsmixes im Verhältnis 1:1 (s. Tabelle 19). Die Reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde bei 37 °C für 60 Minuten durchgeführt. Während dieser Phase bindet das im Reaktionsgemisch enthaltene synthetische Oligonukleotid (Oligo dt) an den Poly-A-Schwanz der RNA und fungiert somit als Primer für die Reverse Transkriptase M-MLV-RT. Daraufhin synthetisiert die M-MLV-RT den komplementären DNA-Strang. Das resultierende Molekül ist ein RNA-DNA-Hybridmolekül. Im Anschluss folgt eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C, um die Aktivität der Transkriptase (M-MLV-RT) zu stoppen und das Enzym zu inaktivieren. Die resultierende cDNA wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und bis zur Durchführung der qPCR bei -20 °C gelagert.

Tabelle 19: Reaktionsmix für die cDNA-Synthese (einfacher Ansatz)

Chemikalie	Angabe in µl
5x FS-Puffer	2 µl
dNTP's (10 mMol/l je Nukleotid)	1 µl
DTT (0,1 mol/l)	0,5 µl
M-MLV-RT (200 U/µl)	0,3 µl
Oligo dt (0,1 mg/ml)	1 µl
RNAsin (25 U/µl)	0,2 µl

2.2.2.5 qPCR

Zu Beginn der Durchführung der qPCR wurden jeweils 3 µl der 1:10 verdünnten cDNA der Proben sowie eine Negativkontrolle (3 µl Aqua bidest.) in einer Doppelbestimmung in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Des Weiteren wurden dazu 17 µl des PCR-Mastermixes (s. Tabelle 20) hinzu pipettiert. Im Anschluss wurden die Proben in das CFX Detection System (Bio-Rad) gegeben und die für den jeweiligen Primer entsprechend angepasste Annealingtemperatur wurde in der Software CFX Maestro ausgewählt. Nachfolgend konnte die qPCR begonnen werden.

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ermöglicht die simultane Amplifikation und Quantifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts.

Zu Beginn der qPCR erfolgt eine 15-minütige Erhitzung bei 95°C für eine Enzymaktivierung. Im Anschluss erfolgt bei 95°C in 30 s die Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Danach wird die Temperatur auf eine für den jeweiligen Primer spezifische Annealingtemperatur für 30 s herabgesenkt. Dadurch können die Primer den gewünschten Genabschnitt eines einzelsträngigen Templates markieren. Bei einer anschließenden 30-sekündigen Erhöhung der Temperatur auf 72°C wird die Ziel-DNA-Sequenz mithilfe der thermostabilen Taq-Polymerase in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Diese Zyklen werden bis zum Erreichen einer ausreichenden Amplifikation i.d.R. 45-malig wiederholt. Die entstandenen DNA-Produkte bilden Doppelstränge, die durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green nachgewiesen werden. Dieser Farbstoff bindet selektiv an doppelsträngige DNA und fluoresziert nur in dieser gebundenen Form. Die Fluoreszenzintensität steigt dabei proportional zur Menge des amplifizierten Produkts. Des Weiteren erfolgt nach Abschluss der Amplifikation eine Analyse der Schmelzkurven zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte und zum Ausschluss unspezifischer Amplifikate.

Die DNA-Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der PCR, die durch den sogenannten „Schwellenwert-Zyklus“ (Ct-Wert) definiert ist, durchgeführt. Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz der PCR-Produkte erstmals die Fluoreszenz des Hintergrundwertes übersteigt. Die Auswertung wurde unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode vorgenommen. Hierbei wird der Ct-Wert des Zielgens von einem Ct-Wert eines konstitutiv exprimierten Housekeeping- bzw. Referenzgens subtrahiert (ΔCt). Dies dient der Kontrolle der Variabilität zwischen den Proben sowie der Sicherstellung von unabhängig von der Menge der eingesetzten cDNA resultierenden Ergebnissen. Da die beta-Aktin-Expression in den unterschiedlichen Probengruppen nicht beeinflusst wurde, keine signifikante Regulation aufwies und homogen exprimiert wurde, wurde das beta-Aktin (ACTB) Gen als Referenzgen gewählt. Anschließend wurde der ΔCt -Wert vom Median der Ct-Werte der Kontrollgruppe abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Dies ermöglichte den Vergleich der relativen Expression des Zielgens in

den verschiedenen Probengruppen. Die n-fache Genexpression des Zielgens im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde mit der Formel $x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet. (Livak und Schmittgen 2001a)

Zudem wurde die Primer-Effizienz freundlicherweise von Karin Westermann durch Ansetzen einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) ermittelt. Das Programm berechnete die Effizienz basierend auf den logarithmischen Verdünnungsstufen.

Tabelle 20: Reaktionsmix für die qPCR (einfacher Ansatz)

Chemikalie	Angabe in μ l
Aqua bidest.	6,4 μ l
iQ SYBR green supermix	10 μ l
Primer (10 μ Mol)	0,6 μ l

2.2.3 Histologische Arbeitsmethoden

Die Herstellung von Gewebeschnitten in Kombination mit der Dihydroethidium (DHE)-Färbung ermöglicht die Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) im Skelettmuskelgewebe.

2.2.3.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Gewebeproben wurden in TissueTek OCT-Compound eingebettet und die resultierenden Gewebestücke im Kryostat bei einer Kammertemperatur von -25°C sowie einer Objekttemperatur von -22°C im Kryostat geschnitten. Die daraus entstandenen 5 μ m dicken Gewebeschnitte wurden auf fettfreie Glasobjektträger übertragen und bis zum weiteren Vorgehen bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 DHE-Färbung

Dihydroethidium (DHE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffradikalen, insbesondere Superoxidanionen (Zhao et al. 2003). DHE reichert sich mittels Diffusion vor allem in zytoplasmatischen sowie mitochondrialen Kompartimenten der Zelle an. Bei der Reaktion von DHE mit Superoxid, wird es zu Ethidium (E^+) bzw. 2-Hydroxyethidium (2-OH-E^+) oxidiert, wodurch eine verstärkte, rote Fluoreszenz emittiert wird.

(Zhao et al. 2003; Greffe und Koopman 2021; Pearson et al. 2014) Diese Fluoreszenz kann mithilfe von Mikroskopen detektiert werden, um die Verteilung und Menge der ROS im Gewebe zu visualisieren und zu quantifizieren (Wagner und Buettner 2016). Während ROS-haltige Strukturen in Folge der Oxidation von DHE rot fluoreszieren, erscheint der Rest des Gewebes im Gegensatz dazu dunkel oder schwarz. Diese Methodik ermöglicht eine präzise Bewertung der ROS-Verteilung und -Konzentration. (Greffe und Koopman 2021; Fernandes et al. 2007; Zhao et al. 2003). Folglich ist eine DHE-Anfärbung für die Analyse pathophysiologischer Prozesse wie die des oxidativen Stresses von entscheidender Bedeutung (Zhao et al. 2003).

2.2.3.2.1 DHE-Färbung der Gewebeschnitte

Zu Beginn wurde der Farbstoff Dihydroethidium mittels 1 x PBS 1:1000 verdünnt (s. Tabelle 21). Im Anschluss wurden die jeweiligen Objektträger kurz bei Raumtemperatur angetaut, sodass die einzelnen Gewebeschnitte mittels eines Fettstiftes (Dako Cytomation Pen) umkreist werden konnten. Darauf folgend wurde die DHE-Anfärbelösung auf die Gewebeschnitte appliziert sowie bei 37°C für 5 min inkubiert, wobei ein Schnitt pro Objektträger als Negativkontrolle diente und auf welchen selektiv 1 x PBS pipettiert wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte vorsichtig mit 1 x PBS gespült und 2 Tropfen Eindickmittel (Dako Fluorescence Mounting Medium) pro Objektträger appliziert sowie mit einem Deckglässchen abgedeckt.

Tabelle 21: Verdünnungsansatz des Farbstoffes (1:1000)

Chemikalie	Angabe in µl
1 x PBS	4.995 µl
DHE-Farbstoff	5 µl

2.2.3.3 Charakterisierung des Skelettmuskelgewebes mittels histologischer Untersuchungen

Die Bildanalyse und -auswertung wurden mithilfe eines elektronischen Fluoreszenzmikroskops sowie spezifischer Softwares unter Verwendung von BZ-X800 Analyzer, BZ-X800 Image Converter, BZ-X800 Image Viewer und ImageJ (s. Tabelle 7) durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Promotionsarbeit wurden als (MW) $\pm$ Standardabweichung des Mittelwerts (SD) oder Effektgrößen mit 5 und 95% Konfidenzintervall angegeben. Die statistische Analyse wurde zunächst durch einen Zwei-Gruppen-Vergleich durchgeführt. Um die Varianzgleichheit zu überprüfen, wurde der Levene-Test eingesetzt. Basierend auf den Ergebnissen dieses Tests wurde entweder der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test oder der parametrische zweiseitige T-Test angewendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA) verwendet und ein anschließender Post-hoc-Test (Student-Newman-Keuls-Prozedur) zur Auswertung der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Statistik-Software SPSS Version 28.0. Alle Abbildungen wurden mit Hilfe der Software Excel erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression im Skelettmuskel adulter Ratten

Mit Hilfe der qPCR wurde eine Analyse zur Identifikation von Unterschieden in der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression bestimmter Marker-Gene im M. gastrocnemicus und dem M. soleus durchgeführt, um potentielle Aktivierungen pathophysiologischer Prozesse aufzudecken.

Dabei wurden jeweils die Probengruppen der ersten Serie (s. 1.8, Wildtyp WT, WT-L-Name, UCP₂-Knockout KO, KO-L-Name) sowie der zweiten Serie (s. 1.8, spontan hypertensive Ratten SHR, SHR-Laufen, Wistar, Wistar-Laufen) untersucht.

3.1.1 Vergleich der basalen Genexpression im Typ I- und II-Skelettmuskel

Zunächst wurde die Expression spezifischer Marker-Gene in den unterschiedlichen Skelettmuskeln M. gastrocnemicus und M. soleus miteinander verglichen. Hierbei kamen vor allem Marker-Gene zum Einsatz, welche in Prozessen wie dem Metabolismus des Skelettmuskels, dem oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen teilhaben (s. Tabelle 10). Dabei konnte festgestellt werden, dass der Typ II-Muskel M. gastrocnemius im Vergleich zum Typ I-Muskel M. soleus eine höhere, basale Expression von UCP2 aufwies.

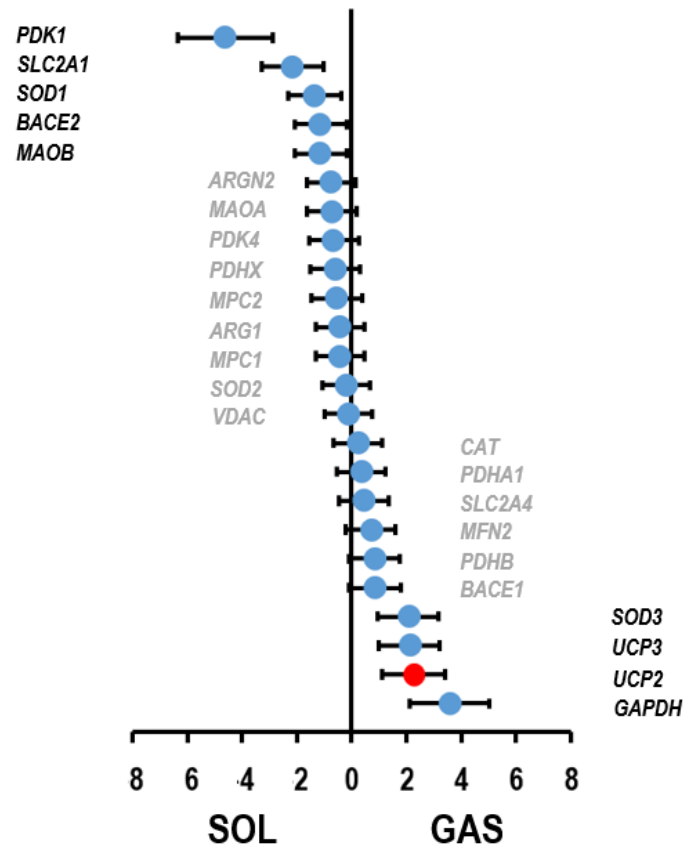


Abbildung 1: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus und M. gastrocnemius der Kontrollgruppen (WT)

Abgebildet ist der Vergleich der relativen mRNA-Expression ausgewählter, in Tabelle 10 aufgelisteter Gene der Kontrollgruppen (WT) im M. soleus (SOL) und M. gastrocnemius (GAS). Dargestellt sind Effektgrößen mit 5% und 95% Konfidenzintervall. In schwarz dargestellte Gennamen zeigen Gene die sich in der Expression mit einem p-Wert von $< 0,05$ voneinander unterscheiden (zweiseitiger T-Test; $n=10$ für beide Gruppen). In grau dargestellte Gennamen stehen für Gene deren Expressionen sich mit einem p-Wert von $> 0,05$ unterscheiden. Als Kontrollgen wurde auf Beta-Aktin normiert ($p=0,130$ im Gruppenvergleich).

Die mRNA-Expression von PDK1 (* $p < 0,001$), SLC2A1 (* $p < 0,001$), SOD1 (* $p = 0,012$), BACE2 (* $p = 0,025$), sowie MAOB (* $p = 0,027$) war im M. soleus im Vgl. zum M. gastrocnemius signifikant erhöht, während die mRNA-Expression von SOD3 (* $p < 0,001$), UCP3 (* $p < 0,001$), **UCP2** (* $p < 0,001$) und GAPDH (* $p < 0,001$), im M. gastrocnemius im Vgl. zum M. soleus signifikant erhöht war.

Die mRNA-Expressionen von PDHB ($p = 0,098$), MFN2 ($p = 0,140$), SLC2A4 ($p = 0,166$), PDHA1 ($p = 0,196$), CAT ($p = 0,239$), VDAC3 ($p = 0,334$), SOD2 ($p = 0,353$), MPC1 ($p = 0,658$), ARG1 ($p = 0,779$), MPC2 ($p = 0,607$), MAOA ($p = 0,129$), ARG2 ($p = 0,086$) sowie BACE1 ($p = 0,079$) waren nicht signifikant.

3.1.2 Auswirkungen einer spontanen Hypertension auf den Skelettmuskel adulter Ratten

Zu Beginn wurde die Expression spezifischer Marker-Gene (s. Tabelle 10) analysiert. Dafür wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Gens (normiert auf Beta-Aktin) als n-fache Expression der Kontrollgruppe (WIS) berechnet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die spontan hypertensiven (SHR) Tiere im Vergleich zu den normotensiven Wistar-Tieren (WIS)

sowohl im M. soleus, als auch im M. gastrocnemicus eine signifikante Herabregulation von UCP2, CAT, GAPDH sowie BACE2 aufwiesen. Dagegen veränderte sich die mRNA-Expression von BACE1 nicht signifikant (s. Abbildung 2 A und B). Dementsprechend war im M. soleus das exprimierte UCP2 um ca. 74 % (WIS $1,00 \pm 0,25$ -fach bzw. SHR $0,26 \pm 0,06$ -fach), CAT um ca. 44 % (WIS $1,00 \pm 0,27$ -fach bzw. SHR $0,56 \pm 0,31$ -fach), GAPDH um ca. 35 % (WIS $1,00 \pm 0,31$ -fach bzw. SHR $0,65 \pm 0,23$ -fach) und BACE2 um ca. 42 % (WIS $1,00 \pm 0,23$ -fach bzw. SHR $0,58 \pm 0,20$ -fach) gesunken. Die BACE1-mRNA war dagegen ($1,36 \pm 0,23$ -fach bzw. SHR $0,58 \pm 0,20$ -fach) gesunken. Die BACE1-mRNA war dagegen ($1,36 \pm 0,59$ -fach) gegenüber der Kontrollgruppe WIS ($1,00 \pm 0,50$) im Mittel um ca. 36 % erhöht.

Im M. gastrocnemicus war das exprimierte UCP2 um ca. 71 % (WIS $1,00 \pm 0,27$ -fach bzw. SHR $0,29 \pm 0,07$ -fach), CAT um ca. 30 % (WIS $1,00 \pm 0,22$ -fach bzw. SHR $0,70 \pm 0,24$ -fach), GAPDH um ca. 23 % (WIS $1,00 \pm 0,19$ -fach bzw. SHR $0,77 \pm 0,18$ -fach) und BACE2 um ca. 23 % (WIS $1,00 \pm 0,23$ -fach bzw. SHR $0,77 \pm 0,21$ -fach) reduziert. Die BACE1-mRNA war dagegen ($1,14 \pm 0,43$ -fach) gegenüber der Kontrollgruppe WIS ($1,00 \pm 0,26$) im Mittel um ca. 14 % erhöht.

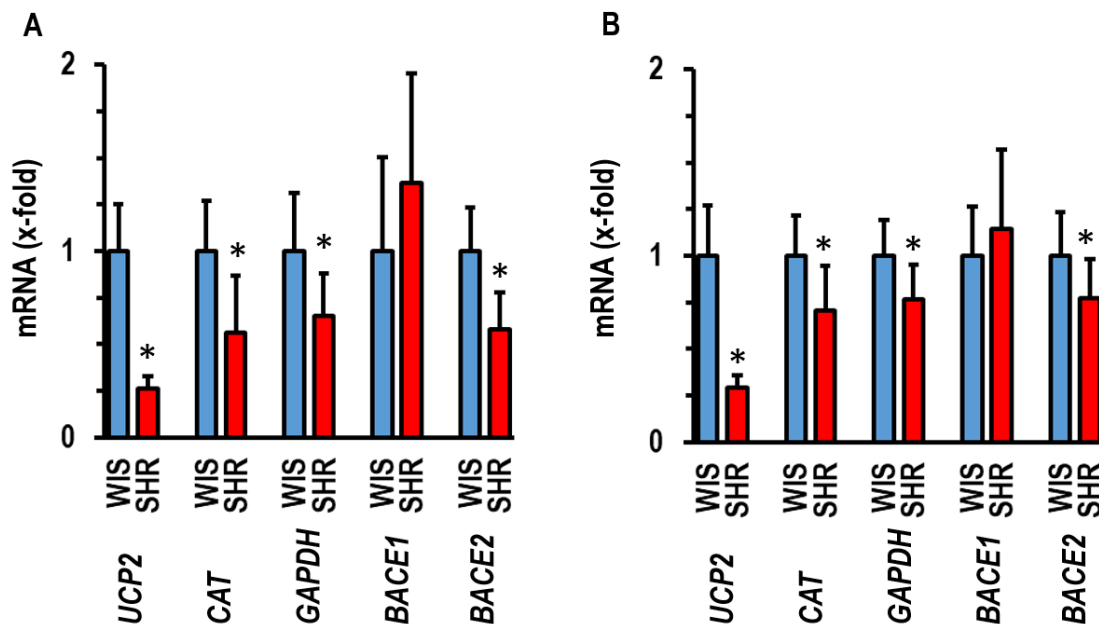


Abbildung 2: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der Kontrollgruppe Wistar (WIS) und der spontan hypertensiven Gruppe (SHR)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression von ausgewählten, in Tabelle 10 aufgelisteten Genen UCP2, CAT, GAPDH, BACE1 und BACE2 im M. soleus (A) sowie im M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wistar- (blauer Balken) sowie der spontan hypertensiven Ratten (roter Balken). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WIS ($n=12$ für beide Rattenstämme). Die mRNA Expressionen wurden normiert auf Beta-Aktin.

Die mRNA-Expression von UCP2 (A: * $p < 0,001$; B: * $p < 0,001$), CAT (A: * $p = 0,006$; B: * $p = 0,005$), GAPDH (A: * $p = 0,002$; B: * $p = 0,009$) und BACE2 (A: * $p < 0,001$; B: * $p = 0,011$) war bei den SHR-Tieren im Vgl. zu den WIS-Tieren sowohl im M. soleus (A) als auch im M. gastrocnemicus (B) signifikant reduziert, während BACE1 (A: $p = 0,099$; B: $p = 0,385$) sich bei beiden Muskeln nicht signifikant änderte.

Mit Hilfe einer quantitativen Fluoreszenzanalyse wurde eine Visualisierung sowie Quantifizierung der Verteilung der im Gewebe enthaltenen ROS ermöglicht. Beide Muskeln, Typ I sowie Typ II, wiesen im Hochdruckmodell (SHR) oxidativen Stress (DHE-Staining) auf, welcher bei einer DHE-Färbung histologisch durch eine verstärkte, emittierte, rote Fluoreszenz zu erkennen war. Dabei konnte festgestellt werden, dass das DHE-Staining beider Muskeln in der SHR-Gruppe (s. Abbildung 3) im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe signifikant erhöht war.

Im M. soleus erhöhte sich das DHE-Staining bei den SHR-Tieren um ca. 117 % (WIS $7,255635 \pm 2,054988$ -fach bzw. SHR $15,728769 \pm 3,716009$ -fach), während der M. gastrocnemicus eine Steigerung von ca. 89 % (WIS $9,522812 \pm 3,180833$ -fach bzw. SHR $17,970815 \pm 3,848644$ -fach) aufwies.

Zusammenfassend ging die Herabregulation von UCP2 bei einer vorliegenden essentiellen Hypertonie im Langzeitmodell mit einer Reduktion des antioxidativen Potenzials und daraus resultierendem oxidativem Stress einher, welcher von einer verminderten GAPDH-Expression begleitet wurde.

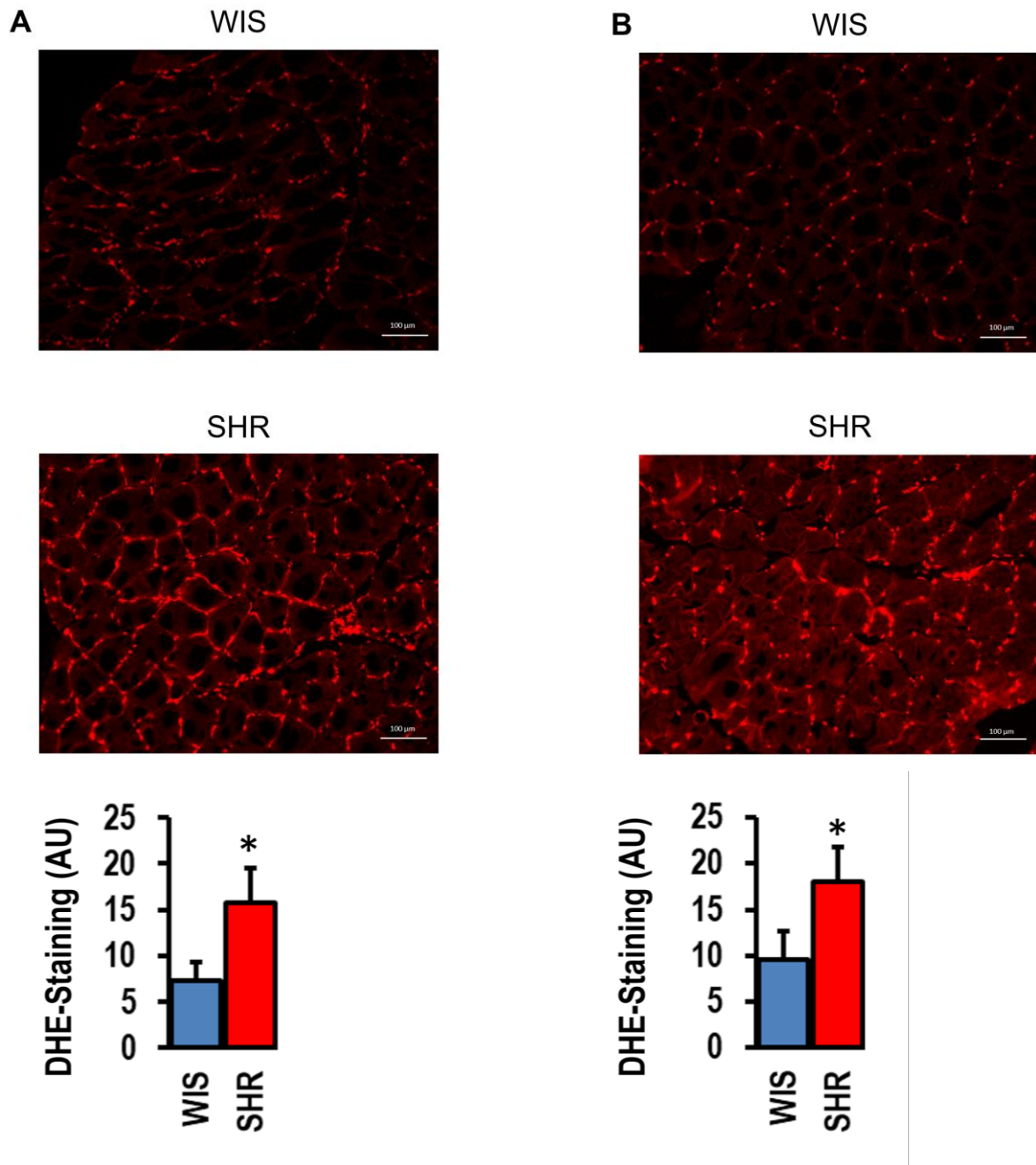


Abbildung 3: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wistar- (WIS) und der spontan hypertensiven Gruppe (SHR)

Abgebildet sind Originalbilder von Gewebeschnitten mit DHE-Färbung und die dazu korrelierende quantitative Auswertung (DHE-Staining) des M. soleus (**A**) und des M. gastrocnemicus (**B**) der normotensiven Wistar- (blauer Balken) sowie der SHR-Tiere (roter Balken). Das DHE-Staining war in beiden Muskeln in der SHR-Gruppe (**A**: * $p < 0,001$; **B**: * $p < 0,001$) im Vgl. zur Wistar-Gruppe signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WIS ($n=60$; $N=3$).

3.1.3 Auswirkungen einer UCP2-Deletion auf den Skelettmuskel adulter Ratten

Zu Beginn wurde die Expression spezifischer Marker-Gene (s. Tabelle 10) der Probenserie WT, WT-L-Name, UCP2-Knockout KO sowie KO-L-Name analysiert. Dafür wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Gens (normiert auf Beta-Aktin) als n-fache Expression der Kontrollgruppe berechnet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich aufgrund der Deletion von UCP2 die mRNA-Expression von PDHA1, MFN2, MAOA und PDK4 in beiden Muskeln erhöhte (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Folglich war das im M. soleus exprimierte PDHA1 um ca. 95 % (WT $1,14 \pm 0,39$ -fach bzw. KO $2,09 \pm 0,80$ -fach), MFN2 um ca. 80 % (WT $1,26 \pm 0,79$ -fach bzw. KO $2,06 \pm 1,02$ -fach), MAOA um ca. 46 % (WT $0,99 \pm 0,27$ -fach bzw. KO $1,45 \pm 0,49$ -fach) und PDK4 um ca. 71 % (WT $1,08 \pm 0,55$ -fach bzw. KO $1,79 \pm 0,91$ -fach) heraufreguliert (s. Abbildung 4).

Im M. gastrocnemicus dagegen war das exprimierte PDHA1 um ca. 133% (WT $0,96 \pm 0,33$ -fach bzw. KO $2,29 \pm 0,70$ -fach), MFN2 um ca. 61 % (WT $1,05 \pm 0,25$ -fach bzw. KO $1,64 \pm 0,51$ -fach), MAOA um ca. 75 % (WT $1,08 \pm 0,29$ -fach bzw. KO $1,83 \pm 0,49$ -fach) und PDK4 um ca. 75 % (WT $0,97 \pm 0,26$ -fach bzw. KO $1,58 \pm 0,59$ -fach) heraufreguliert. Des Weiteren war im M. gastrocnemius die SLC2A1-mRNA (KO $1,58 \pm 0,59$ -fach) gegenüber der Kontrollgruppe (WT $0,97 \pm 0,26$ -fach) um ca. 61 % stärker exprimiert (s. Abbildung 5).

Die UCP2-Deletion bewirkte dementsprechend eine verstärkte mRNA-Expression von Genen, die mit dem Glykosestoffwechsel in beiden Muskeln verbunden sind, sodass es zu einer metabolischen Annäherung zwischen dem Typ I-Muskel M. soleus sowie dem Typ-II-Muskel M. gastrocnemius kam (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

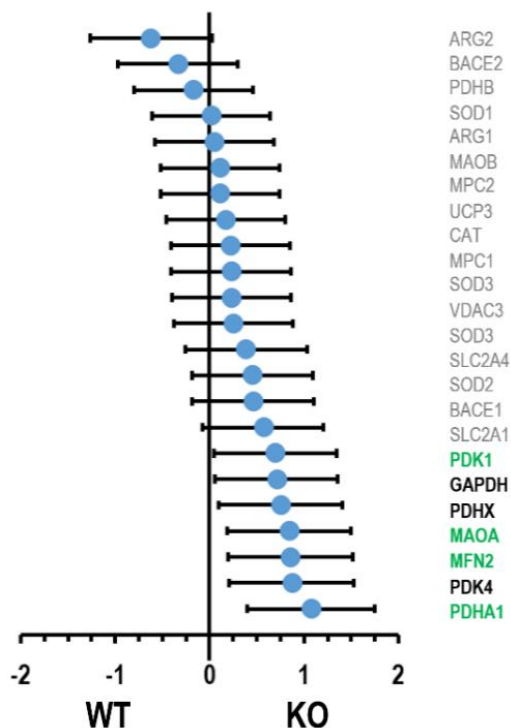


Abbildung 4: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression (normiert auf betaAktin) von den in Tabelle 10 aufgelisteten, spezifischen Marker-Genen im M. soleus der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO) (normiert auf den Median der Kontrollgruppe). Die mRNA-Expression von PDK1 (* p= 0,040), GAPDH (* p= 0,036), PDHX (* p= 0,018), MAOA (* p= 0,013), MFN2 (* p=0,045), PDK4 (* p= 0,010) sowie PDHA1 (* p= 0,012) ist in der KO-Gruppe im Vgl. zur WT-Gruppe signifikant erhöht.

Die mRNA-Expression von ARG2 (p= 0,014), BACE2 (p= 0,683), PDHB (p= 0,240), SOD1 (p= 0,679), ARG1 (p= 0,914), MAOB (p= 0,943), MPC2 (p= 0,526), UCP3 (p= 0,04), CAT (p= 0,658), MPC1 (p= 0,461), VDAC3 (p= 0,192), SOD3 (p= 0,762), SLC2A4 (p= 0,507), SOD2 (p= 0,122), BACE1 (p= 0,198) sowie SLC2A1 (p= 0,369) waren nicht signifikant.

Dargestellt als MW ± SD; Ktr. n= 10.

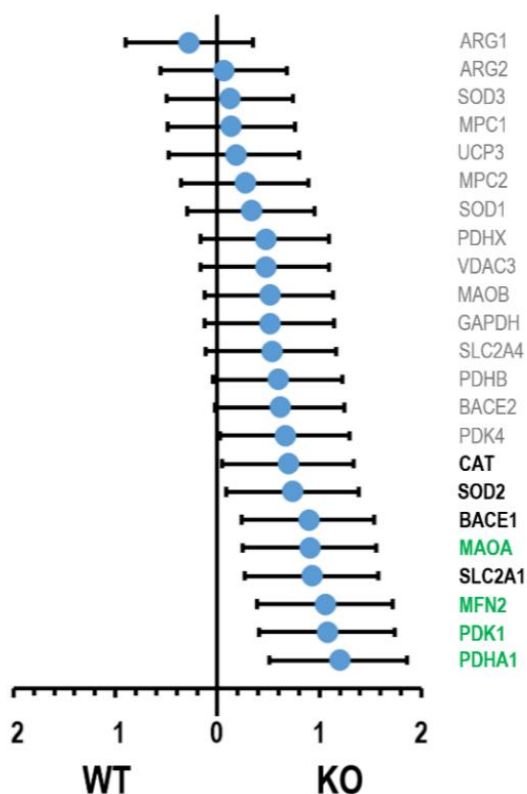


Abbildung 5: Analyse der mRNA-Expression im M. gastrocnemius der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression (normiert auf betaAktin) von den in Tabelle 10 aufgelisteten, spezifischen Marker-Genen im M. gastrocnemius der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO) (normiert auf den Median der Kontrollgruppe). Die mRNA-Expression von CAT (* p< 0,001), SOD2 (* p= 0,012), BACE1 (* p= 0,012), MAOA (* p= 0,001), SLC2A1 (* p= 0,009), MFN2 (* p= 0,012), PDK1 (*p= 0,008) sowie PDHA1 (* p< 0,001) ist in der KO-Gruppe im Vgl. zur WT-Gruppe signifikant erhöht.

Die mRNA-Expression von ARG2 (p= 0,759), SOD3 (p= 0,669), MPC1 (p= 0,860), UCP3 (p= 0,244), MPC2 (p= 0,786), SOD1 (p= 0,595), PDHX (p= 0,387), VDAC3 (p= 0,428), MAOB (p= 0,056), GAPDH (p= 0,411), SLC2A4 (p= 0,174), PDHB (p= 0,080), BACE2 (p= 0,142), PDK4 (p= 0,101) waren nicht signifikant. Dargestellt als MW ± SD; Ktr. n= 10.

Außerdem wies der M. soleus bei einer Deletion von UCP2 eine signifikante Heraufregulation von GAPDH (WT 1,0 ± 0,38-fach bzw. KO 1,35 ± 0,60-fach) und nicht-signifikante mRNA-Expressionen von CAT (WT 1,0 ± 1,43-fach bzw. KO 1,25 ± 0,70-fach), BACE1 (WT 1,0 ±

0,80-fach bzw. KO $1,56 \pm 1,47$ -fach) sowie BACE2 (WT $1,0 \pm 0,32$ -fach bzw. KO $0,90 \pm 0,25$ -fach) gegenüber der Kontrollgruppe auf (s. Abbildung 6 A), während der M. gastrocnemicus eine signifikante Heraufregulation von CAT um ca. 38 % (WT $1,0 \pm 0,35$ -fach bzw. KO $1,38 \pm 0,68$ -fach) und BACE1 um ca. 48 % (WT $1,0 \pm 0,44$ -fach bzw. KO $1,48 \pm 0,60$ -fach) aufzeigte. Die mRNA-Expression von GAPDH (WT $1,0 \pm 0,28$ -fach bzw. KO $1,16 \pm 0,35$ -fach) sowie BACE2 (WT $1,0 \pm 0,19$ -fach bzw. KO $1,12 \pm 0,19$ -fach) blieben im M. gastrocnemicus unbeeinflusst (s. Abbildung 6 B). Dieser Effekt könnte auf die unter physiologischen Bedingungen höhere basale Expression von UCP2 zurückzuführen sein.

Eine Quantifizierung der Verteilung der im Gewebe enthaltenen ROS wurde mittels DHE-Färbung sowie quantitativer Fluoreszenzanalyse durchgeführt, wobei beide Muskeln bei einer UCP2-Deletion gegenüber der Kontrollgruppe WT einen signifikanten Anstieg oxidativen Stresses (DHE-Staining) aufzeigten.

Im M. soleus war ein Anstieg von ca. 13 % (WT $11,513582 \pm 2,625442$ -fach bzw. KO $12,97977 \pm 3,889486$ -fach) zu beobachten (s. Abbildung 7 A), während im M. gastrocnemicus die ROS-Menge um ca. 96 % (WT $9,773792 \pm 2,885782$ -fach bzw. KO $19,121724 \pm 3,494618$ -fach) gestiegen war (s. Abbildung 7 B).

Dementsprechend reichte eine verstärkte mRNA-Expression von CAT unter normotensiven Bedingungen nicht aus, den durch eine genetische Deletion von UCP2 ausgelösten oxidativen Stress zu kompensieren. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung eines genetischen Modells (UCP2-Knockout Ratte) das Fehlen von UCP2 alleine mit oxidativem Stress assoziiert ist, auch wenn die Deletion von UCP2 von einer kompensatorischen Heraufregulation antioxidativer Enzyme begleitet ist (CAT, SOD2). Zudem bedingte die Deletion von UCP2 eine Heraufregulation der mRNA-Expression von BACE1.

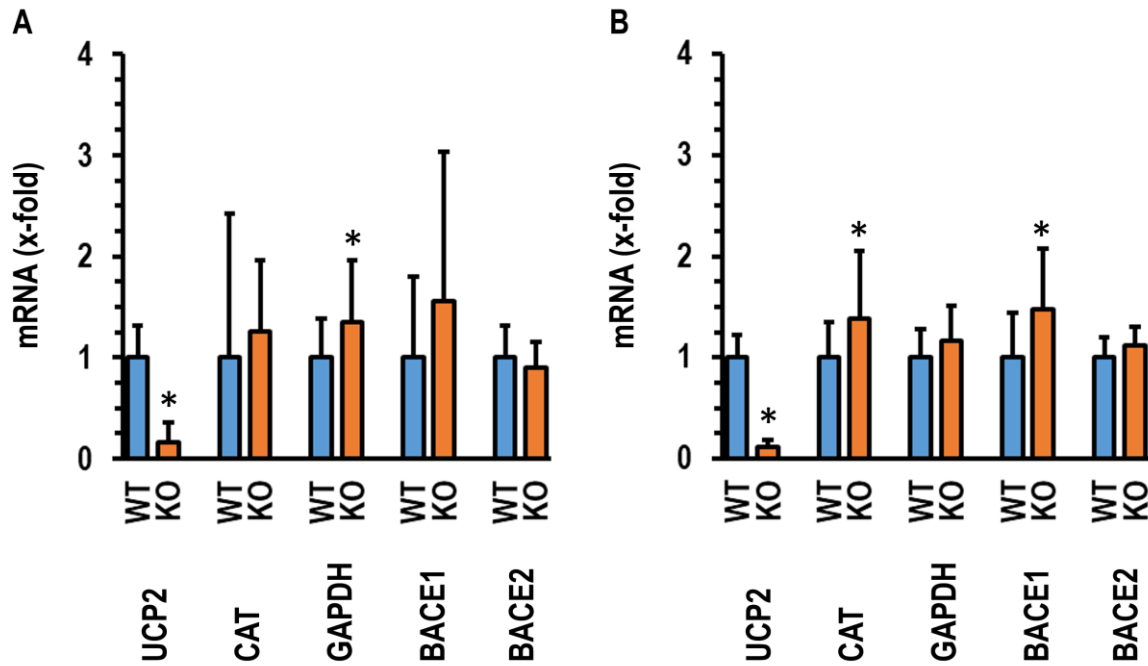


Abbildung 6: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wildtyp-Ratten (WT) und der normotensiven, UCP2-defizienten Ratten (KO)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression ausgewählter, in Tabelle 10 aufgelisteter Gene UCP2, CAT, GAPDH, BACE1 und BACE2 (normiert auf den Median der Kontrollgruppe) im M. soleus (A) sowie M. gastrocnemicus (B) im Vergleich der normotensiven WT- (blauer Balken) sowie der normotensiven KO-Tiere (orangener Balken) (je Rattenstamm n=10). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WIS.

Die mRNA-Expression von UCP2 (A: * $p < 0,001$; B: * $p < 0,001$) ist in beiden Muskeln der KO-Tiere aufgrund der genetischen UCP2-Deletion signifikant herabreguliert. CAT (A: $p = 0,494$; B: * $p = 0,014$) und BACE1 (A: $p = 0,153$; B: * $p = 0,006$) sind dagegen ausschließlich im M. gastrocnemicus (B) der KO-Tiere signifikant heraufreguliert, während sie im M. soleus (A) unbeeinflusst bleiben. GAPDH (A: * $p = 0,036$; B: $p = 0,122$) ist ausschließlich im M. soleus signifikant heraufreguliert, während es im M. gastrocnemicus unbeeinflusst bleibt. BACE2 (A: $p = 0,316$; B: $p = 0,061$) weist in beiden Muskeln in der KO-Gruppe keinen signifikanten Unterschied auf.

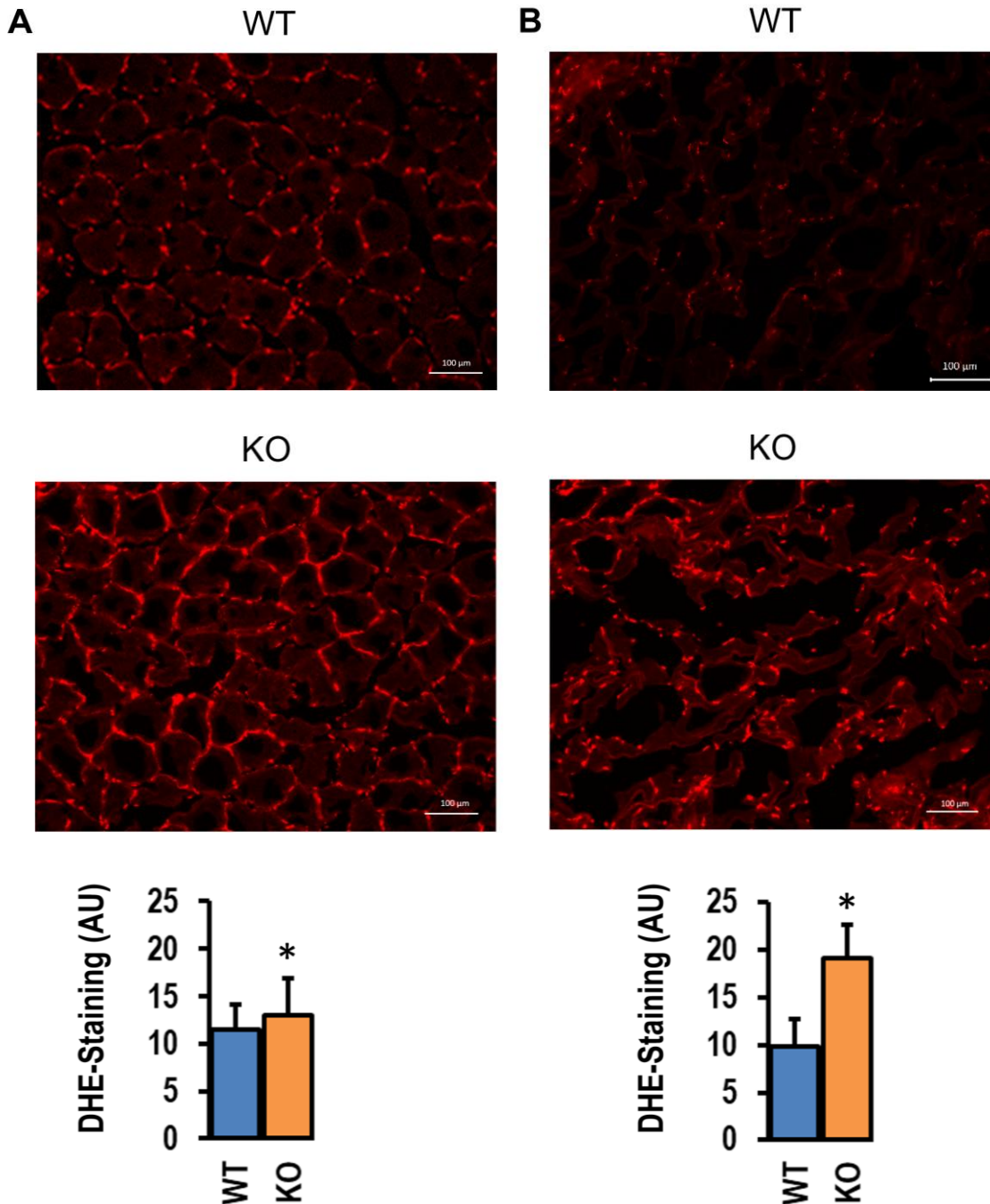


Abbildung 7: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wildtyp-Ratten (WT) und der normotensiven, UCP2-defizienten Ratten (KO)

Abgebildet sind Originalbilder von Gewebeschnitten mit DHE-Färbung und die dazu korrelierende quantitative Auswertung (DHE-Staining) des M. soleus (A) und des M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wildtyp- (blauer Balken) sowie der normotensiven UCP2-defizienten Tiere (KO) (orangener Balken). Das DHE-Staining war in beiden Muskeln bei den KO-Tieren (A: * $p=0,018$; B: * $p<0,001$) im Vgl. zu den WT-Tieren signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p<0,05$ vs. WIS ($n=20$; $N=3$).

3.1.4 Auswirkungen einer L-Name-Gabe auf den Skelettmuskel adulter Ratten

Drauffolgend wurde die Expression der Gene UCP2, CAT, GAPDH, BACE1 und BACE2 (s. Tabelle 10) der Wildtyp- sowie UCP2-defizienten Tiere unter Gabe von L-Name untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass im M. soleus bei einer L-Name Gabe und einer gleichzeitigen UCP2-Deletion die mRNA-Expression von CAT im Vgl. zu den Wildtyp-Tieren unter L-Name-Gabe um ca. 86 % (WT $1,00 \pm 0,24$ -fach bzw. KO $1,86 \pm 0,17$ -fach) nicht-signifikant heraufreguliert wurde, während sich GAPDH (WT $1,00 \pm 0,28$ -fach bzw. KO $1,27 \pm 0,66$ -fach), BACE1 (WT $1,0 \pm 0,47$ -fach bzw. KO $2,56 \pm 2,57$ -fach) und BACE2 (WT $1,00 \pm 0,26$ -fach bzw. KO $0,97 \pm 0,27$ -fach) nicht signifikant zu den Wildtyp-Tieren unter L-Name Gabe unterschieden (s. Abbildung 8 A).

Im M. gastrocnemicus waren bei keinem der genannten Primer signifikante Unterschiede zu erkennen (s. Abbildung 8 B). Folglich war die mRNA-Expression von CAT (WT $1,00 \pm 0,36$ -fach bzw. KO $0,96 \pm 0,45$ -fach), GAPDH (WT $1,00 \pm 0,22$ -fach bzw. KO $1,12 \pm 0,41$ -fach), BACE1 (WT $1,00 \pm 0,44$ -fach bzw. KO $1,22 \pm 0,65$ -fach) und BACE2 (WT $1,00 \pm 0,18$ -fach bzw. KO $1,04 \pm 0,18$ -fach) nicht wesentlich bzw. signifikant verändert.

Im Anschluss wurde ebenso das im Gewebe enthaltene ROS mittels DHE-Färbung sowie quantitativer Fluoreszenzanalyse quantifiziert.

Dabei konnte festgestellt werden, dass in beiden Muskeln die Deletion von UCP2 einen signifikanten Anstieg von oxidativem Stress (DHE-Staining) gegenüber der WT-L-Name-Tiere auslöste.

Im M. soleus war ein Anstieg von ca. 56 % (WT-L-Name $12,06292 \pm 3,391546$ -fach bzw. KO-L-Name $18,779348 \pm 5,613399$ -fach) zu beobachten (s. Abbildung 9 A), während im M. gastrocnemicus die ROS-Menge um ca. 88 % (WT-L-Name $10,872073 \pm 2,062878$ -fach bzw. KO-L-Name $20,440306 \pm 5,120217$ -fach) gestiegen war (s. Abbildung 9 B).

Trotz einer Heraufregulation von CAT im M. soleus (s. Abbildung 8 A), reichte unter hypertensiven Bedingungen eine genetische Deletion von UCP2 aus, um oxidativen Stress auszulösen. Folglich konnte auch unter L-Name Gabe die gesteigerte Expression von CAT den oxidativen Stress aufgrund des UCP2-Knockouts nicht kompensieren (s. Abbildung 9).

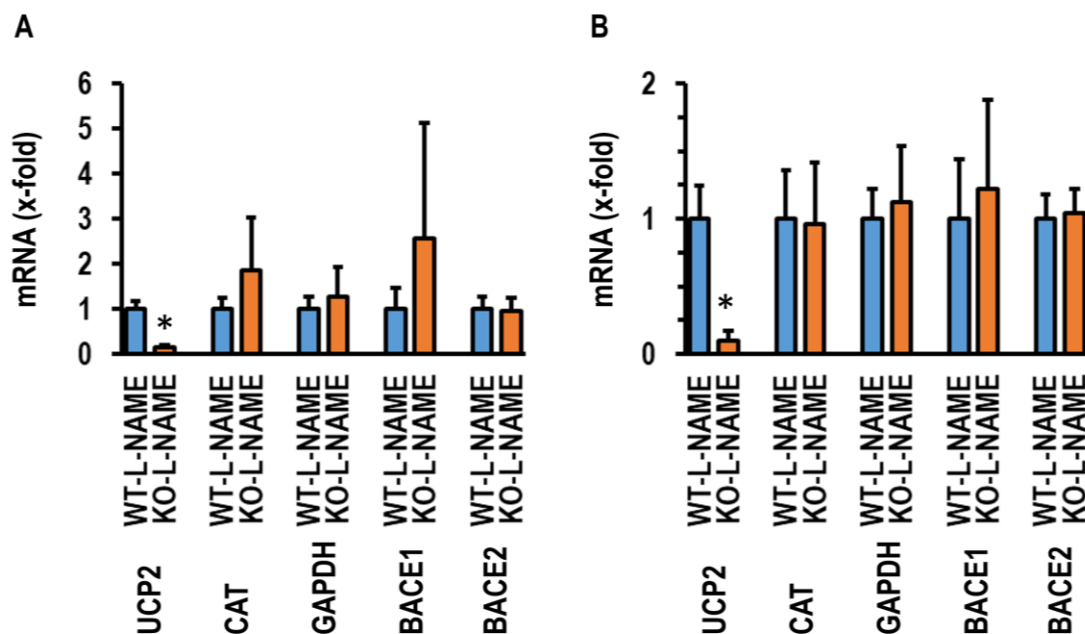


Abbildung 8: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der hypertensiven Wildtyp-Tiere (WT-L-Name) und der hypertensiven, UCP2-defizienten Tiere (KO-L-Name)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression ausgewählter, in Tabelle 10 aufgelisteter Gene UCP2, CAT, GAPDH, BACE1 und BACE2 (normiert auf den Median der Kontrollgruppe) im M. soleus (A) sowie M. gastrocnemicus (B) im Vergleich der WT-L-Name- (blauer Balken) sowie der KO-L-Name-Tiere (orangener Balken) (je Rattenstamm n=10). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, p<0,05 vs. WIS. Die mRNA-Expression von UCP2 (A: * p<0,001; B: * p<0,001) war in beiden Muskeln (A, B) der KO-L-Name-Tiere aufgrund der genetischen UCP2-Deletion signifikant herabreguliert. CAT (A: p=0,072; B: p=0,834) war dagegen ausschließlich im M. soleus (A) nicht-signifikant heraufreguliert, während sie im M. gastrocnemicus (B) unbeeinflusst bleibt. Die KO-L-Name-Tiere wiesen in beiden Muskeln bei GAPDH (A: p=0,295; B: p=0,475), BACE1 (A: p=0,127; B: p=0,421) sowie BACE2 (A: p=0,770; B: p=0,643) keine signifikanten Unterschiede auf.

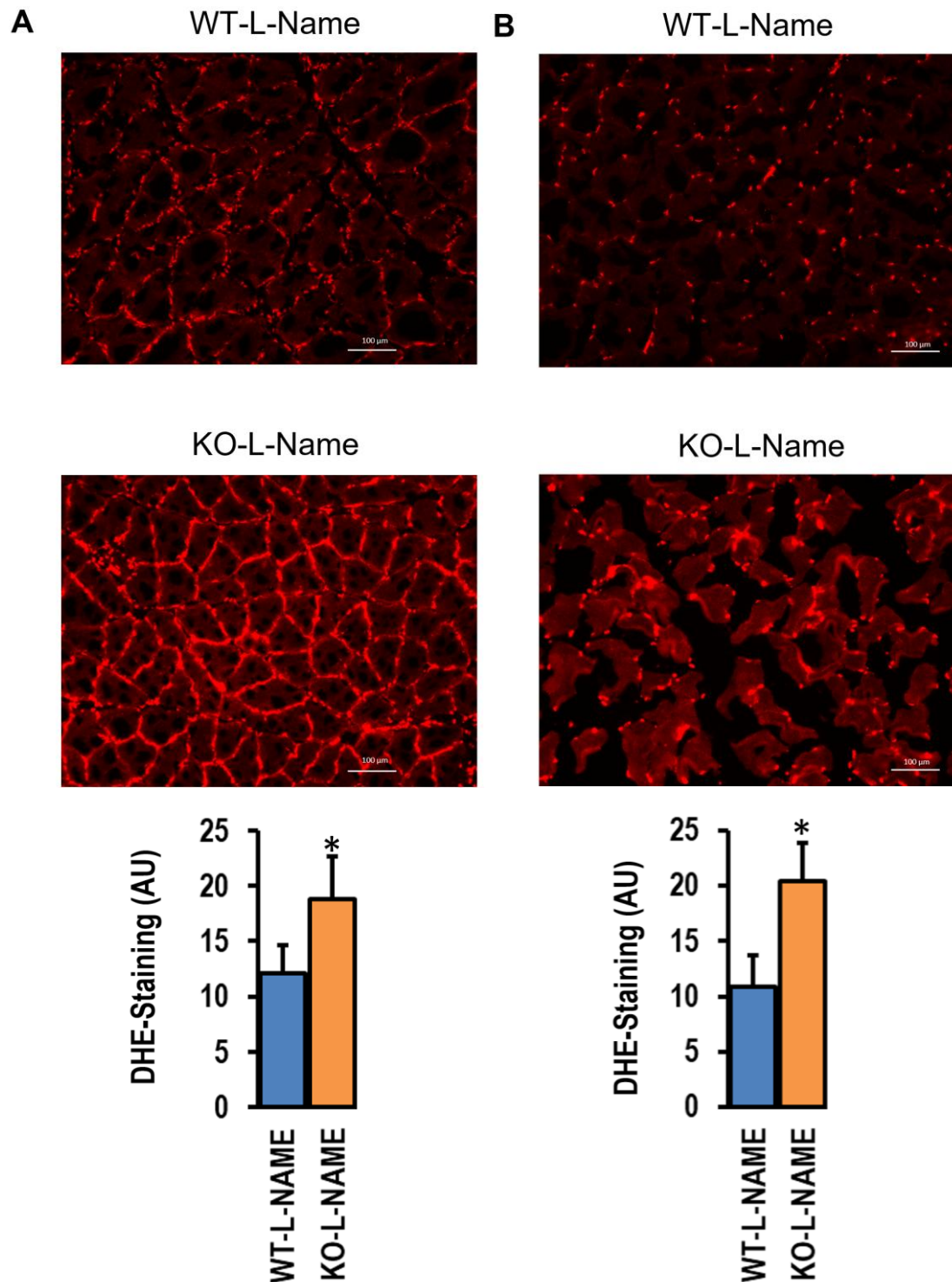


Abbildung 9: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemius (B) der hypertensiven Wildtyp-Tiere (WT-L-Name) und der hypertensiven, UCP2-defizienten Tiere (KO-L-Name)

Abgebildet sind Originalbilder von Gewebeschnitten mit DHE-Färbung und die dazu korrelierende quantitative Auswertung (DHE-Staining) des M. soleus (A) und des M. gastrocnemius (B) der WT-L-Name- (blauer Balken) sowie der KO-L-Name-Tiere (orangener Balken). Das DHE-Staining war in beiden Muskeln bei den KO-L-Name-Tieren (A: * $p < 0,001$; B: * $p < 0,001$) im Vgl. zu den WT-L-Name-Tieren signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WIS ($n=20$; $N=3$).

3.1.5 Posttranskriptionelle Regulation von BACE1 im Skelettmuskel adulter Ratten

Zur Untersuchung, ob sich das Expressionsmuster von BACE1 ebenfalls auf Proteinebene widerspiegelt, wurde die Proteinsynthese von BACE1 im M. soleus und M. gastrocnemicus mittels Western-Blot Verfahren untersucht, wobei Aktin sowie GAPDH als Beladungskontrolle herangezogen wurden.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, war in der WT-L-Name-Probengruppe im M. gastrocnemicus BACE1 unwesentlich herabreguliert. Mit Hilfe der densitometrischen Quantifizierung konnte im M. gastrocnemicus in der WT-L-Name-Probengruppe eine nicht-signifikante Herabregulation der relativen BACE1-Proteinsynthese (normiert auf Beta-Aktin und den Mittelwert der Kontrollen) auf $93,6 \pm 30,3$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($95,8 \pm 10,2$ %) erfasst werden (s. Abbildung 10). Im M. soleus in derselben Probengruppe wurde eine nicht-signifikante Heraufregulation der relativen BACE1-Proteinsynthese (normiert auf GAPDH und den Mittelwert der Kontrollen) auf $103,3 \pm 33,5$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($92,5 \pm 15,7$ %) beobachtet (s. Abbildung 11).

In der KO-Probengruppe konnte mittels densitometrischen Quantifizierung eine nicht-signifikante Heraufregulation der relativen BACE1-Proteinsynthese (normiert auf Beta-Aktin und den Mittelwert der Kontrollen) auf $111,5 \pm 12,2$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($95,8 \pm 10,2$ %) erfasst werden (s. Abbildung 10). Im M. soleus in derselben Probengruppe wurde ebenso die relative BACE1-Proteinsynthese (normiert auf GAPDH und den Mittelwert der Kontrollen) nicht-signifikant auf $136,5 \pm 19,3$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($92,5 \pm 15,7$ %) heraufreguliert (s. Abbildung 11).

In der KO-L-Name-Probengruppe im M. gastrocnemicus wurde BACE1 im Vergleich zu den restlichen Probengruppen deutlich herabreguliert. Mit Hilfe der densitometrischen Quantifizierung konnte im M. gastrocnemicus in der KO-L-Name-Probengruppe eine signifikante Reduktion der relativen BACE1-Proteinsynthese (normiert auf Beta-Aktin und den Mittelwert der Kontrollen) auf $46,4 \pm 17,4$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($95,8 \pm 10,2$ %) erfasst werden (s. Abbildung 10), während im M. soleus in derselben Probengruppe eine nicht-signifikante, geringe Heraufregulation der relativen BACE1-Proteinsynthese (normiert auf GAPDH und den Mittelwert der Kontrollen) auf $110,3 \pm 18,4$ % gegenüber der Kontrollgruppe WT ($92,5 \pm 15,7$ %) beobachtet wurde (s. Abbildung 11). Folglich wurde BACE1 posttranskriptionell im M. gastrocnemius herabreguliert, wenn sich die Blutdruckbelastung und die Deletion von UCP2 addierten. Zusammenfassend war der Effekt der Herabregulation von BACE1 nur mittels Western-Blot zu beobachten. Zudem war der Effekt im M. gastrocnemicus

vermutlich stärker zu beobachten, da dieser im Vergleich zum M. soleus eine erhöhte basale Genexpression von UCP2 aufwies (s. Abbildung 1).

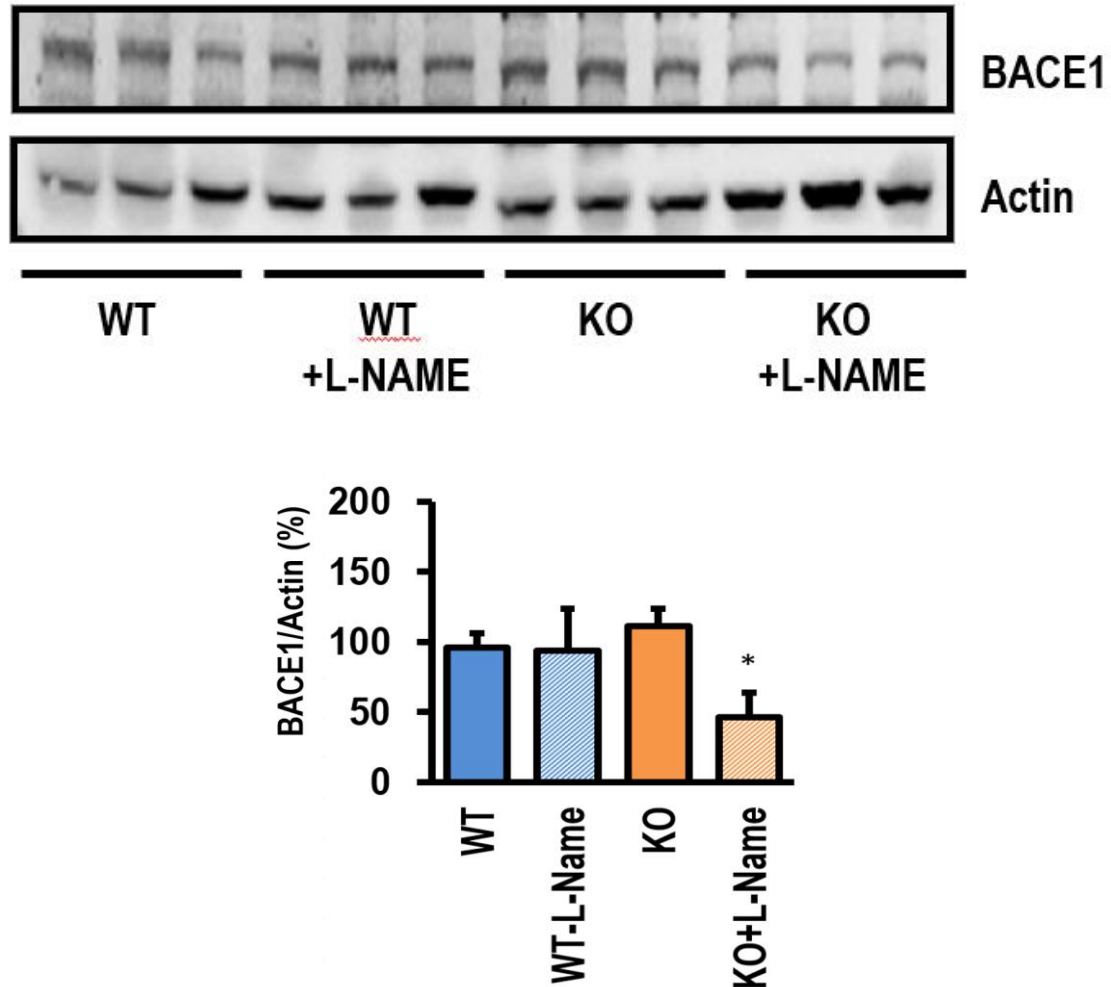


Abbildung 10: Analyse der Proteinsynthese von BACE1 in normotensiven und hypertensiven Wildtyp Ratten (WT und WT+L-NAME) und normotensiven und hypertensiven UCP2-defizienten Ratten (KO und KO+L-NAME) im M. gastrocnemius (A)

Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot von BACE1 (55 kDa) im M. gastrocnemius von WT-, WT+L-Name-, KO- sowie KO+L-Name-Tieren. Aktin (42 kDa) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Die densitometrische Quantifizierung der relativen BACE1 Proteinmenge wurde auf die relative Proteinmenge von Aktin und den Mittelwert der Kontrollen bezogen. Die Proteinsynthese von BACE1 war im M. gastrocnemius bei den KO-L-Name-Tieren signifikant reduziert (* $p < 0,001$), während die restlichen Probengruppen keine signifikanten Regulationen aufwiesen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WT ($n=3$)

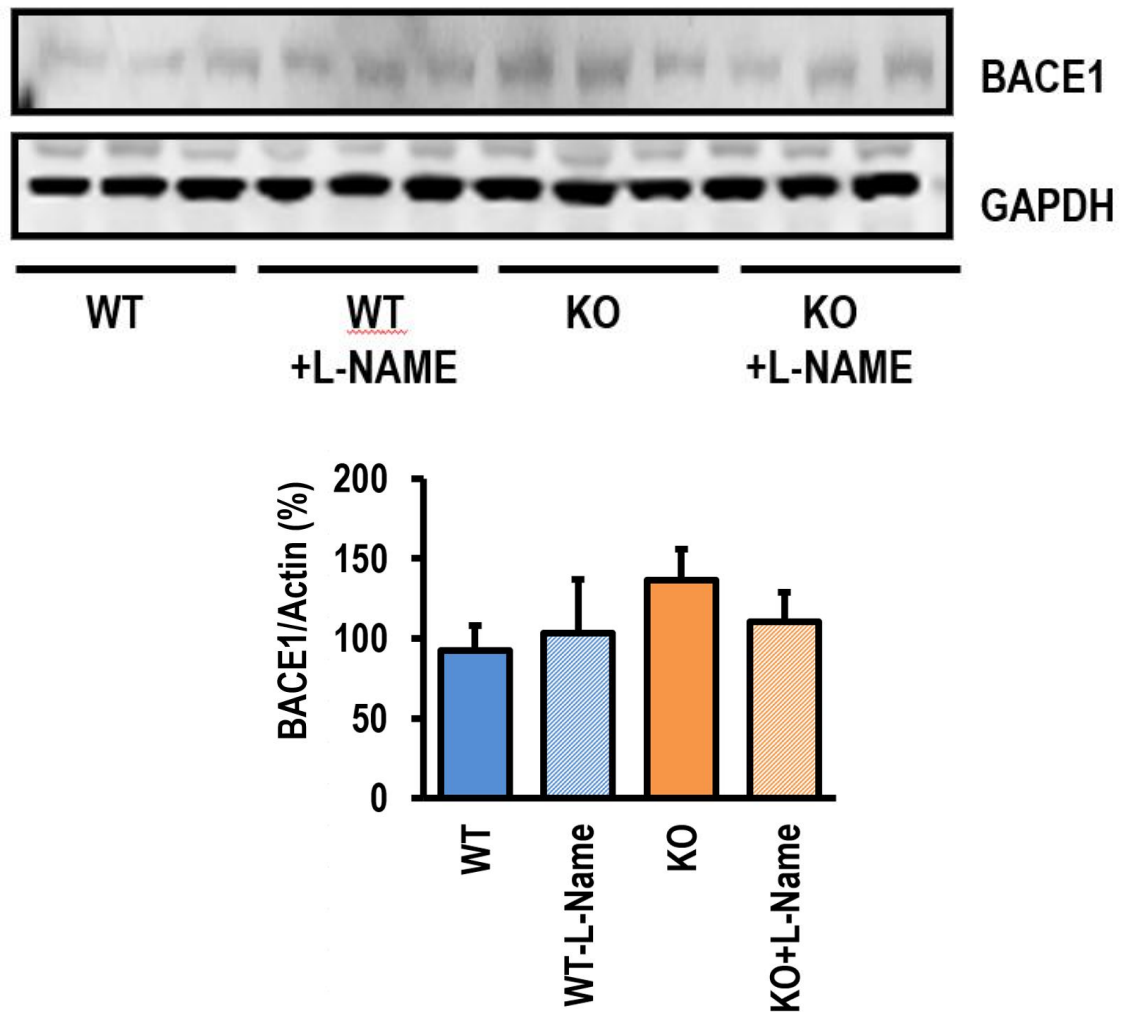


Abbildung 11: Analyse der Proteinsynthese von BACE1 in normotensiven und hypertensiven Wildtyp Ratten (WT und WT+L-NAME) und normotensiven und hypertensiven UCP2-defizienten Ratten (KO und KO+L-NAME) im M. soleus (B)

Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot von BACE1 (55 kDa) im M. soleus von WT-, WT-L-Name-, KO- sowie KO-L-Name-Tieren. GAPDH (40 kDa) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Die densitometrische Quantifizierung der relativen BACE1 Proteinmenge wurde auf die relative Proteinmenge von GAPDH und den Mittelwert der Kontrollen bezogen. Die Proteinsynthese von BACE1 war im M. soleus bei den WT+L-Name-, KO- sowie KO-L-Name-Tieren nicht-signifikant erhöht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. WT (n=3)

3.2 Auswirkungen von UCP2 spezifischer siRNA auf AC16-Zellen

Um die Rolle von UCP2 in AC16-Zellen zu analysieren, wurde eine Hemmung der UCP2-mRNA-Translation durch eine RNA-Interferenz angestrebt. Hierfür wurden die AC16-Zellen etwa 48 Stunden lang in einem Zellmedium (s. Tabelle 11) kultiviert. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation dieser mit einer siRNA gegen UCP2 (siUCP2) oder eine Kontroll-

RNA (scrambled RNA, scrRNA) (s. 2.2.1.3). Die die molekularbiologisch induzierte Herabregulation der UCP2-Genexpression in AC16-Zellen mittels Transfektion von UCP2 spezifischer siRNA wurde anschließend auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer qPCR überprüft (s. 2.2.1.3, 2.2.2.5). Der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) der Amplifikation der UCP2-mRNA wurde auf den Ct-Wert des konstitutiv exprimierten Gens B2M normiert, wodurch der Δ Ct-Wert berechnet wurde. Es konnte eine erfolgreiche, signifikante Reduktion der UCP2-mRNA um etwa 82 % in den mit siUCP2 behandelten AC16-Zellen im Vergleich zu den scrRNA-behandelten Zellen (scrRNA $0,94 \pm 0,33$ -fach bzw. siRNA $0,12 \pm 0,02$ -fach) festgestellt werden (s. Abbildung 12 A).

Anschließend wurde die mRNA-Expression von BACE1 untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Herabregulation der Bace1-mRNA um ca. 55 % (siRNA $0,55 \pm 0,12$ -fach) gegenüber der Kontrollgruppe (scrRNA $1,10 \pm 0,33$ -fach) beobachtet werden (s. Abbildung 12 B).

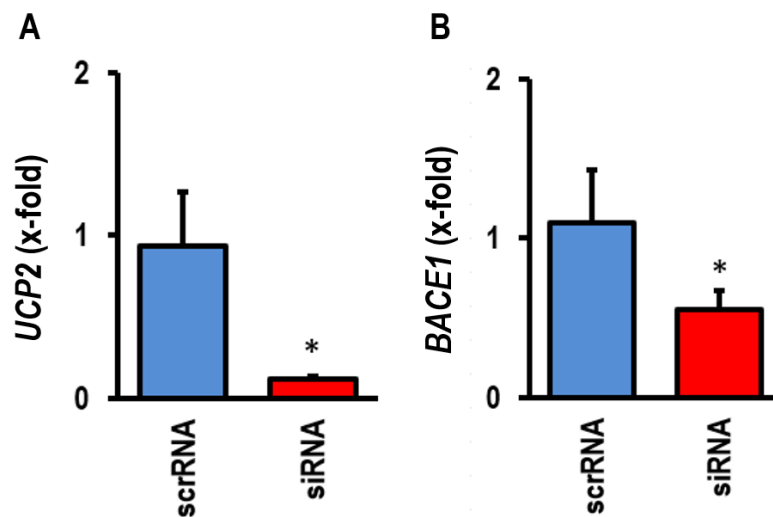


Abbildung 12: Analyse des Einflusses der Deletion der UCP2- Expression in AC16-Zellen auf die mRNA-Expression von UCP2 (A) und BACE1 (B)

Abgebildet ist die relative mRNA-Expression (normiert auf B2M) von den in Tabelle 10 aufgelisteten, spezifischen Marker-Genen UCP2 (A) und BACE1 (B) (normiert auf den Median der Kontrollgruppe scrRNA) in mit scrRNA-transfizierten AC16-Zellen (blauer Balken) sowie in mit UCP2siRNA transfizierten AC16-Zellen (roter Balken). Die mRNA-Expression von UCP2 (A: * $p < 0,001$) war in den mit siRNA behandelten Zellen aufgrund der genetischen Knockdowns signifikant herabreguliert. Die mRNA Expression von BACE1 (B: * $p < 0,001$) war in den mit siRNA behandelten Zellen im Vgl. zu den mit scrRNA behandelten Zellen ebenso signifikant gesunken. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. scrRNA (n= 12 pro Gruppe).

Im Anschluss des Nachweises einer Reduktion der UCP2-mRNA-Expression mittels siRNA-Inkubation, wurde die UCP2-Proteinproduktion ebenso auf eine Herabregulation überprüft. Hierzu wurde die UCP2-Expression auf Proteinebene mittels Durchführung eines Western-Blots nach 48-stündiger Inkubation mit UCP2-siRNA sowie scRNA bestimmt. Dabei kam ein UCP2-spezifischer Antikörper zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes, humanes UCP2-Protein (Rec UCP2) verwendet. Der Anti-UCP2-Antikörper markierte in der Positivkontrolle eine spezifische UCP2-Bande auf Höhe von etwa 37 kDa, die ebenso in den mit scRNA-behandelten AC16-Zellen zu identifizieren war. Diese Bande konnte dagegen in den mit siUCP2-behandelten Zellen nicht belegt werden (siehe Abbildung 13 A). Mit Hilfe der densitometrischen Quantifizierung konnte eine signifikante Reduktion der relativen UCP2-Proteinsynthese (normiert auf Aktin und den Mittelwert der Kontrollen) auf $34,5 \pm 5,6 \%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($102,3 \pm 6,5 \%$) ermittelt werden (s. Abbildung 13 B).

Im Anschluss wurde ebenso die BACE1-Proteinproduktion mittels Durchführung eines Western Blots nach 48-stündiger Inkubation mit UCP2-siRNA sowie scRNA auf eine Herab- respektive Heraufregulation überprüft (s. Abbildung 13 A).

Mittels densitometrischer Quantifizierung konnte eine signifikante Abnahme der relativen BACE1- Proteinsynthese (normiert auf Beta-Aktin und den Mittelwert der Kontrollen) auf $73,2 \pm 10,6 \%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($102,8 \pm 7,5 \%$) (s. Abbildung 13 C) beobachtet werden.

Folglich zeigte sich in vitro bei einer Herabregulation von UCP2 eine Hemmung der Expression von BACE1 auf Proteinebene.

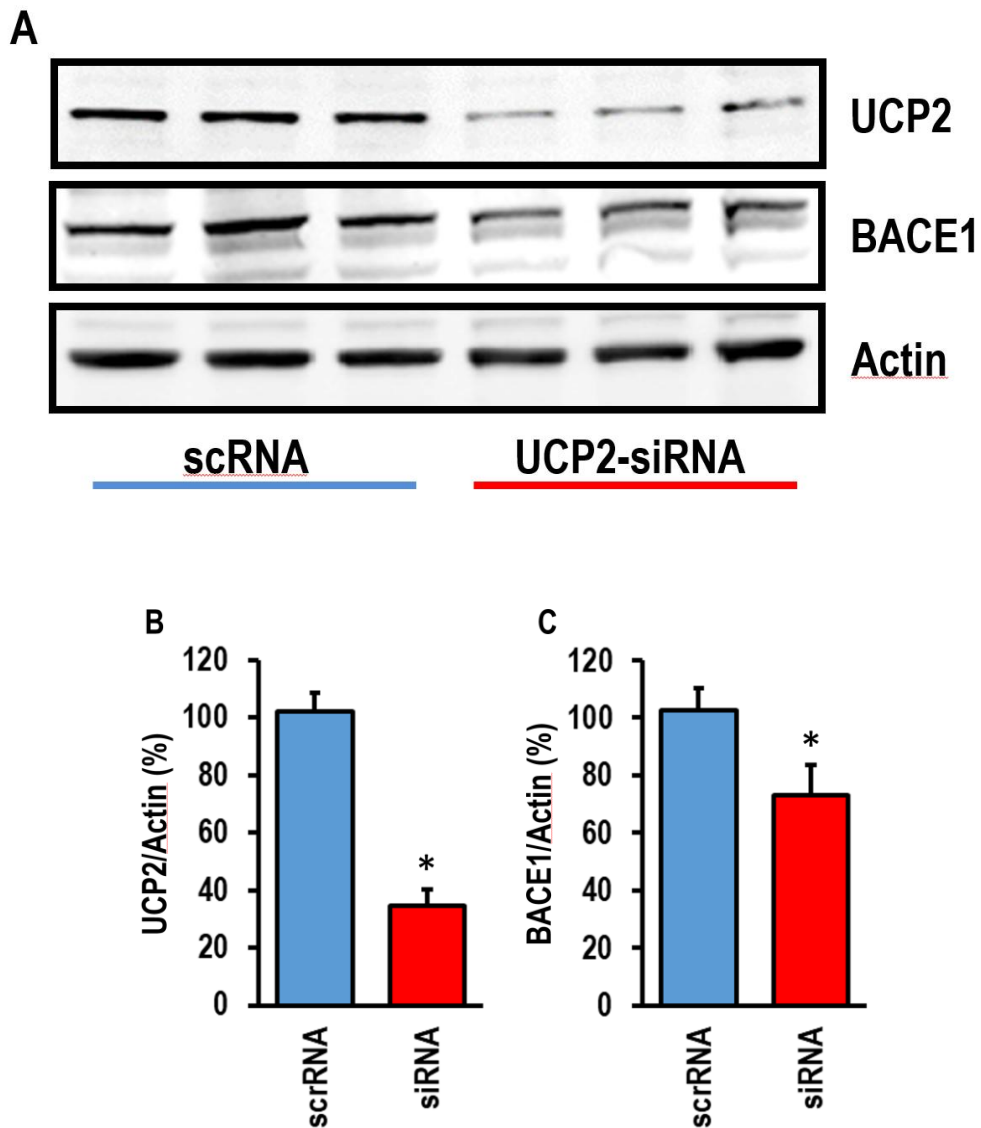


Abbildung 13: Analyse des Einflusses der Deletion der UCP2-Expression in AC16-Zellen auf die Proteinsynthese von UCP2 (A) und BACE1 (B)

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (A) von UCP2 (37 kDa) und BACE1 (55 kDa) von mit scRNA und UCP2-siRNA behandelten AC16-Zellen. Aktin (42 kDa) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Die densitometrische Quantifizierung der relativen UCP2- (B) und BACE1- (C) Proteinmenge (roter Balken) bezogen auf die relative Proteinmenge von Aktin und den Mittelwert der Kontrollen (blauer Balken). Die Proteinsynthese von UCP2 und BACE1 war in siRNA behandelten Zellen gegenüber der Ktr. signifikant reduziert (B: * $p < 0,001$; C: * $p = 0,017$). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. *, $p < 0,05$ vs. scRNA (n= 3 pro Gruppe).

4 Diskussion

Zur Analyse der Arbeitshypothese (s. Kapitel 1.9) wurden sowohl in-vivo als auch in-vitro Modelle herangezogen.

Zum einen wurde das Modell UCP2-defizienter Ratten und ihrer Wildtyp-Kontrollen eingesetzt und zum anderen wurden aufgrund einer pharmakologischen Gabe von N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertone Ratten sowie spontan hypertensive Ratten (SHR) untersucht. Zudem erfolgte eine in-vitro Untersuchung an mit siUCP2-RNA transfezierten AC16-Zellen.

Im folgenden Kapitel werden die angewandten Modelle sowie die sich daraus ableitenden Ergebnisse diskutiert.

4.1 In-vivo Modelle zur Regulation der myozytären UCP2-Expression

4.1.1 Charakterisierung der UCP2-Expression im Skelettmuskel adulter Ratten

Die Expression von UCP2 im Skelettmuskel konnte bereits in mehreren Studien bestätigt werden (Ježek et al. 2018; Meakin et al. 2012).

Im Skelettmuskel konnte bereits nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von UCP2 durch metabolische Einflüsse wie oxidativem Stress, Alterungsprozessen, Fasten sowie dem Fettsäurestoffwechsel stimuliert bzw. beeinflusst werden kann (Liu et al. 2013; Boss et al. 1997; Heinitz et al. 2018; Barazzoni und Nair 2001; Samec et al. 1999).

Um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen metabolischer Regulationen von UCP2 in der Skelettmuskulatur zu erlangen, wurde in dieser Promotionsarbeit zu Beginn eine Analyse der basalen Expression von UCP2 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Typ II-Muskel M. gastrocnemius im Vergleich zum Typ I-Muskel M. soleus eine höhere basale Expression von UCP2 aufwies (s. Abbildung 1).

Diese Ergebnisse könnten durch die unterschiedlichen metabolischen Anforderungen und Funktionen der beiden Muskelfasertypen bedingt sein.

Der Skelettmuskel weist aufgrund seines hohen Energiebedarfs und hohen Anteils am Gesamtstoffwechsel viele Mitochondrien mit einem hohen Anteil an Cristae-Membranen auf (Zurlo et al. 1990; Vogel et al. 2006). Nielsen et al. konnte nachweisen, dass nicht allein die Mitochondrienanzahl von Bedeutung ist, sondern ebenso das Verhältnis der Cristae-Membran

pro Muskelvolumen, welches hinsichtlich der maximal möglichen zellulären Sauerstoffaufnahme aussagekräftiger ist als das Mitochondrienvolumen pro Muskelvolumen. (Nielsen et al. 2017)

Typ I-Fasern nutzen primär eine oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung und weisen dementsprechend eine hohe mitochondriale Dichte und dementsprechend unter physiologischen Bedingungen eine höhere oxidative Kapazität auf (Schmalbruch 1967; Vasileiadou et al. 2023). Typ II-Fasern sind wiederum stärker auf glykolytische Energieprozesse angewiesen und weisen eine geringere mitochondriale Dichte auf (Schmalbruch 1967). Diese strukturellen und metabolischen Unterschiede beider Muskelfasertypen könnten eine unterschiedliche Belastung der mitochondrialen Atmungskette und variierende Anforderungen an die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase bedingen.

UCP2 kann mittels „milder“ Entkopplung in den Mitochondrien zur damit verbundenen Reduktion der ROS beitragen (Brand und Esteves 2005; Echtay et al. 2002). Die höhere basale UCP2-Expression im M. gastrocnemius könnte daher bei der Anpassung an unterschiedliche Stoffwechselgegebenheiten und beim Schutz vor durch oxidativen Stress induzierten Zellschädigungen von Relevanz sein.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass UCP2 Einfluss auf den Fettsäuren-Metabolismus im Muskelgewebe hat (Samec et al. 1999; Pecqueur et al. 2008). Pecqueur et al. postulierte, dass UCP2 die mitochondriale Fettsäureoxidation fördere und gleichzeitig den mitochondrialen Pyruvatabbau begrenze (Pecqueur et al. 2008). Dies spricht dafür, dass UCP2 an der Modulation der mitochondrialen Substratnutzung beteiligt ist.

Die metabolischen Anpassungsmechanismen des Skelettmuskels können zudem mittels sportlicher Trainingseinheiten beeinflusst werden (Liu et al. 2003). Typ IIA-Fasern sind auf Ausdauerleistungen ausgelegt, während Typ IID-Fasern für sehr schnelle Bewegungen und kurzfristige, intensive Belastungen konzipiert sind (Brandes et al. 2019, S. 146–148). Typ IIA-Fasern ist es möglich, eine gemischte oxidativ-glykolytische Energiegewinnung durchzuführen (Brandes et al. 2019, S. 147). Mittels intensivem, mehrwöchigem Krafttraining mit maximalen Kontraktionen können vermehrt Typ IID-Fasern in Typ IIA-Fasern umgewandelt werden, was mit einer erhöhten mitochondrialen Dichte und gesteigerter oxidativer Kapazität einhergeht (Liu et al. 2003).

Folglich könnten diese strukturellen und metabolischen Anpassungsmechanismen zu einer gesteigerten Kapazität der Fettsäureoxidation beitragen. Im Zuge dessen könnte eine höhere basale Expression von UCP2 an der Adaption der mitochondrialen Atmung und Substratnutzung beteiligt sein.

Aufgrund der damit verbundenen, vermehrten Energiegewinnung über oxidative Prozesse in metabolisch umgestalteten Typ IIA-Fasern könnte dies mit einer verstärkten ROS-Produktion assoziiert sein.

Des Weiteren weist die Studie von Anderson und Neufer darauf hin, dass Muskelfasern vom Typ II - insbesondere vom Typ IIB - im Vergleich zu den Typ I Muskelfasern vermehrt ROS bilden können, obwohl dieser deutlich weniger Mitochondrien aufweist (Anderson und Neufer 2006). Daraus kann abgeleitet werden, dass Typ II Muskelfasern über eine geringere antioxidative Kapazität verfügen. Infolgedessen könnte eine erhöhte basale Expression von UCP2 eine Schutzfunktion in der ROS-Homöostase übernehmen, indem es die mitochondrialen Protonengradienten mittels „milder“ Entkopplung reduziert und dadurch eine Reduktion der ROS-Produktion ermöglicht (Brand und Esteves 2005; Echtay et al. 2002).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die unterschiedliche basale Expression von UCP2 in den jeweiligen Muskelfasertypen mit deren spezifischen funktionellen und metabolischen Anforderungen korrelieren könnte. Es bedarf folglich weiterer Forschung hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen körperlichem Training und der Regulation der Expression von UCP2.

4.1.2 Spontan hypertensive Ratten

Um die funktionellen Konsequenzen dieser Expressionsunterschiede genauer zu charakterisieren, wurden die Tiermodelle der spontan hypertensiven Ratten und der Wistar-Ratten herangezogen.

Das Modell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) ist ein häufig verwendetes Tiermodell zur Untersuchung der essentiellen arteriellen Hypertonie sowie deren Komplikationen (Kurtz und Morris 1987). Zudem weist die arterielle Hypertonie der SHR-Tiere pathophysiologische Parallelen mit der essentiellen Hypertonie des Menschen auf (Yamori 1991).

4.1.2.1 Verminderte mRNA-Expression von UCP2, CAT, GAPDH sowie BACE2 mit gleichzeitig gesteigertem oxidativem Stress bei spontan hypertensiven Ratten

Einige Studien belegen, dass an der Entwicklung einer Hypertonie bei SHR-Tieren sowohl vaskuläre als auch renale ROS beteiligt sind (Suzuki et al. 1995; Adler und Huang 2004). Vor diesem Hintergrund wäre eine kompensatorische Hochregulation antioxidativ wirkender Mechanismen, einschließlich einer gesteigerten Expression von UCP2, zu erwarten. Entgegen dieser Annahme war die in der vorliegenden Promotionsarbeit ermittelte mRNA-Expression

von UCP2 jedoch bei den SHR-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant herabreguliert (s. Abbildung 2).

Dies steht im Einklang mit einer Studie von Kutsche et al., die zeigte, dass bei SHR-Tieren eine Hypertrophie-stadienabhängige Regulation von UCP2 vorliegt und diese unter Bedingungen chronischer Drucküberlastung zu einer Reduktion der UCP2-Proteinexpression führen kann (Kutsche et al. 2020). Folglich deutet dies auf eine zunehmende Einschränkung adaptiver Regulationsmechanismen im Verlauf einer chronischen Hypertonie hin. In diesem Zusammenhang könnte die Herabregulation von UCP2 mit einer Chronifizierung einer hämodynamischen Belastung assoziiert sein oder eine sekundäre Reaktion auf anhaltenden oxidativen Stress darstellen.

Bei der Analyse muskelspezifischer Unterschiede zeigte der M. soleus, in dem aufgrund seines hohen Anteils an Typ I-Fasern die oxidative Energiegewinnung überwiegt (Schmalbruch 1967), im Vergleich zum M. gastrocnemius bei dem DHE-Staining eine höhere ROS-Belastung (s. Abbildung 3). Dies könnte auf eine stärkere Abhängigkeit des M. soleus von der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und dessen höhere mitochondriale Dichte zurückzuführen sein (Schmalbruch 1967). Zudem war im M. soleus eine ausgeprägtere Herabregulation der UCP2-mRNA-Expression zu beobachten (s. Abbildung 2), was auf eine eingeschränkte antioxidative Adaptionfähigkeit unter hypertensiven Bedingungen dieses Muskels hindeutet.

Ein weiterer modulierender Faktor könnte die NAD⁺-Sirtuin-Achse darstellen. Eine Hypertonie ist sowohl bei Patienten als auch bei Mäusen mit einem NAD⁺-Mangel assoziiert (Qiu et al. 2023). NAD⁺ ist bezüglich des NAD⁺/NADH-Verhältnisses für den antioxidativen Schutz bedeutsam (Xiao et al. 2018) und dient NAD⁺-verbrauchenden Sirtuinen (SIRTs), die wiederum die mitochondriale Anpassung sowie die Biogenese in der Skelettmuskulatur regulieren (White und Schenk 2012). Demnach könnte eine verminderte NAD⁺-Konzentration zu einer Einschränkung der mitochondrialen Anpassungsfähigkeit und der antioxidativen Kapazität beitragen. Vor dem Hintergrund des höheren Mitochondriengehaltes und der höheren oxidativen Abhängigkeit des M. soleus (Schmalbruch 1967) ist anzunehmen, dass er sensibel auf ein dysreguliertes NAD⁺/NADH-Verhältnis reagiert. In diesem Zusammenhang bedarf es zukünftig weiterer Untersuchungen beispielsweise mittels enzymatischer Quantifizierung von NAD⁺ und NADH aus Gewebeextrakten.

Die reduzierte Expression von UCP2 wurde zudem von einer signifikant herabregulierten Expression der antioxidativen Enzymkatalase (CAT) begleitet, wodurch die Reduktion des durch die SODs gebildeten Wasserstoffperoxids und die damit assoziierte Reduktion des oxidativen Stresses vermindert sein dürfte (Heinrich et al. 2022, S. 334). Dies deutet auf eine

Reduktion des antioxidativen Potenzials hin, das folglich eine Akkumulation von ROS begünstigt.

Des Weiteren wurde eine verminderte mRNA-Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) beobachtet (s. Abbildung 2). Da GAPDH sowohl für den glykolytischen Energiestoffwechsel von Relevanz (Nicholls et al. 2012) als auch nachweislich oxidationsempfindlich ist (Shenton und Grant 2003), könnte die Herabregulation eine langfristige Adaption an chronisch erhöhten oxidativen Stress sein. In einer Studie mit Hefezellen konnte nachgewiesen werden, dass die oxidative Inaktivierung von GAPDH zu einer Umleitung des Glukoseflusses in den oxidativen Pentosephosphatweg führt, sodass ein erhöhter Anteil des antioxidativen NADPH produziert werden kann und die Zellen toleranter gegenüber Wasserstoffperoxid werden. GAPDH fungiert dementsprechend als ein metabolischer Schalter. (Talwar et al. 2023; Ralser et al. 2007; Baty et al. 2005) Demzufolge könnte die verminderte Expression von GAPDH auf eine langfristige transkriptionelle Anpassung an den chronisch erhöhten oxidativen Stress hinweisen, auch wenn die oxidative Inaktivierung von GAPDH primär posttranslational erfolgt (Mazzola und Sirover 2005).

Zudem wurde eine signifikante, reduzierte mRNA-Expression von BACE2 beobachtet (s. Abbildung 2). BACE2 kann mittels Regulation der Insulinkaskade und der damit verbundenen Glukoseaufnahme Einfluss auf metabolische Prozesse nehmen, wobei eine Hemmung von BACE2 in Mausmodellen zu einer gesteigerten β -Zellfunktion und einer damit verbundenen erhöhten Insulinproduktion sowie einem verbesserten Glukosestoffwechsel führt. (Esterházy et al. 2011; Taylor et al. 2022)

In diesem Kontext könnte die Herabregulation von BACE2 in den SHR-Tieren bei einer gleichzeitigen verminderten UCP2-Expression als Hinweis auf eine metabolische Umstellung interpretiert werden, die eine verstärkte Insulinwirkung bzw. eine effizientere Glukoseaufnahme im Gewebe begünstigt.

Diese metabolische Anpassung könnte als kompensatorische Antwort in Reaktion auf die durch Hypertonie induzierte, verminderte Perfusion sowie Sauerstoffverfügbarkeit interpretiert werden (Menezes et al. 2025). Unter hypoxischen Bedingungen wird der oxidative Stoffwechsel zugunsten der anaeroben Glykolyse reduziert, indem die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA gehemmt wird. Dadurch sinken Sauerstoffverbrauch und mitochondriale Biogenese, was wiederum eine verminderte Bildung von ROS bewirkt. (Goda und Kanai 2012)

Weiterhin belegten Studien bezüglich einer pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH), die teilweise auf eine systemische Hypertonie übertragbar ist, dass die aus der hypertensiven

Gefäßumstellung resultierende Endotheldysfunktion sowie die damit verbundene gesteigerte Gefäßsteifigkeit die Perfusion und die damit assoziierte Sauerstoffversorgung der Skelettmuskulatur beeinträchtigt (Menezes et al. 2025). Zudem können PAH hypertone Patienten eine reduzierte Muskelmasse und -kraft sowie eine Verschiebung der Muskelfasertypen von den oxidativen Typ I-Fasern zugunsten der glykolytischen Typ-II-Fasern aufweisen (Menezes et al. 2025; Malenfant et al. 2021). Inwiefern vergleichbare, pathophysiologische Veränderungen bei SHR-Tieren auftreten, bleibt jedoch offen.

Zusammenfassend deuten die Befunde auf eine maladaptive metabolische und antioxidative Reprogrammierung der Skelettmuskulatur unter chronisch hypertensiven Bedingungen hin. Die gleichzeitige Herabregulation von UCP2 und CAT bei erhöhter ROS-Belastung deutet darauf hin, dass die antioxidative Kapazität im Verlauf einer Hypertonie nicht ausreichend aufrechterhalten werden kann. Zukünftig bedarf es weiterer Analysen hinsichtlich der Korrelation von oxidativem Stress, hämodynamischen Überlastungen sowie der Expression und Regulation von UCP2.

4.1.3 UCP2-Deletion

Zur weiteren Analyse der kausalen Beziehung zwischen der UCP2-Expression und oxidativem Stress wurde das Tiermodell UCP2-defizienter Ratten herangezogen. Dabei wurde untersucht, ob eine UCP2-Defizienz einen erhöhten oxidativen Stress bedingt und ob diese metabolische Regulationen induziert.

4.1.3.1 Metabolische Annäherung zwischen Typ I-Muskel M. soleus und Typ-II-Muskel M. gastrocnemius durch UCP2-Defizienz

Bei dem Vergleich zwischen dem M. soleus und M. gastrocnemius war bei den UCP2-defizienten Ratten eine verstärkte mRNA-Expression von Genen, die mit dem Glykosestoffwechsel assoziiert sind, zu beobachten. Daraus resultierte eine metabolische Annäherung zwischen dem Typ I-Muskel M. soleus sowie dem Typ II-Muskel M. gastrocnemius (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Dies spricht dafür, dass UCP2 an der muskelfaserspezifischen Regulation metabolischer Prozesse beteiligt ist. Über die mitochondriale „milde“ Entkopplung kann UCP2 unter physiologischen Bedingungen zur Reduktion von ROS beitragen (Brand und Esteves 2005; Echtay et al. 2002). Folglich könnte eine UCP2-Defizienz zu einer langfristig metabolischen

Anpassungen führen, die vor allem bei hohen metabolischen Belastungen wie beispielsweise sportlicher Aktivität zur Stabilisierung der Energiehomöostase beitragen.

Dies steht im Einklang mit einer Studie von Schrauwen et al., in der bei akuter körperlicher Belastung ein Anstieg der UCP2-Expression im humanen Skelettmuskel beschrieben wird (Schrauwen et al. 1999). Bei intensivem, mehrwöchigem Krafttraining mit maximalen Kontraktionen ist gleichzeitig zu beobachten, dass vermehrt schnell kontrahierende Typ IID-Fasern in metabolisch flexiblere Typ IIA-Fasern konvertieren (Liu et al. 2003). Obwohl ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der UCP2-Expression und Muskelfaserkonversionen bislang nicht belegt ist, könnten die in dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten darauf hindeuten, dass UCP2-abhängige mitochondriale Adaptionen zur metabolischen Plastizität und Flexibilität der Skelettmuskulatur beitragen.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass UCP2 bei der Regulation am muskelfaserspezifischen Metabolismus mitwirkt und dessen Defizienz auf transkriptioneller Ebene eine metabolische Annäherung zwischen oxidativen und glykolytischen Muskeln bedingt. Dementsprechend sind weitere Studien erforderlich, um die funktionellen Folgen dieser transkriptionellen Veränderungen zu klären.

4.1.3.2 Erhöhte mRNA-Expression von CAT, GAPDH und BACE1 mit gleichzeitig gesteigertem oxidativem Stress bei UCP2-defizienten Ratten

UCP2 kann mittels „milder“ Entkopplung in den Mitochondrien zur Reduktion der ROS beitragen (Brand und Esteves 2005; Echtay et al. 2002).

Im Umkehrschluss könnte bei UCP2-defizienten Ratten dieser antioxidative Schutz beeinträchtigt sein und zu einer erhöhten ROS-Produktion führen. So konnte Arsenijevic et al. nachweisen, dass UCP2-Knockout-Mäuse eine erhöhte ROS-Produktion in Immunzellen aufwiesen (Arsenijevic et al. 2000).

Diese Annahme wurde durch das gesteigerte DHE-Staining beider Muskeln bestätigt. Im M. soleus war ein Anstieg von ca. 13 % zu beobachten, während im M. gastrocnemicus die ROS-Menge um ca. 96 % signifikant gestiegen war (s. Abbildung 7). Dieser Effekt, dass im M. gastrocnemicus ein wesentlich höherer Anstieg der ROS vorlag, könnte auf die unter physiologischen Bedingungen höhere basale Expression von UCP2 im M. gastrocnemicus zurückzuführen sein, wodurch dieser folglich stärker vom Verlust des UCP2-vermittelten antioxidativen Schutzes betroffen ist (s. Abbildung 1).

Gleichzeitig ging der gesteigerte oxidative Stress mit einer Heraufregulation antioxidativer und metabolischer Enzyme wie CAT, GAPDH und BACE1 einher, wobei diese - mit Ausnahme von

GAPDH - im M. gastrocnemicus signifikant und im M. soleus nicht-signifikant war (s. Abbildung 6). Dies könnte ebenso durch die unter physiologischen Bedingungen höhere basale Expression von UCP2 im M. gastrocnemicus bedingt sein.

Insbesondere die erhöhte mRNA-Expression von CAT kann als eine kompensatorische Reaktion auf die erhöhte ROS-Bildung interpretiert werden, um die Akkumulation von ROS zu hemmen (Heinrich et al. 2022, S. 334). Dennoch reichte eine verstärkte mRNA-Expression von CAT unter normotensiven Bedingungen offenbar nicht aus, den durch eine genetische Deletion von UCP2 ausgelösten oxidativen Stress zu kompensieren.

Neben antioxidativen Veränderungen wurden ebenso metabolische Anpassungen beobachtet (s. Abbildung 6). Die erhöhte mRNA-Expression von GAPDH könnte auf eine verstärkte Relevanz glykolytischer Stoffwechselwege hindeuten, die möglicherweise auf eine veränderte mitochondriale Substratnutzung oder eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen ist (Nicholls et al. 2012). In diesem Zusammenhang konnte Pecqueur et al. nachweisen, dass UCP2-defiziente Zellen eine Verschiebung des Metabolismus von der Fettsäureoxidation hin zum Glukosestoffwechsel aufweisen (Pecqueur et al. 2008). Darüber hinaus beschreibt Nesci et al., dass UCP2 zur Begrenzung der Produktion von NADH und FADH_2 beiträgt (Nesci und Rubattu 2024). Im Umkehrschluss könnte eine UCP2-Defizienz mit einem veränderten NADH/ NAD^+ -Verhältnis einhergehen, was wiederum die Fettsäureoxidation hemmen und eine Verschiebung der Substratnutzung begünstigen könnte (Yang et al. 2025). Außerdem postulierten Yang et al., dass eine NADH-vermittelte Hemmung von GAPDH eine Umlenkung des Glukoseflusses auf den Pentosephosphatweg bewirken und infolge dessen eine zusätzliche Elektronenbelastung der Atmungskette und der damit verbundenen ROS-Akkumulation verhindern kann (Yang et al. 2025).

Eine solche metabolische Verschiebung könnte dazu beitragen, den Energiebedarf trotz mitochondrialer Dysfunktion zu decken und gleichzeitig das Risiko einer zusätzlichen mitochondrialen ROS-Produktion zu begrenzen. Demnach bedarf es zukünftig weiterer Untersuchungen bezüglich des NADH/ NAD^+ -Verhältnisses, metabolischer Flussraten und der Laktat-Konzentration im Skelettmuskel UCP2-defizienter Ratten, um die aufgeführten Hypothesen zu verifizieren.

GAPDH ist zudem nachweislich oxidationsempfindlich, sodass eine ROS-induzierte Inaktivierung von GAPDH zu einer Umleitung des Glukoseflusses von der Glykolyse in den oxidativen Pentosephosphatweg und einer damit assoziierten erhöhten NADPH-Produktion und oxidativen Schutz beitragen könnte (Talwar et al. 2023; Shenton und Grant 2003; Nesci und Rubattu 2024). Folglich könnte die gesteigerte mRNA-Expression von GAPDH eine längerfristige transkriptionelle Anpassung an einen chronisch erhöhten oxidativen Stress

darstellen, während die akute Regulation der Enzymaktivität vermutlich posttranslational erfolgt. (Talwar et al. 2023; Ralser et al. 2007; Baty et al. 2005; Mazzola und Sirover 2005)

Des Weiteren wurde eine Heraufregulation der BACE1-Expression beobachtet (s. Abbildung 6). Da BACE1 hinsichtlich der Regulation der Insulinsensitivität und der Glukoseaufnahme von Relevanz ist, könnte die gesteigerte Expression auf eine zusätzliche metabolische Anpassung hinweisen. Meakin et al. postulierten, dass eine Hemmung von BACE1 mit einer verbesserten Insulinsensitivität im Muskelgewebe assoziiert ist und mit erhöhter Expression von *UCP2*- und *UCP3* im Skelettmuskel verbunden ist. Infolgedessen schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass eine BACE1-Hemmung mit einer erhöhten entkoppelten Atmung und metabolischer Ineffizienz einhergehe. (Meakin et al. 2012)

Taylor et al. folgerten, dass dies im Umkehrschluss bedeutet, dass eine *UCP2*-Defizienz mit einer gesteigerten BACE1-Expression sowie einer reduzierten Insulinsensitivität einhergeht. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass eine gesteigerte Expression von BACE1 mit einer Insulinresistenz und einer reduzierten Glukoseaufnahme einhergeht. (Taylor et al. 2022) Außerdem konnten Kwak et al. nachweisen, dass BACE1 in kultivierten Neuronen redoxsensitiv reguliert wird (Kwak et al. 2011). Demzufolge könnte BACE1 durch eine Wasserstoffperoxid-vermittelte Oxidation heraufreguliert und aktiviert werden (Kwak et al. 2011), da die *UCP2*-defizienten Tiere eine signifikante Zunahme des oxidativen Stresses aufwiesen.

Eine signifikant gesteigerte BACE1-mRNA-Expression konnte in dieser Promotionsarbeit jedoch nur auf mRNA-Ebene im *M. gastrocnemicus* bestätigt werden (s. Abbildung 6), während BACE1 auf Proteinebene nur unwesentlich, nicht-signifikant in beiden Muskeln erhöht wurde (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Dementsprechend könnte die gesteigerte Expression von BACE1 bei *UCP2*-defizienten Ratten als Teil einer muskelfaserspezifisch adaptiven, metabolischen Reprogrammierung unter erhöhter ROS-Belastung interpretiert werden. Die funktionelle Relevanz der transkriptionellen Veränderung bleibt jedoch offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei dem Vergleich zwischen *UCP2*-defizienten und SHR-Tieren werden Unterschiede in den adaptiven Antwortmechanismen deutlich. Während die SHR-Tiere eine partielle Herabregulation von *UCP2* mit einer einhergehenden verminderten Expression antioxidativer und metabolischer Enzyme aufwiesen, induzierte die vollständige Deletion von *UCP2* eine verstärkte transkriptionelle Aktivierung dieser Kompensationsmechanismen. Dies könnte darauf hindeuten, dass chronisch-pathologische Bedingungen (OKAMOTO und AOKI 1963; Yamori 1991; Yen et al. 1974) und eine Reduktion von *UCP2* bei den SHR-Tieren mit einer Erschöpfung von adaptiven Regulationen einhergeht, während die Deletion von *UCP2*

frühzeitig kompensatorische Adaptionen ermöglicht. Ein direkter Vergleich der beiden Tiermodelle ist jedoch aufgrund der erheblich unterschiedlichen Lebenserwartung nicht möglich (s. Kapitel 1.8).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von UCP2 muskelfaserspezifisch zu einem Anstieg des oxidativen Stresses führte, der mit antioxidativen und metabolischen Regulationen auf transkriptioneller Ebene einherging. Dies weist auf die Relevanz von UCP2 hinsichtlich der Regulation der mitochondrialen ROS-Produktion, der metabolischen Adaption sowie der Aufrechterhaltung funktioneller Unterschiede zwischen den oxidativen Typ I- und glykolytischen Typ II-Muskelfasern hin.

4.1.4 L-Name induzierte Hypertonie im Rattenmodell

Um die Analyse der Expressionsunterschiede und der Interaktion zwischen einer genetischen Deletion von UCP2 und vaskulär induziertem oxidativem Stress zu erweitern, wurde die L-Name induzierte Hypertonie im Rattenmodell herangezogen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, welche Auswirkungen eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit im Rahmen eines L-Name induzierten Hypertonus auf transkriptionelle und posttranskriptionelle Veränderungen sowie oxidativen Stress in der Skelettmuskulatur hat.

Die L-Name-Gabe bedingt im Rattenmodell eine zeit- und dosisabhängige Hypertonie ohne eine gleichzeitig vorliegende Herzhypertrophie (Arnal et al. 1993). Zudem ist nachgewiesen, dass ebenso beim Menschen eine akute systemische NO-Synthesehemmung mit der Entwicklung eines Hypertonus assoziiert ist (Broere et al. 1998; Dijkhorst-Oei et al. 1997). Dementsprechend sind die in dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten in gewissem Maße auf den Menschen übertragbar.

4.1.4.1 Erhöhte mRNA-Expression von CAT mit gleichzeitig gesteigertem oxidativem Stress bei UCP2-defizienten Ratten mit L-Name induziertem Hypertonus

Unter physiologischen Bedingungen übernimmt Stickstoffmonoxid (NO) neben seiner vasodilatatorischen Wirkung ebenso antioxidative Funktion, indem es ROS neutralisiert (Heinrich et al. 2022, 438, 1084-1085; Davignon und Ganz 2004; Li et al. 2015; Suda et al. 2002; Wink et al. 1999). Des Weiteren nimmt NO u.a. mittels reversibler Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase Einfluss auf die mitochondriale Atmung und beeinflusst über den Gefäßtonus die muskuläre Perfusion und die Sauerstoffverfügbarkeit (Cooper 2002; Joyner und Casey 2014). Dementsprechend kann eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit sowohl

direkt als auch indirekt zu einer Zunahme des oxidativen Stresses beitragen (Pierini und Bryan 2015).

Da L-Name die Bioverfügbarkeit von NO reduziert, korreliert eine L-Name-Gabe folglich mit einem Anstieg der ROS-Konzentration und somit mit einer Zunahme des oxidativen Stresses. Dies ist unter anderem auf die ausgelöste, erhöhte Expression des Angiotensin-konvertierendem Enzyms (ACE) und die gesteigerte Bildung von Angiotensin II zurückzuführen. (Suda et al. 2002)

UCP2-defiziente Tiere weisen aufgrund des durch die Deletion bedingten, verminderten oxidativen Schutzes eine erhöhte ROS-Bildung auf (Arsenijevic et al. 2000).

In der vorliegenden Promotionsarbeit zeigte sich, dass dieser Effekt unter Bedingungen eines gleichzeitig vorliegenden L-Name induzierten Hypertonus verstärkt wurde. Das DHE-Staining konnte in beiden untersuchten Muskeln einen signifikanten Anstieg der ROS bei den UCP2-defizienten Tieren bei gleichzeitiger L-Name-Gabe im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit L-Name-Gabe belegen (s. Abbildung 9). Dabei war der relative Anstieg im M. gastrocnemicus ausgeprägter als im M. soleus (s. Abbildung 9). Dies könnte auf die unter physiologischen Bedingungen höhere basale Expression von UCP2 im M. gastrocnemicus zurückzuführen sein (s. Abbildung 1), wodurch dieser stärker vom Verlust des UCP2-vermittelten antioxidativen Schutzes betroffen ist (Brand und Esteves 2005; Echtay et al. 2002).

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der oxidative Stress bei einer L-Name-Gabe nicht allein durch die hypertoniebedingte vaskuläre Dysfunktion bedingt ist (Suda et al. 2002), sondern ebenso durch eine gleichzeitige UCP2-Deletion zusätzlich verstärkt wird. UCP2 scheint demnach ebenso unter Bedingungen einer eingeschränkten NO-Bioverfügbarkeit zur Aufrechterhaltung der ROS-Homöostase in der Skelettmuskulatur beizutragen.

Gleichzeitig ging der gesteigerte oxidative Stress im M. soleus bei den UCP2-defizienten Ratten unter L-Name-Gabe mit einer nicht-signifikanten Heraufregulation der mRNA-Expression von CAT einher, wobei im M. gastrocnemicus eine minimale, nicht-signifikante Abnahme von CAT zu beobachten war (s. Abbildung 8).

Die erhöhte mRNA-Expression von CAT kann als kompensatorische Reaktion auf den vermehrten oxidativen Stress interpretiert werden, um so die Akkumulation von ROS zu hemmen (Heinrich et al. 2022, S. 334). Die muskelfasertypspezifischen Unterschiede könnten darauf hindeuten, dass der Typ-I Muskel M. soleus im Vergleich zum Typ-II Muskel M. gastrocnemicus über einer größere transkriptionelle Flexibilität antioxidativer Enzyme verfügt. Trotz dieser Heraufregulation war die gesteigerte mRNA-Expression von CAT im M. soleus nicht ausreichend, um den oxidativen Stress unter kombinierten Bedingungen eines L-Name induzierten Hypertonus und einer UCP2-Deletion zu begrenzen.

Zudem wies sowohl der M. gastrocnemicus als auch der M. soleus eine nicht-signifikante Heraufregulation der mRNA-Expression von GAPDH und von BACE1 auf, welche jedoch von einer starken Streuung begleitet wurde (s. Abbildung 8).

Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz der Herauf- bzw. Herabregulation von CAT, GAPDH und BACE1 lässt sich aus diesen erhobenen Ergebnissen jedoch keine eindeutige funktionelle Konsequenz ableiten.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse die Relevanz von UCP2 in Bezug auf den muskelfaserspezifischen, antioxidativen Schutz in der Skelettmuskulatur unter vaskulär-pathologischen Bedingungen. Die limitierte Kompensationsfähigkeit antioxidativer Enzyme deutet darauf hin, dass UCP2 zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen ROS-Homöostase beiträgt.

4.1.4.2 Posttranskriptionelle Reduktion von BACE1 bei UCP2-defizienten Ratten mit L-Name induziertem Hypertonus

Im M. gastrocnemicus war bei den UCP2-defizienten Tieren bei gleichzeitiger L-Name-Gabe eine signifikante Reduktion der relativen BACE1-Proteinsynthese gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten (s. Abbildung 10), während der M. soleus in derselben Probengruppe eine nicht-signifikante, geringe Heraufregulation der relativen BACE1-Proteinsynthese aufwies (s. Abbildung 11). Diese Ergebnisse deuten auf eine muskelfaserspezifische posttranskriptionelle Regulation von BACE1 hin, die insbesondere den überwiegend glykolytisch arbeitenden Typ-II Muskel M. gastrocnemicus betrifft (Schmalbruch 1967).

Die Diskrepanz zwischen der beobachteten nicht-signifikanten Heraufregulation der BACE1-mRNA-Expression (s. Abbildung 8) und der verminderten Proteinexpression (s. Abbildung 10) im M. gastrocnemicus deutet auf eine posttranskriptionellen Störung oder Regulation hin.

BACE1 kann sowohl durch posttranskriptionelle Mechanismen als auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden (Wang et al. 2013; Huse et al. 2000; Shiba et al. 2004; Costantini et al. 2007; Vetrivel et al. 2009; Kang et al. 2010; Taylor et al. 2022). In diesem Zusammenhang konnten Kwak et al. nachweisen, dass BACE1 in kultivierten Neuronen redoxsensitiv reguliert wird. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass hohe NO-Konzentrationen mittels Induktion der S-Nitrosylierung die enzymatische Aktivität von BACE1 inaktivieren, ohne dabei die Transkription von BACE1 zu hemmen. Niedrige NO-Konzentrationen wiederum hemmen die Transkription und die Enzymaktivität von BACE1. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass dieser NO-vermittelte Regulationsmechanismus vermutlich als

antioxidativer Schutz für BACE1 fungiert. (Kwak et al. 2011)

Obwohl sich diese Ergebnisse auf Neuronen beziehen, sprechen sie dafür, dass eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit ebenso im Skelettmuskel einen Einfluss auf die BACE1-Proteinsynthese ausüben könnte.

Des Weiteren konnte bereits nachgewiesen werden, dass BACE1 unter basalen und zellulären Stressbedingungen sowohl durch Transkriptionsfaktoren als auch posttranskriptionell durch spezifische microRNAs reguliert wird. Folglich kann die Proteinexpression unabhängig von der Transkription beeinflusst werden. (Kwak et al. 2011; Christensen et al. 2004; Wang et al. 2008).

Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass bei gleichzeitig vorliegendem mitochondrialem oxidativem Stress infolge einer UCP2-Deletion und einer L-Name induzierte Hypertonie durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit ein „Double Hit“-Mechanismus wirksam sein könnte, der eine posttranskriptionelle Herabregulation von BACE1 bedingt. Dabei bleibt offen, ob dieser sich addierende Mechanismus sich primär auf die ROS-Homöostase, NO, BACE1 oder den Metabolismus bezieht.

Der Umstand, dass dieser Effekt ausschließlich im M. gastrocnemicus auftrat, könnte auf die unter physiologischen Bedingungen höhere basale mRNA-Expression von UCP2 zurückzuführen sein, wodurch dieser verstärkt vom Verlust eines UCP2-vermittelten antioxidativen Schutzes betroffen ist und infolgedessen verstärkt adaptive Regulationen aktivieren muss.

Die Reduktion der BACE1-Proteinsynthese könnte zudem hinsichtlich der Rolle von BACE1 in der Regulation der Insulinsensitivität und der Glukoseaufnahme von Relevanz sein. Meakin et al. zeigten, dass eine Hemmung von BACE1 mit einer verbesserten Insulinsensitivität im Muskelgewebe assoziiert ist und mit erhöhter, exprimierter UCP1-mRNA im BAT sowie UCP2- und UCP3-mRNA im Skelettmuskel verbunden ist. Daraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass eine BACE1-Hemmung mit einer erhöhten entkoppelten Atmung und metabolischer Ineffizienz einhergeht. (Meakin et al. 2012)

Taylor et al. leiteten daraus ab, dass im Umkehrschluss eine gesteigerte Expression von BACE1 mit einer Insulinresistenz und einer reduzierten Glukoseaufnahme einhergeht (Taylor et al. 2022). Zhang et al. wiederum beschrieben, dass eine Deletion von UCP2 im Mausmodell mit einer verbesserten Insulinsekretion einhergeht (Zhang et al. 2001).

In diesem Zusammenhang könnte die im M. gastrocnemicus beobachtete posttranskriptionelle Herabregulation von BACE1 als metabolische Adaption interpretiert werden, die unter Bedingungen eines erhöhten oxidativen Stresses und einer L-Name induzierten Hypertonie durch eine verbesserte Insulinsensitivität und eine gesteigerte Glukoseaufnahme im Skelettmuskel zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase beiträgt. Allerdings

wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit keine funktionellen Parameter der Insulinsensitivität oder Glukoseaufnahme erhoben, sodass diese Interpretation hypothetisch bleibt und zukünftiger experimenteller Validierung bedarf.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Kombination aus UCP2-Deletion und verminderter NO-Bioverfügbarkeit im Sinne eines „Double Hit“ mit einer muskelfaserspezifischen posttranskriptionellen Reduktion der BACE1-Proteinsynthese im M. gastrocnemicus einhergeht. Dies unterstreicht die Relevanz von UCP2 und NO für die posttranskriptionelle Regulationen von BACE1 unter pathophysiologischen Bedingungen und stützt die in Kapitel 1.9 aufgestellte Arbeitshypothese, dass eine Deletion von UCP2 zur verminderten Expression von BACE1 beiträgt.

4.2 Zwischenfazit

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse der Promotionsarbeit Unterschiede in den adaptiven Regulationen hinsichtlich des oxidativen Stresses und des Metabolismus zwischen den untersuchten Tiermodellen. Diese deuten auf einen muskelfaserspezifischen Einfluss der Ätiologie der Hypertonie und der mitochondrialen Schutzfunktion von UCP2 auf die redox- und metabolische Homöostase hin.

Die SHR-Tiere wiesen eine verminderte mRNA-Expression von UCP2 und der Enzyme CAT, GAPDH und BACE1 (s. Abbildung 2) bei gleichzeitig erhöhtem oxidativem Stress in beiden Muskeln (s. Abbildung 3) auf. Dies deutet auf eine maladaptive metabolische und antioxidative Regulation der Skelettmuskulatur unter chronisch hypertensiven Bedingungen hin, wobei die antioxidative Kapazität im Verlauf einer Hypertonie nicht aufrechterhalten werden kann und im Zusammenhang mit einer Erschöpfung kompensatorischer Schutzmechanismen stehen könnte. Vor diesem Hintergrund bedarf es zukünftiger Untersuchungen der Proteinsynthese von BACE1 bei SHR-Tieren, um mögliche posttranskriptionelle Regulationen zu erfassen und die funktionelle Bedeutung der beobachteten Transkriptionsmechanismen besser einzuordnen.

Die Ergebnisse der UCP2-defizienten Ratten deuten darauf hin, dass UCP2 an der Regulation des muskelfaserspezifischen Metabolismus beteiligt ist und dessen Deletion eine metabolische Annäherung zwischen oxidativen und glykolytischen Muskeln sowie einen Anstieg des oxidativen Stresses bedingt (s. Abbildung 1). Dies spricht für die Relevanz von UCP2 bei der Aufrechterhaltung der funktionellen Differenzierung zwischen Muskelfasertypen. Darüber hinaus legen die vorliegenden Ergebnisse eine muskelfasertypspezifische UCP2-

BACE1-Korrelation auf transkriptioneller Ebene nahe, da im überwiegend glykolytischen M. gastrocnemicus die BACE1-mRNA-Expression bei UCP2-defizienten Tieren signifikant erhöht war, während im M. soleus keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden (s. Abbildung 6) (Schmalbruch 1967). Dies könnte durch die unter physiologischen Bedingungen höhere basale Expression von UCP2 im M. gastrocnemicus bedingt sein, wodurch dieser Muskel stärker vom Verlust des UCP2-vermittelten antioxidativen Schutzes betroffen ist.

Unter Bedingungen einer zusätzlich vorliegenden L-Name induzierten Hypertonie wiesen die UCP2-defizienten Tiere (s. Abbildung 6 u. Abbildung 8) eine Induktion antioxidativer kompensatorischer Mechanismen auf Transkriptionsebene auf, die jedoch nicht ausreichten, die Akkumulation von ROS zu inhibieren (s. Abbildung 7 und Abbildung 9). Weiterhin war unter diesen „Double-Hit“-Bedingungen zwar auf mRNA-Ebene eine nicht-signifikante Heraufregulation von BACE1 zu beobachten (s. Abbildung 8), während die BACE1-Proteinsynthese posttranskriptionell und muskelfaserspezifisch im M. gastrocnemicus signifikant herabreguliert war (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Die Diskrepanz zwischen Transkript- und Proteinebene spricht für eine selektive posttranskriptionelle Regulation, die als eine metabolische Adaption interpretiert werden kann und möglicherweise zur Begrenzung des oxidativen Stresses unter kombinierter vaskulärer Dysfunktion und verminderten NO-Bioverfügbarkeit beitragen könnte.

Es bleibt allerdings offen, ob die beobachteten metabolischen und redoxabhängigen Veränderungen primär auf die Deletion von UCP2 zurückzuführen sind oder durch sekundäre Anpassungen bedingt werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die vorliegenden Ergebnisse überwiegend auf strukturellen Analysen der mRNA-Expression beruhen, was wiederum die Aussagekraft der tatsächlichen Proteinsynthese und Enzymaktivität sowie der funktionellen Parameter wie der Insulinsensitivität, der Glukoseaufnahme oder der Laktatkonzentration limitiert.

Des Weiteren ist der Vergleich von SHR- und L-Name-behandelten Tieren nur begrenzt möglich, da die beiden Modelle sich hinsichtlich der Lebensdauer, dem Beginn und der Dauer der einsetzenden Hypertonie unterscheiden (s. Kapitel 2.1.8.1 u. 2.1.8.3). Die SHR-Tiere entwickeln zwischen der siebten und fünfzehnten Woche eine Hypertonie mit systolischen Werten zwischen 180 und 200 mmHg (OKAMOTO und AOKI 1963; Yamori 1991; Yen et al. 1974), während eine Gabe von L-Name bereits innerhalb einer Woche einen signifikanten Anstieg des Blutdruckes induziert (Li et al. 2019). Diese Unterschiede müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Abschließend kann nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Anstieg des oxidativen Stresses nicht ausschließlich auf die UCP2-Deletion zurückzuführen ist, sondern ebenso durch eine gesteigerte metabolische Aktivität bedingt sein könnte.

Eine erhöhte glykolytische Flussrate geht mit einer höheren mitochondrialen Konzentration von NADH einher. Dadurch kann wiederum die Atmungskette stärker belastet werden und es kann zu einem veränderten Verhältnis der Konzentrationen von NADH und NAD⁺ und einer damit verbundenen vermehrten Superoxidbildung kommen. (Müller-Esterl 2011, S. 582; Kussmaul und Hirst 2006)

In diesem Zusammenhang könnte der beobachtete Anstieg des oxidativen Stresses sowohl Ursache als auch Folge einer veränderten metabolischen Regulation sein.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse die Bedeutung von UCP2 für die muskelfaserspezifische Regulation des oxidativen Stresses und des Metabolismus unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen. Darüber hinaus deuten sie auf eine enge Verknüpfung mitochondrialer Schutzmechanismen, vaskulärer Faktoren und posttranskriptionellen Regulationen hin, die gemeinsam zur Aufrechterhaltung der redox- und metabolischen Homöostase im Skelettmuskel beitragen könnten.

4.3 In-vitro Modell zur Regulation der UCP2-Expression

Da im Rahmen dieser Promotionsarbeit gezeigt werden konnte, dass eine Deletion von UCP2 im Tiermodell mit metabolischer Regulation sowie einer erhöhten Akkumulation von ROS assoziiert ist, sollte überprüft werden, ob sich mittels AC16-Zellen ebenso in-vitro Evidenzen finden lassen. Hierfür wurde eine Hemmung der UCP2-mRNA-Translation durch eine RNA-Interferenz angestrebt (s. Kapitel 2.2.1.3).

Die humane, proliferationsfähige und immortalisierte Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 eignet sich zur Untersuchung redoxabhängiger und metabolischer Prozesse unter kontrollierten Bedingungen. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der kardialen Herkunft, der proliferativen Kapazität und der metabolischen Eigenschaften die Übertragbarkeit auf Skelettmuskelzellen nur eingeschränkt möglich ist. (Davidson et al. 2005; Litzkas et al. 1984; Voloshin et al. 2023; Okamoto et al. 2002; Kulebyakin et al. 2021)

Die erhobenen Daten sind dementsprechend keine direkte Abbildung skelettmuskelspezifischer Prozesse. Folglich wären zukünftige Studien an einer L6-Muskelzelllinie von Ratten oder an einer C2C12-Zelllinie von Mäusen ergänzend, um die physiologische Relevanz weiter zu validieren (Manabe et al. 2012).

Nach 48-stündiger Inkubation der siRNA konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine signifikante Herabregulierung von UCP2 nachgewiesen werden (s. Abbildung 12 und Abbildung 13). Diese Suppression bestätigte somit die Effizienz der eingesetzten siRNA. Da vermutet wird, dass die UCP2-Translation durch die siRNA-Applikation nur für eine begrenzte Zeit gehemmt wird (Kutsche 2020), bedarf es zukünftiger Untersuchungen, die eine zusätzliche Ausweitung auf eine 24-stündige Inkubation durchführen, um die zeitliche Stabilität und Reproduzierbarkeit der Daten weiter beurteilen zu können.

Außerdem kann ein möglicher Off-target-Effekt der siRNA und eine damit verbundene Veränderung von Enzym-Expressionen trotz zusätzlichem Einsatz einer scRNA in diesem Versuch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wäre ein Einsatz mehrerer siRNA-Sequenzen oder eine Durchführung mit geringeren siRNA-Konzentrationen empfehlenswert, um Nebeneffekte zu minimieren bzw. ausschließen zu können (Kittler et al. 2007; Caffrey et al. 2011).

Insgesamt stellt das in-vitro Modell der AC16-Zelle einen geeigneten Ansatz zur Analyse der Regulationen infolge einer UCP2-Suppression dar, wobei die Ergebnisse jedoch im Kontext der genannten Limitationen interpretiert werden müssen.

4.3.1 Herabregulation der BACE1-mRNA sowie posttranskriptionelle Reduktion von BACE1 infolge einer Suppression der UCP2-Translation

Nachdem eine Suppression der UCP2-Expression auf mRNA- und Proteinebene erfolgreich nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 12 A und Abbildung 13 A/B), wurden die potentiellen Auswirkungen auf metabolische und redox-assoziierte Zielgene untersucht. Hierfür wurde die mRNA-Expression von den in Tabelle 10 aufgeführten Enzymen und deren Proteinbiosynthese analysiert.

Hierbei war eine signifikante Reduktion der BACE1-mRNA sowie die parallele Reduktion auf Proteinebene zu beobachten (s. Abbildung 12 B und Abbildung 13 C). Diese Regulation auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene spricht für einen Zusammenhang zwischen der UCP2-Expresion und der Regulation von BACE1.

Vor diesem Hintergrund bleibt offen, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der BACE1-Expression primär durch die Suppression der UCP2-mRNA-Translation bedingt ist oder sekundär als Folge eines veränderten oxidativen Stresses auftritt.

In diesem Zusammenhang konnten Kwak et al. nachweisen, dass BACE1 in kultivierten Neuronen redoxsensitiv reguliert wird. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass niedrige NO-Konzentrationen die Transkription und die Enzymaktivität von BACE1 hemmen, während Wasserstoffperoxid mittels transkriptioneller Induktion der BACE1-Expression die enzymatische Aktivität steigert. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass dieser NO-vermittelte Regulationsmechanismus vermutlich als antioxidativer Schutz für BACE1 fungiert. (Kwak et al. 2011)

Obwohl sich diese Ergebnisse auf Neuronen beziehen, sprechen sie dafür, dass redoxabhängige Regulationsmechanismen ebenso in Muskelzellen einen Einfluss auf die BACE1-Proteinsynthese ausüben könnten. Es wäre denkbar, dass der UCP2-vermittelte Schutz eine indirekte Stabilisierung von BACE1 vor oxidativem Stress bewirkt, während die Suppression von UCP2 wiederum eine transkriptionelle und posttranskriptionelle Hemmung begünstigt. Es bleibt jedoch offen, inwiefern die von Kwak et al. beschriebene redoxsensitive Regulation von BACE1 in Neuronen auf myozytäre Zellen übertragbar ist. Zur weiteren Untersuchung dieses Zusammenhangs wären Analysen bezüglich der Akkumulation von ROS, beispielsweise mithilfe einer DHE-Färbung und der anschließenden quantitativen Auswertung, ergänzend. Hiermit könnte eine potentielle Korrelation zwischen oxidativem Stress und der Regulation von BACE1 erfasst werden und diese mit den bisher erhobenen Daten dieser Promotionsarbeit verglichen werden.

Die beobachtete Reduktion der BACE1-Expression könnte hinsichtlich der Regulation der Insulinsensitivität und der Glukoseaufnahme bedeutsam sein und auf eine metabolisch adaptive Antwort hinweisen (Taylor et al. 2022; Meakin et al. 2018). Zhang et al. postulierten, dass eine Deletion von UCP2 im Mausmodell mit einer verbesserten Insulinsekretion einhergeht (Zhang et al. 2001). Da eine hohe Konzentration von BACE1 mit einer Abschwächung der Insulinsensitivität sowie einer reduzierten Glukoseaufnahme korreliert (Taylor et al. 2022), könnte eine reduzierte BACE1-Expression folglich mit einer erhöhten Insulinsensitivität und einer gesteigerten Glukoseaufnahme verbunden sein. Aufgrund dessen könnte eine Herabregulierung der BACE1-mRNA und -Proteinsynthese bei vorliegender UCP2-Suppression als metabolische Adaption interpretiert werden und mit einer verbesserten Insulinsensitivität sowie einer gesteigerten Glukoseaufnahme einhergehen. Jedoch lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine direkten Rückschlüsse auf funktionelle Parameter ziehen.

Zusammenfassend unterstreichen die in-vitro gewonnenen Befunde die Ergebnisse der in-vivo Analysen. Beide experimentellen Ansätze deuten auf eine Korrelation von UCP2, oxidativem Stress sowie der Regulation von BACE1 hin. Die erhobenen Daten sprechen für eine

potentielle Rolle von UCP2 als Modulator metabolischer und redoxabhängiger Signalwege, wobei kein direkter kausaler Mechanismus belegt werden kann. In zukünftigen Studien sollten neben weiteren Analysen bezüglich der Akkumulation von ROS ebenso funktionelle Analysen der Insulinsensitivität, der Glukoseaufnahme und der Laktatkonzentration durchgeführt werden (Chanon et al. 2017), um die physiologische Relevanz der beobachteten Zusammenhänge weiter zu belegen.

4.4 Fazit

Die in den in-vitro-Versuchen erhobenen Daten dieser Promotionsarbeit liefern zusätzliche Evidenz für eine funktionelle Beteiligung von UCP2 an der redoxabhängigen und metabolischen Regulation myozytärer Zellen. Die beobachtete signifikante Reduktion der BACE1-Expression auf mRNA- und Proteinebene nach Suppression der UCP2-mRNA-Translation weist auf komplexe UCP2-abhängige Regulationsmechanismen hin.

Die Übereinstimmungen zwischen in-vivo- und in-vitro-Befunden hinsichtlich der Regulation von BACE1 deuten auf eine UCP2-abhängige Korrelation hin, die sowohl muskelfaserspezifisch im Skelettmuskel als auch in kardiomyozytären AC16-Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese Modell- und Gewebe-übergreifenden Ergebnisse sprechen dafür, dass UCP2 sowohl die ROS-Bildung beeinflusst als auch in redoxabhängige transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen spezifischer metabolischer und redoxsensitiver Zielgene eingebunden ist. Die Reproduzierbarkeit zentraler Effekte über Gewebe- und Modellgrenzen hinweg stärkt die Validität dieser Hypothese, ohne jedoch einen direkten kausalen Mechanismus abschließend belegen zu können.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass UCP2 eine relevante Rolle in der Energie- und ROS-Homöostase einnimmt. Sowohl die genetische Deletion von UCP2 unter normotensiven sowie unter hypertensiven Bedingungen als auch die experimentelle Suppression von UCP2 zeigten vergleichbare Effekte einer metabolischen Reprogrammierung, wobei diese im Skelettmuskel mit einem Anstieg des oxidativen Stresses einhergingen. Dabei zeigten sich muskelfasertypspezifische und enzyspezifische Unterschiede, die auf eine unterschiedliche Anpassungsfähigkeit oxidativer und glykolytischer Muskelfasertypen hinweisen. Die den beobachteten Ergebnissen zugrunde liegenden Signalwege im Zusammenhang mit ROS, NO und NAD^+/NADH konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit jedoch nicht identifiziert werden.

Die in Kapitel 1.9 aufgestellte Arbeitshypothese, dass eine durch UCP2-Defizienz vermittelte Verbesserung der skelettmuskulären mitochondriellen Effizienz die Expression von BACE1 senkt und potentiell zur Glukosehomöostase beiträgt, konnte teilweise verifiziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine muskelfasertypspezifische UCP2-BACE1-Korrelation, da im M. gastrocnemicus die BACE1-mRNA-Expression bei UCP2-defizienten Tieren signifikant erhöht ist, während im M. soleus keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden (s. Abbildung 6). Auf Proteinebene zeigte sich jedoch erst unter zusätzlicher vaskulärer Belastung durch eine L-Name induzierte Hypertonie im Sinne eines „Double-Hit“ eine signifikante Reduktion von BACE1 (s. Abbildung 10), was auf eine posttranskriptionelle Regulation hindeutet.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die vorliegenden Ergebnisse überwiegend auf strukturellen Analysen der mRNA- und Proteinexpression beruhen und sich somit keine direkten Rückschlüsse auf funktionelle Parameter wie der Insulinsensitivität oder Glukoseaufnahme zulassen. Demnach sollten zukünftige Studien funktionelle Untersuchungen beinhalten, um die physiologische sowie pathophysiologische Relevanz der beobachteten Zusammenhänge weiter zu klären.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit darauf hin, dass UCP2 hinsichtlich der mitochondrialen Funktion, des oxidativen Stresses und der metabolischen Regulation von Relevanz ist. Die Zusammenhänge zwischen UCP2, BACE1 und redoxabhängigen Anpassungsmechanismen könnten zukünftig insbesondere in Bezug auf metabolische und degenerative Erkrankungen von klinischer und therapeutischer Relevanz sein. Weitere Studien sind erforderlich, um die zugrunde liegenden molekularen Signalwege zu analysieren und deren medizinisches Potential zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Sowohl eine gestörte Glukose-Homöostase als auch eine Insulinresistenz fördern die Entstehung von Typ-2-Diabetes und gelten zudem als Risikofaktor von Alzheimer-Erkrankungen. Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass BACE1 (β -site of APP cleaving enzyme 1) nicht nur an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer beteiligt ist, sondern ebenfalls einen wichtigen Regulator in der Glukose-Homöostase des Skelettmuskels darstellt. (Meakin et al. 2012)

UCP2 ist ein mitochondrialer Entkoppler und könnte als molekularer Schalter des Energiestoffwechsels fungieren (Kutsche et al. 2020), wobei die Interaktion zwischen BACE1 und UCP2 bislang unzureichend verstanden ist.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es daher, die Hypothese zu überprüfen, dass eine Verbesserung der skelettmuskulären mitochondrialen Effizienz mittels UCP2-Defizienz die Expression von BACE1 senkt und dadurch zur Glukosehomöostase beiträgt. Hierzu wurden Expressionsanalysen von UCP2 und BACE1 in metabolisch unterschiedlichen Skelettmuskeln (M. gastrocnemius, M. soleus) durchgeführt. Ergänzend erfolgten Proteinanalysen (Western Blot), Bestimmungen des oxidativen Stresses mittels DHE-Färbungen sowie histologische Untersuchungen der Skelettmuskel-Proben von UCP2-defizienten und hypertensiven Ratten. Zusätzlich kamen siRNA-transfizierte AC16-Zellen für in-vitro-Analysen UCP2-abhängiger Effekte zum Einsatz.

Die Ergebnisse zeigten, dass chronisch hypertensive SHR-Tiere eine verminderte Expression von UCP2 sowie antioxidativen und metabolischen Enzymen bei gleichzeitig erhöhtem oxidativem Stress aufwiesen, was auf eine maladaptive Regulation der redox- und metabolischen Homöostase unter chronisch hypertensiven Bedingungen hindeutet. Im Gegensatz dazu führte eine Deletion von UCP2 zu muskelfasertypspezifischen Veränderungen im Energiestoffwechsel und der ROS-Homöostase. Besonders ausgeprägt waren diese Effekte im überwiegend glykolytisch arbeitenden M. gastrocnemius (Schmalbruch 1967), was mit seiner unter physiologischen Bedingungen höheren basalen UCP2-Expression im Einklang steht. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass UCP2 zur metabolischen Spezifizierung von Muskelfasertypen beiträgt, da es infolge der UCP2-Deletion zur metabolischen Annäherung beider untersuchter Muskeln kam.

Unter Bedingungen einer zusätzlichen L-Name induzierten Hypertonie zeigte sich eine muskelfaserspezifische Reduktion der BACE1-Proteinexpression, was auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hinweist, die im Sinne eines vaskulär-metabolischen „Double Hit“ interpretiert werden können. Die in-vitro Analysen konnten diese

Befunde insofern bestätigen, dass eine Suppression der UCP2-Translation in AC16-Zellen mit einer Herabregulation von BACE1 auf mRNA- und Proteinebene assoziiert war.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse über normo- und hypertensive Tiermodelle sowie über in-vivo und in-vitro Ansätze hinweg spricht für eine UCP2-abhängige Modulation redoxabhängiger und metabolischer Regulationsmechanismen. Dabei deuten die Befunde auf eine indirekte Einbindung von UCP2 in die ROS- und NO-abhängigen Signalachsen hin. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die vorliegenden Ergebnisse überwiegend auf strukturellen Analysen beruhen, sodass sich keine direkten Rückschlüsse auf funktionelle Parameter wie der Insulinsensitivität, der Glukoseaufnahme oder der mitochondriellen Effizienz ziehen lassen.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit die Relevanz von UCP2 für die Regulation der Energie- und ROS-Homöostase des Skelettmuskels. Die Arbeitshypothese, dass eine UCP2-Defizienz mit einer Reduktion von BACE1 korreliert und dadurch zur Glukosehomöostase beiträgt, konnte teilweise bestätigt werden und erwies sich als muskelfaser- und kontextabhängig. Die identifizierte muskelfasertypspezifische UCP2-BACE1-Korrelation und deren Abhängigkeit von vaskulären und redoxabhängigen Faktoren könnten zukünftig für das Verständnis von metabolischen und degenerativen Erkrankungen von klinischer und therapeutischer Relevanz sein. Weitere Studien sind erforderlich, um die zugrunde liegenden molekularen Signalwege zu charakterisieren und deren medizinisches Potential zu evaluieren.

6 Summary

Impaired glucose homeostasis and insulin resistance promote the development of type 2 diabetes and are considered a risk factor for Alzheimer's disease. Research has shown that BACE1 is not only involved in the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, but is also an important regulator of skeletal muscle glucose homeostasis. (Meakin et al. 2012) UCP2 is a mitochondrial uncoupling protein and could act as a molecular switch of energy metabolism (Kutsche et al. 2020), although there is still little knowledge about the interaction between BACE1 and UCP2.

To proof the hypothesis that an improvement in skeletal muscle mitochondrial efficiency via UCP2 deficiency decreases the expression of BACE1 and thereby contributes to glucose homeostasis, expression analyses of UCP2 and BACE1 were performed in metabolically different skeletal muscles (M. gastrocnemius, M. soleus). In addition, protein analyses (Western blot), determination of oxidative stress by DHE staining and histological examinations skeletal muscle samples were performed in UCP2-deficient and hypertensive rat models. In addition, siRNA-transfected AC16 cells were used for in vitro analyses.

The results showed that chronically hypertensive SHR animals exhibited a reduced expression of UCP2 as well as antioxidant and metabolic enzymes, concomitant with increased oxidative stress, indicating a maladaptive regulation of redox and metabolic homeostasis under chronic hypertensive conditions.

In contrast, the deletion of UCP2 led to muscle fiber type-specific changes in energy metabolism and ROS homeostasis. In particular, the predominantly glycolytic gastrocnemius muscle (Schmalbruch 1967) was affected, which is consistent with its higher basal UCP2 expression under physiological conditions. In addition, UCP2 appeared to influence the metabolic specialization of muscle fiber types, as UCP2 deletion led to a metabolic convergence of the two investigated muscles. Under conditions of additional L-Name-induced hypertension, posttranscriptional regulatory mechanisms became apparent, which may be interpreted in terms of a vascular-metabolic “double hit” model. In vitro, a suppression of UCP2 translation in AC16 cells also resulted in a downregulation of BACE1 at the mRNA and protein levels.

The consistency of these finding across normotensive and hypertensive animal models as well as across in vivo and in vitro approaches supports a UCP2-dependet modulation of redox-sensitive and metabolic regulatory mechanisms. The results further suggest an indirect involvement of UCP2 in ROS- and NO-dependent signalling pathways. However, the underlying molecular mechanisms could not be fully elucidated within the scope of this work.

In addition, it should be considered that the present results are predominantly based on structural analyses, thereby limiting direct conclusions regarding functional parameters such as insulin sensitivity, glucose uptake or mitochondrial efficiency.

In summary, UCP2 is important for the regulation of energy and ROS homeostasis in skeletal muscle. The hypothesis that UCP2 deficiency correlates with a reduction in BACE1 and thereby modulates glucose homeostasis could be partially confirmed. The identified muscle fiber type-specific UCP2-BACE1 correlation and its dependence on vascular and redox-related factors may be of clinical and therapeutic relevance for the understanding of metabolic and degenerative diseases in the future. Further studies are required to characterize the underlying molecular signalling pathways and to evaluate their medical potential.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μ	Mikro
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BACE1	β-site of APP cleaving enzyme 1
BACE2	β-site of APP cleaving enzyme 2
B2M	B ₂ -Mikroglobulin
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Ct	Schwellenwert-Zyklus
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
et al.	et alii
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HEPES	2 -(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hg.	Herausgeber
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
k	Kilo
kDa	Kilo Dalton

Ktr.	Kontrolle
l	Liter
m	Meter
m	Milli
M	Molar, Mol pro Liter
MCP1	Monozyte Chemoattractant Protein-1
MCP2	Monozyte Chemoattractant Protein-2
Mfn-2	Mitofusin 2
MHC	Myosin-Heavy-Chain
min	Minute
MLC	Myosin-Light-Chain
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PBS + T	phosphate buffered saline + tween
PCR	polymerase chain reaction
PDHA1	Pyruvat-Dehydrogenase Alpha 1
Pdhab	pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta
Pdhx	pyruvate dehydrogenase complex component X
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1
pH	pondus hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription/Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
scRNA	scrambled RNA
SD	Standardabweichung

SHR	spontan hypertensive Ratten
siRNA	small interfering RNA
siUCP2	siRNA spezifisch für UCP2
SLC2A1	solute carrier family 2 member 1
SLC2A2	solute carrier family 2 member 2
SOD	Superoxid-Dismutase
TBS	tris-buffered saline
u.a.	Unter anderem
UCP2	Entkopplerprotein 2 (uncoupling protein)
UCP2 ^{-/-}	UCP2-Knockout-Ratten
UE	Untereinheit
v.a.	Vor allem
Vgl.	Vergleich
WT	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus und M. gastrocnemicus der Kontrollgruppen (WT).....	54
Abbildung 2: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der Kontrollgruppe Wistar (WIS) und der spontan hypertensiven Gruppe (SHR).....	55
Abbildung 3: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wistar- (WIS) und der spontan hypertensiven Gruppe (SHR) ..	57
Abbildung 4: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO)	59
Abbildung 5: Analyse der mRNA-Expression im M. gastrocnemicus der Kontrollgruppe (WT) und der UCP2-Knockout-Gruppe (KO)	59
Abbildung 6: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wildtyp-Ratten (WT) und der normotensiven, UCP2-defizienten Ratten (KO)	61
Abbildung 7: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der normotensiven Wildtyp-Ratten (WT) und der normotensiven, UCP2-defizienten Ratten (KO)	62
Abbildung 8: Analyse der mRNA-Expression im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der hypertensiven Wildtyp-Tiere (WT-L-Name) und der hypertensiven, UCP2-defizienten Tiere (KO-L-Name).....	64
Abbildung 9: Veränderung des oxidativen Stresses im M. soleus (A) und M. gastrocnemicus (B) der hypertensiven Wildtyp-Tiere (WT-L-Name) und der hypertensiven, UCP2-defizienten Tiere (KO-L-Name).....	65
Abbildung 10: Analyse der Proteinsynthese von BACE1 in normotensiven und hypertensiven Wildtyp Ratten (WT und WT+L-NAME) und normotensiven und hypertensiven UCP2-defizienten Ratten (KO und KO+L-NAME) im M. gastrocnemicus (A).....	67
Abbildung 11: Analyse der Proteinsynthese von BACE1 in normotensiven und hypertensiven Wildtyp Ratten (WT und WT+L-NAME) und normotensiven und hypertensiven UCP2-defizienten Ratten (KO und KO+L-NAME) im M. soleus (B)	68
Abbildung 12: Analyse des Einflusses der Deletion der UCP2- Expression in AC16-Zellen auf die mRNA-Expression von UCP2 (A) und BACE1 (B).....	69
Abbildung 13: Analyse des Einflusses der Deletion der UCP2-Expression in AC16-Zellen auf die Proteinsynthese von UCP2 (A) und BACE1 (B).....	71

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	28
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 3: Geräte zur Isolation und Kultivierung.....	30
Tabelle 4: Geräte zur Proteinisolation und Durchführung von Western Blots.....	31
Tabelle 5: Geräte für die cDNA-Synthese und qPCR.....	31
Tabelle 6: Geräte zur Anfertigung von Kryoschnitten und zur histologischen Beurteilung	32
Tabelle 7: Softwares	32
Tabelle 8: Primärantikörper.....	34
Tabelle 9: Sekundärantikörper	35
Tabelle 10: Primersequenzen.....	35
Tabelle 11: Ansatz für 500 ml Zellmedium	39
Tabelle 12: Ansatz für siRNA- und scRNA-Transfektion.....	40
Tabelle 13: Lysis-Puffer, Ansatz für ca. 1 ml Lysis-Puffer.....	41
Tabelle 14: Verdünnung des Gewebelysates zur Proteinbestimmung im Verhältnis 1:20 bei einer Gewebeprobe von etwa 0,1 g.....	43
Tabelle 15: Verdünnung des Gewebelysates zur Proteinbestimmung im Verhältnis 1:10 bei einer Gewebeprobe von etwa 0,03 g.....	43
Tabelle 16: Transfer-Puffer für 0,5 l.....	44
Tabelle 17: Transferpufferaufteilung.....	44
Tabelle 18: Berechnung des Ansatzes der Proben.....	47
Tabelle 19: Reaktionsmix für die cDNA-Synthese (einfacher Ansatz).....	48
Tabelle 20: Reaktionsmix für die qPCR (einfacher Ansatz).....	50
Tabelle 21: Verdünnungsansatz des Farbstoffes (1:1000).....	51

10 Literaturverzeichnis

Acquati, F.; Accarino, M.; Nucci, C.; Fumagalli, P.; Jovine, L.; Ottolenghi, S.; Taramelli, R. (2000): The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. In: *FEBS letters* 468 (1), S. 59–64. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01192-3.

Adler, S.; Huang, H. (2004): Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 287 (5), F907-13. DOI: 10.1152/ajprenal.00060.2004.

Alam, Fahmida; Islam, Md Asiful; Khalil, Md Ibrahim; Gan, Siew Hua (2016): Metabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. In: *Current pharmaceutical design* 22 (20), S. 3034–3049. DOI: 10.2174/1381612822666160307145801.

Alán, Lukás; Smolková, Katarína; Kronusová, Eva; Santorová, Jitka; Jezek, Petr (2009): Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (1), S. 71–78. DOI: 10.1007/s10863-009-9201-2.

Anderson, Ethan J.; Neufer, P. Darrell (2006): Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 290 (3), C844-51. DOI: 10.1152/ajpcell.00402.2005.

Arnal, J. F.; el Amrani, A. I.; Chatellier, G.; Ménard, J.; Michel, J. B. (Hg.) (1993): Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade (22).

Arsenijevic, D.; Onuma, H.; Pecqueur, C.; Raimbault, S.; Manning, B. S.; Miroux, B. et al. (Hg.) (2000): Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production (26).

Barazzoni, R.; Nair, K. S. (2001): Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 280 (3), E413-9. DOI: 10.1152/ajpendo.2001.280.3.E413.

Baty, James W.; Hampton, Mark B.; Winterbourn, Christine C. (2005): Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. In: *The Biochemical journal* 389 (Pt 3), S. 785–795. DOI: 10.1042/BJ20050337.

-
- Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Loeloff, R.; Louis, J. C.; Curran, E.; Citron, M.; Vassar, R. (2000): Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (27), S. 20647–20651. DOI: 10.1074/jbc.M002688200.
- Boss, O.; Samec, S.; Dulloo, A.; Seydoux, J.; Muzzin, P.; Giacobino, J. P. (1997): Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold. In: *FEBS letters* 412 (1), S. 111–114. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00755-2.
- Boucher, Jérémie; Kleinridders, André; Kahn, C. Ronald (2014): Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a009191.
- Bouillaud, Frédéric (2009): UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. In: *Biochimica et biophysica acta* 1787 (5), S. 377–383. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2009.01.003.
- Brand, Martin D.; Esteves, Telma C. (2005): Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. In: *Cell metabolism* 2 (2), S. 85–93. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.06.002.
- Brandes, Ralf; Lang, Florian; Schmidt, Robert F. (Hg.) (2019): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit 850 Farabbildungen. Unter Mitarbeit von Ralf Brandes, Florian Lang und Robert F. Schmidt. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Lehrbuch).
- Broere, A.; van den Meiracker, A. H.; Boomsma, F.; Derkx, F. H.; Veld, A. J.; Schalekamp, M. A. (1998): Human renal and systemic hemodynamic, natriuretic, and neurohumoral responses to different doses of L-NAME. In: *The American journal of physiology* 275 (6), F870-7. DOI: 10.1152/ajprenal.1998.275.6.F870.
- Brown, Isola A. M.; Diederich, Lukas; Good, Miranda E.; DeLalio, Leon J.; Murphy, Sara A.; Cortese-Krott, Miriam M. et al. (2018): Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (9), S. 1969–1985. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311229.
- Caffrey, Daniel R.; Zhao, Juan; Song, Zhili; Schaffer, Michael E.; Haney, Steven A.; Subramanian, Romesh R. et al. (2011): siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. In: *PloS one* 6 (7), e21503. DOI: 10.1371/journal.pone.0021503.
- Cannon, Barbara; Nedergaard, Jan (2004): Brown adipose tissue: function and physiological significance. In: *Physiological reviews* 84 (1), S. 277–359. DOI: 10.1152/physrev.00015.2003.
- Casas, Silvia; Casini, Paola; Piquer, Sandra; Altirriba, Jordi; Soty, Maud; Cadavez, Lisa et al. (2010): BACE2 plays a role in the insulin receptor trafficking in pancreatic β -cells. In: *American*

journal of physiology. Endocrinology and metabolism 299 (6), E1087-95. DOI: 10.1152/ajpendo.00420.2010.

Chan, C. B.; MacDonald, P. E.; Saleh, M. C.; Johns, D. C.; Marbàn, E.; Wheeler, M. B. (1999): Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. In: *Diabetes* 48 (7), S. 1482–1486. DOI: 10.2337/diabetes.48.7.1482.

Chanon, Stephanie; Durand, Christine; Vieille-Marchiset, Aurelie; Robert, Maud; Dibner, Charna; Simon, Chantal; Lefai, Etienne (2017): Glucose Uptake Measurement and Response to Insulin Stimulation in In Vitro Cultured Human Primary Myotubes. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (124). DOI: 10.3791/55743.

Chen, Ming-Ming; Li, Yan; Deng, Shou-Long; Zhao, Yue; Lian, Zheng-Xing; Yu, Kun (2022): Mitochondrial Function and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Skeletal Muscle. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 826981. DOI: 10.3389/fcell.2022.826981.

Cheret, Cyril; Willem, Michael; Fricker, Florence R.; Wende, Hagen; Wulf-Goldenberg, Annika; Tahirovic, Sabina et al. (2013): Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. In: *The EMBO journal* 32 (14), S. 2015–2028. DOI: 10.1038/emboj.2013.146.

Christensen, Michelle A.; Zhou, Weihui; Qing, Hong; Lehman, Anna; Philipsen, Sjaak; Song, Weihong (2004): Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. In: *Molecular and cellular biology* 24 (2), S. 865–874. DOI: 10.1128/MCB.24.2.865-874.2004.

Cole, Sarah L.; Vassar, Robert (2007): The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. In: *Molecular neurodegeneration* 2, S. 22. DOI: 10.1186/1750-1326-2-22.

Cooper, Chris E. (2002): Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? In: *Trends in biochemical sciences* 27 (1), S. 33–39. DOI: 10.1016/s0968-0004(01)02035-7.

Costantini, Claudio; Ko, Mi Hee; Jonas, Mary Cabell; Puglielli, Luigi (2007): A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. In: *The Biochemical journal* 407 (3), S. 383–395. DOI: 10.1042/BJ20070040.

Davidson, Mercy M.; Nesti, Claudia; Palenzuela, Lluís; Walker, Winsome F.; Hernandez, Evelyn; Protas, Lev et al. (2005): Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 39 (1), S. 133–147. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2005.03.003.

Davignon, Jean; Ganz, Peter (2004): Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. In: *Circulation* 109 (23 Suppl 1), III27-32. DOI: 10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.

Di Lian; Chen, Ming-Ming; Wu, Hanyu; Deng, Shoulong; Hu, Xiaoxiang (2022): The Role of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Myogenesis and Muscle Disease. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (4). DOI: 10.3390/antiox11040755.

Dijkhorst-Oei, L. T.; Rabelink, T. J.; Boer, P.; Koomans, H. A. (1997): Nifedipine attenuates systemic and renal vasoconstriction during nitric oxide inhibition in humans. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 29 (5), S. 1192–1198. DOI: 10.1161/01.HYP.29.5.1192.

Doggrell, S. A.; Brown, L. (1998): Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. In: *Cardiovascular research* 39 (1), S. 89–105. DOI: 10.1016/s0008-6363(98)00076-5.

Dulhunty, Angela F.; Wei-LaPierre, Lan; Casarotto, Marco G.; Beard, Nicole A. (2017): Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 44 (1), S. 3–12. DOI: 10.1111/1440-1681.12676.

Dunne, Richard F.; Loh, Kah Poh; Williams, Grant R.; Jatoi, Aminah; Mustian, Karen M.; Mohile, Supriya G. (2019): Cachexia and Sarcopenia in Older Adults with Cancer: A Comprehensive Review. In: *Cancers* 11 (12). DOI: 10.3390/cancers11121861.

Duranti, Guglielmo (2023): Oxidative Stress and Skeletal Muscle Function. In: *International journal of molecular sciences* 24 (12). DOI: 10.3390/ijms241210227.

Echtay, Karim S.; Roussel, Damien; St-Pierre, Julie; Jekabsons, Mika B.; Cadenas, Susana; Stuart, Jeff A. et al. (2002): Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. In: *Nature* 415 (6867), S. 96–99. DOI: 10.1038/415096a.

Esterházy, Daria; Stützer, Ina; Wang, Haiyan; Rechsteiner, Markus P.; Beauchamp, Jeremy; Döbeli, Heinz et al. (2011): Bace2 is a β cell-enriched protease that regulates pancreatic β cell function and mass. In: *Cell metabolism* 14 (3), S. 365–377. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.06.018.

Fedorenko, Andriy; Lishko, Polina V.; Kirichok, Yuriy (2012): Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. In: *Cell* 151 (2), S. 400–413. DOI: 10.1016/j.cell.2012.09.010.

Fernandes, Denise C.; Wosniak, João; Pescatore, Luciana A.; Bertoline, Maria A.; Liberman, Marcel; Laurindo, Francisco R. M.; Santos, Célio X. C. (2007): Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (1), C413–22. DOI: 10.1152/ajpcell.00188.2006.

Ferrando, Beatriz; Gomez-Cabrera, Mari Carmen; Salvador-Pascual, Andrea; Puchades, Carlos; Derbré, Frederic; Gratas-Delamarche, Arlette et al. (2018): Allopurinol partially prevents disuse muscle atrophy in mice and humans. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 3549. DOI: 10.1038/s41598-018-21552-1.

Fleury, C.; Neverova, M.; Collins, S.; Raimbault, S.; Champigny, O.; Levi-Meyrueis, C. et al. (1997): Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. In: *Nature genetics* 15 (3), S. 269–272. DOI: 10.1038/ng0397-269.

Franco, A. A.; Odom, R. S.; Rando, T. A. (1999): Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. In: *Free radical biology & medicine* 27 (9-10), S. 1122–1132. DOI: 10.1016/s0891-5849(99)00166-5.

Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. In: *Annual review of biochemistry* 64, S. 97–112. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.

Gardiner, S. M.; Kemp, P. A.; Bennett, T. (1993): Effects of chronic treatment with nitric oxide synthase inhibitors on regional haemodynamic responses to vasodilators in conscious Brattleboro rats. In: *British journal of pharmacology* 109 (1), S. 222–228. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13557.x.

Gennaro Colonna, Vito de; Rigamonti, Antonello; Fioretti, Simona; Bonomo, Sara; Manfredi, Barbara; Ferrario, Paolo et al. (2005): Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. In: *European journal of pharmacology* 516 (3), S. 253–259. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.04.004.

Gersbacher, Manuel T.; Kim, Doo Yeon; Bhattacharyya, Raja; Kovacs, Dora M. (2010): Identification of BACE1 cleavage sites in human voltage-gated sodium channel beta 2 subunit. In: *Molecular neurodegeneration* 5, S. 61. DOI: 10.1186/1750-1326-5-61.

Goda, Nobuhito; Kanai, Mai (2012): Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. In: *International journal of hematology* 95 (5), S. 457–463. DOI: 10.1007/s12185-012-1069-y.

Gong, Ming C.; Arbogast, Sandrine; Guo, Zhenheng; Mathenia, Jeremy; Su, Wen; Reid, Michael B. (2006): Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 100 (2), S. 399–405. DOI: 10.1152/japplphysiol.00873.2005.

Grefte, Sander; Koopman, Werner J. H. (2021): Live-Cell Assessment of Reactive Oxygen Species Levels Using Dihydroethidine. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2275, S. 291–299. DOI: 10.1007/978-1-0716-1262-0_18.

Gründer und Schlüter (Hg.) (2023): Physiologie hoch2. Unter Mitarbeit von Manfred Frick, Jörg Geiger, Agnes Görlach, Claudia Großmann, Markus Hecker, Michaela Kress et al. Urban & Fischer Verlag. 2. Auflage. München: Elsevier (hoch2).

Halliwell (1987): Oxidants and human disease: some new concepts. Online verfügbar unter Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987 Nov;1(5):358-64. PMID: 2824268.

Hamilton, D. Lee; Findlay, John A.; Montagut, Gemma; Meakin, Paul J.; Bestow, Dawn; Jalicy, Susan M.; Ashford, Michael L. J. (2014): Altered amyloid precursor protein processing regulates glucose uptake and oxidation in cultured rodent myotubes. In: *Diabetologia* 57 (8), S. 1684–1692. DOI: 10.1007/s00125-014-3269-x.

Hansen, P. A.; Han, D. H.; Marshall, B. A.; Nolte, L. A.; Chen, M. M.; Mueckler, M.; Holloszy, J. O. (1998): A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle. Functional evaluation of potential mechanisms. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (40), S. 26157–26163. DOI: 10.1074/jbc.273.40.26157.

He, Long; He, Ting; Farrar, Shabnam; Ji, Linbao; Liu, Tianyi; Ma, Xi (2017): Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 44 (2), S. 532–553. DOI: 10.1159/000485089.

Heaton, G. M.; Wagenvoord, R. J.; Kemp, A.; Nicholls, D. G. (1978): Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. In: *European journal of biochemistry* 82 (2), S. 515–521. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12045.x.

Heinitz, Sascha; Piaggi, Paolo; Yang, Shanshan; Bonfiglio, Susan; Steel, Jason; Krakoff, Jonathan; Votruba, Susanne B. (2018): Response of skeletal muscle UCP2-expression during metabolic adaptation to caloric restriction. In: *International journal of obesity (2005)* 42 (5), S. 974–984. DOI: 10.1038/s41366-018-0085-2.

Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Koch, Hans-Georg; Löffler, Georg; Petrides, Petro E. (Hg.) (2022): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Lehrbuch).

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11 (9), S. 1026–1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.

Hippenmeyer, Simon; Shneider, Neil A.; Birchmeier, Carmen; Burden, Steven J.; Jessell, Thomas M.; Arber, Silvia (2002): A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. In: *Neuron* 36 (6), S. 1035–1049. DOI: 10.1016/s0896-6273(02)01101-7.

Howard, Amber C.; McNeil, Anna K.; McNeil, Paul L. (2011): Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. In: *Nature communications* 2, S. 597. DOI: 10.1038/ncomms1594.

Hu, Xiangyou; Hicks, Caitlin W.; He, Wanxia; Wong, Philip; Macklin, Wendy B.; Trapp, Bruce D.; Yan, Riqiang (2006): Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. In: *Nature neuroscience* 9 (12), S. 1520–1525. DOI: 10.1038/nn1797.

Hunt, C. C. (1990): Mammalian muscle spindle: peripheral mechanisms. In: *Physiological reviews* 70 (3), S. 643–663. DOI: 10.1152/physrev.1990.70.3.643.

Hurtaud, C.; Gelly, C.; Chen, Z.; Lévi-Meyrueis, C.; Bouillaud, F. (2007): Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2mRNA. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (14), S. 1853–1860. DOI: 10.1007/s00018-007-7039-5.

Huse, J. T.; Pijak, D. S.; Leslie, G. J.; Lee, V. M.; Doms, R. W. (2000): Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (43), S. 33729–33737. DOI: 10.1074/jbc.M004175200.

Ježek, Petr; Holendová, Blanka; Garlid, Keith D.; Jabůrek, Martin (2018): Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling. In: *Antioxidants & redox signaling* 29 (7), S. 667–714. DOI: 10.1089/ars.2017.7225.

Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Jones, S. A.; O'Donnell, V. B.; Wood, J. D.; Broughton, J. P.; Hughes, E. J.; Jones, O. T. (1996): Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. In: *The American journal of physiology* 271 (4 Pt 2), H1626-34. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1626.

Jordan, Jens; Kurschat, Christine; Reuter, Hannes (2018): Arterial Hypertension. In: *Deutsches Arzteblatt international* 115 (33-34), S. 557–568. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0557.

Joyner, Michael J.; Casey, Darren P. (2014): Muscle blood flow, hypoxia, and hypoperfusion. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 116 (7), S. 852–857. DOI: 10.1152/japplphysiol.00620.2013.

Kang, Eugene L.; Cameron, Andrew N.; Piazza, Fabrizio; Walker, Kendall R.; Tesco, Giuseppina (2010): Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (31), S. 24108–24119. DOI: 10.1074/jbc.M109.092742.

Kittler, Ralf; Surendranath, Vineeth; Heninger, Anne-Kristin; Slabicki, Mikolaj; Theis, Mirko; Putz, Gabriele et al. (2007): Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. In: *Nature methods* 4 (4), S. 337–344. DOI: 10.1038/nmeth1025.

Kopincová, Jana; Púzserová, Angelika; Bernátová, Iveta (2012): L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? In: *Pharmacological reports : PR* 64 (3), S. 511–520. DOI: 10.1016/s1734-1140(12)70846-0.

Krauss, Stefan; Zhang, Chen-Yu; Lowell, Bradford B. (2005): The mitochondrial uncoupling-protein homologues. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (3), S. 248–261. DOI: 10.1038/nrm1592.

Kuhn, Peer-Hendrik; Koroniak, Katarzyna; Hogl, Sebastian; Colombo, Alessio; Zeitschel, Ulrike; Willem, Michael et al. (2012): Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. In: *The EMBO journal* 31 (14), S. 3157–3168. DOI: 10.1038/emboj.2012.173.

Kuhn, Peer-Hendrik; Marjaux, Els; Imhof, Axel; Strooper, Bart de; Haass, Christian; Lichtenthaler, Stefan F. (2007): Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (16), S. 11982–11995. DOI: 10.1074/jbc.M700356200.

Kulebyakin, Konstantin; Tyurin-Kuzmin, Pyotr; Efimenko, Anastasia; Voloshin, Nikita; Kartoshkin, Anton; Karagyaour, Maxim et al. (2021): Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 662078. DOI: 10.3389/fcell.2021.662078.

Kurtz, T. W.; Morris, R. C. (1987): Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 10 (1), S. 127–131. DOI: 10.1161/01.hyp.10.1.127.

Kussmaul, Lothar; Hirst, Judy (2006): The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20), S. 7607–7612. DOI: 10.1073/pnas.0510977103.

Kutsche, Hanna S. (2020): Der Einfluss des Uncoupling Protein 2 auf das metabolische Remodeling des insuffizienten Myokards. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Giessen.

Kutsche, Hanna Sarah; Schreckenberger, Rolf; Schlüter, Klaus-Dieter (2022): Uncoupling Proteins in Striated Muscle Tissue: Known Facts and Open Questions. In: *Antioxidants & redox signaling* 37 (4-6), S. 324–335. DOI: 10.1089/ars.2021.0258.

Kutsche, Hanna Sarah; Schreckenberger, Rolf; Weber, Martin; Hirschhäuser, Christine; Rohrbach, Susanne; Li, Ling et al. (2020): Alterations in Glucose Metabolism During the Transition to Heart Failure: The Contribution of UCP-2. In: *Cells* 9 (3). DOI: 10.3390/cells9030552.

Kwak, Young-Don; Wang, Ruishan; Li, Jing Jing; Zhang, Yun-Wu; Xu, Huaxi; Liao, Francesca-Fang (2011): Differential regulation of BACE1 expression by oxidative and nitrosative signals. In: *Molecular neurodegeneration* 6, S. 17. DOI: 10.1186/1750-1326-6-17.

Le Moal, Emmeran; Pialoux, Vincent; Juban, Gaëtan; Groussard, Carole; Zouhal, Hassane; Chazaud, Bénédicte; Mounier, Rémi (2017): Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. In: *Antioxidants & redox signaling* 27 (5), S. 276–310. DOI: 10.1089/ars.2016.6782.

Li, Bo; He, Xinglishang; Lei, Shan-Shan; Zhou, Fu-Chen; Zhang, Ning-Yu; Chen, Ye-Hui et al. (2019): Hypertensive Rats Treated Chronically With N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) Induced Disorder of Hepatic Fatty Acid Metabolism and Intestinal Pathophysiology. In: *Frontiers in pharmacology* 10, S. 1677. DOI: 10.3389/fphar.2019.01677.

Li, Qiang; Youn, Ji-Youn; Cai, Hua (2015): Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. In: *Journal of hypertension* 33 (6), S. 1128–1136. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000587.

Liau, Nicholas P. D.; Laktyushin, Artem; Lucet, Isabelle S.; Murphy, James M.; Yao, Shenggen; Whitlock, Eden et al. (2018): The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1558. DOI: 10.1038/S41467-018-04013-1.

Lichtenthaler, Stefan F.; Dominguez, Diana-Ines; Westmeyer, Gil G.; Reiss, Karina; Haass, Christian; Saftig, Paul et al. (2003): The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (49), S. 48713–48719. DOI: 10.1074/jbc.M303861200.

Litzkas, P.; Jha, K. K.; Ozer, H. L. (1984): Efficient transfer of cloned DNA into human diploid cells: protoplast fusion in suspension. In: *Molecular and cellular biology* 4 (11), S. 2549–2552. DOI: 10.1128/mcb.4.11.2549-2552.1984.

Liu, W. Y.; He, W.; Li, H. (2013): Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, S. 780719. DOI: 10.1155/2013/780719.

-
- Liu, Y.; Schlumberger, A.; Wirth, K.; Schmidtbleicher, D.; Steinacker, J. M. (2003): Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 94 (6), S. 2282–2288. DOI: 10.1152/jappphysiol.00830.2002.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001a): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001b): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Luschtschak, Volodymyr I.; Lushchak, Oleh (2021): Interplay between reactive oxygen and nitrogen species in living organisms. In: *Chemico-biological interactions* 349, S. 109680. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109680.
- Malenfant, Simon; Lebreton, Marius; Breton-Gagnon, Émilie; Potus, François; Paulin, Roxane; Bonnet, Sébastien; Provencher, Steeve (2021): Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension: insight into central and peripheral pathophysiological mechanisms. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 30 (160). DOI: 10.1183/16000617.0284-2020.
- Malhotra, Jyoti D.; Kaufman, Randal J. (2007): Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? In: *Antioxidants & redox signaling* 9 (12), S. 2277–2293. DOI: 10.1089/ars.2007.1782.
- Manabe, Yasuko; Miyatake, Shouta; Takagi, Mayumi; Nakamura, Mio; Okeda, Ai; Nakano, Taemi et al. (2012): Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. In: *PloS one* 7 (12), e52592. DOI: 10.1371/journal.pone.0052592.
- Mao, W.; Yu, X. X.; Zhong, A.; Li, W.; Brush, J.; Sherwood, S. W. et al. (1999): UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. In: *FEBS letters* 443 (3), S. 326–330. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01713-x.
- Mayet, Jamil; Hughes, Alun (2003): Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. In: *Heart (British Cardiac Society)* 89 (9), S. 1104–1109. DOI: 10.1136/heart.89.9.1104.
- Mazzola, Jennifer L.; Sirover, Michael A. (2005): Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization. In: *Biochimica et biophysica acta* 1722 (2), S. 168–174. DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.12.010.

-
- McMillin, Shawna L.; Schmidt, Denise L.; Kahn, Barbara B.; Witczak, Carol A. (2017): GLUT4 Is Not Necessary for Overload-Induced Glucose Uptake or Hypertrophic Growth in Mouse Skeletal Muscle. In: *Diabetes* 66 (6), S. 1491–1500. DOI: 10.2337/db16-1075.
- Meakin, Paul J.; Harper, Alex J.; Hamilton, D. Lee; Gallagher, Jennifer; McNeilly, Alison D.; Burgess, Laura A. et al. (2012): Reduction in BACE1 decreases body weight, protects against diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity in mice. In: *The Biochemical journal* 441 (1), S. 285–296. DOI: 10.1042/BJ20110512.
- Meakin, Paul J.; Mezzapesa, Anna; Benabou, Eva; Haas, Mary E.; Bonardo, Bernadette; Grino, Michel et al. (2018): The beta secretase BACE1 regulates the expression of insulin receptor in the liver. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1306. DOI: 10.1038/S41467-018-03755-2.
- Menezes, Thaís C. F.; Lee, Michael H.; Fonseca Balladares, Dara C.; Nolan, Kevin; Sharma, Sankalp; Kumar, Rahul et al. (2025): Skeletal Muscle Pathology in Pulmonary Arterial Hypertension and Its Contribution to Exercise Intolerance. In: *Journal of the American Heart Association* 14 (4), e036952. DOI: 10.1161/JAHA.124.036952.
- Mohazzab, K. M.; Wolin, M. S. (1994): Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. In: *The American journal of physiology* 267 (6 Pt 1), L815-22. DOI: 10.1152/ajplung.1994.267.6.L815.
- Müller-Esterl (Hg.) (2011): Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka und Stefan Kerscher. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Nakazono, K.; Watanabe, N.; Matsuno, K.; Sasaki, J.; Sato, T.; Inoue, M. (1991): Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10045–10048. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10045.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2017): Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. In: *Lancet (London, England)* 389 (10064), S. 37–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31919-5.
- Nesci, Salvatore; Rubattu, Speranza (2024): UCP2, a Member of the Mitochondrial Uncoupling Proteins: An Overview from Physiological to Pathological Roles. In: *Biomedicines* 12 (6). DOI: 10.3390/biomedicines12061307.

Nicholls, Craig; Li, He; Liu, Jun-Ping (2012): GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 39 (8), S. 674–679. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x.

Nielsen, Joachim; Gejl, Kasper D.; Hey-Mogensen, Martin; Holmberg, Hans-Christer; Suetta, Charlotte; Krstrup, Peter et al. (2017): Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. In: *The Journal of physiology* 595 (9), S. 2839–2847. DOI: 10.1113/JP273040.

Okado-Matsumoto, A.; Fridovich, I. (2001): Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (42), S. 38388–38393. DOI: 10.1074/jbc.M105395200.

Okamoto, Takeshi; Aoyama, Tomoki; Nakayama, Tomitaka; Nakamata, Takeharu; Hosaka, Taisuke; Nishijo, Koichi et al. (2002): Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 295 (2), S. 354–361. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00661-7.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. (1963): Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. In: *Japanese circulation journal* 27, S. 282–293. DOI: 10.1253/jcj.27.282.

Orrenius, S.; McConkey, D. J.; Bellomo, G.; Nicotera, P. (1989): Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (7), S. 281–285. DOI: 10.1016/0165-6147(89)90029-1.

Palma, Flavio R.; He, Chenxia; Danes, Jeanne M.; Paviani, Veronica; Coelho, Diego R.; Gantner, Benjamin N.; Bonini, Marcelo G. (2020): Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. In: *Antioxidants & redox signaling* 32 (10), S. 701–714. DOI: 10.1089/ars.2019.7962.

Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Klink, Rainer; Bleich, Markus; Draguhn, Andreas et al. (Hg.) (2023): Physiologie. Unter Mitarbeit von Rüdiger Gay und Astrid Rothenburger. Georg Thieme Verlag KG. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E.; Brenowitz, M. (2000): A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. In: *Journal of molecular biology* 304 (1), S. 55–68. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4173.

Pearson, Timothy; Kabayo, Tabitha; Ng, Rainer; Chamberlain, Jeffrey; McArdle, Anne; Jackson, Malcolm J. (2014): Skeletal muscle contractions induce acute changes in cytosolic

superoxide, but slower responses in mitochondrial superoxide and cellular hydrogen peroxide. In: *PLoS one* 9 (5), e96378. DOI: 10.1371/journal.pone.0096378.

Pecqueur, Claire; Bui, Thi; Gelly, Chantal; Hauchard, Julie; Barbot, Céline; Bouillaud, Frederic et al. (2008): Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (1), S. 9–18. DOI: 10.1096/fj.07-8945com.

Pierini, Dan; Bryan, Nathan S. (2015): Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1208, S. 63–71. DOI: 10.1007/978-1-4939-1441-8_5.

Pinto, Y. M.; Paul, M.; Ganten, D. (1998): Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. In: *Cardiovascular research* 39 (1), S. 77–88. DOI: 10.1016/s0008-6363(98)00077-7.

Powers, Scott K.; Jackson, Malcolm J. (2008): Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. In: *Physiological reviews* 88 (4), S. 1243–1276. DOI: 10.1152/physrev.00031.2007.

Pravenec, Michal; Kurtz, Theodore W. (2010): Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. In: *Current hypertension reports* 12 (1), S. 5–9. DOI: 10.1007/s11906-009-0083-9.

Prokopidis, Konstantinos; Morwani-Mangnani, Jordi; McDowell, Garry; Lip, Gregory Y. H.; Venturelli, Massimo; Sankaranarayanan, Rajiv; Isanejad, Masoud (2024): Sarcopenia is linked to higher levels of B-type natriuretic peptide and its N-terminal fragment in heart failure: a systematic review and meta-analysis. In: *European geriatric medicine* 15 (4), S. 893–901. DOI: 10.1007/s41999-024-00950-x.

Qi, Chao; Song, Xianjing; Wang, He; Yan, Youyou; Liu, Bin (2022): The role of exercise-induced myokines in promoting angiogenesis. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 981577. DOI: 10.3389/fphys.2022.981577.

Qiu, Yumin; Xu, Shiyue; Chen, Xi; Wu, Xing; Zhou, Zhe; Zhang, Jianning et al. (2023): NAD⁺ exhaustion by CD38 upregulation contributes to blood pressure elevation and vascular damage in hypertension. In: *Signal transduction and targeted therapy* 8 (1), S. 353. DOI: 10.1038/s41392-023-01577-3.

Rahman, Irfan; Biswas, Saibal K.; Kode, Aruna (2006): Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. In: *European journal of pharmacology* 533 (1-3), S. 222–239. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

-
- Ralser, Markus; Wamelink, Mirjam M.; Kowald, Axel; Gerisch, Birgit; Heeren, Gino; Struys, Eduard A. et al. (2007): Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. In: *Journal of biology* 6 (4), S. 10. DOI: 10.1186/jbiol61.
- Ramsden, David B.; Ho, Philip W-L; Ho, Jessica W-M; Liu, Hui-Fang; So, Danny H-F; Tse, Ho-Man et al. (2012): Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. In: *Brain and behavior* 2 (4), S. 468–478. DOI: 10.1002/brb3.55.
- Rey, Federico E.; Pagano, Patrick J. (2002): The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22 (12), S. 1962–1971. DOI: 10.1161/01.ATV.0000043452.30772.18.
- Ricquier, D.; Bouillaud, F. (2000): The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. In: *The Biochemical journal* 345 Pt 2 (Pt 2), S. 161–179.
- Ricquier, D.; Kader, J. C. (1976): Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. In: *Biochemical and biophysical research communications* 73 (3), S. 577–583. DOI: 10.1016/0006-291X(76)90849-4.
- Rupprecht, Anne; Bräuer, Anja U.; Smorodchenko, Alina; Goyn, Justus; Hilse, Karolina E.; Shabalina, Irina G. et al. (2012): Quantification of uncoupling protein 2 reveals its main expression in immune cells and selective up-regulation during T-cell proliferation. In: *PloS one* 7 (8), e41406. DOI: 10.1371/journal.pone.0041406.
- Samec, S.; Seydoux, J.; Dulloo, A. G. (1999): Skeletal muscle UCP3 and UCP2 gene expression in response to inhibition of free fatty acid flux through mitochondrial beta-oxidation. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 438 (4), S. 452–457. DOI: 10.1007/s004249900080.
- Sanchis, D.; Fleury, C.; Chomiki, N.; Goubern, M.; Huang, Q.; Neverova, M. et al. (1998): BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (51), S. 34611–34615. DOI: 10.1074/jbc.273.51.34611.
- Schmalbruch, H. (1967): Fasertypen in der Unterschenkelmuskulatur der Maus. In: *Z. Zellforsch.* 79 (1), S. 64–75. DOI: 10.1007/BF00335244.
- Schrauwen, P.; Troost, F. J.; Xia, J.; Ravussin, E.; Saris, W. H. (1999): Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 (9), S. 966–972. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801026.

Schrauwen, Patrick; Hesselink, Matthijs (2002): UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. In: *The Journal of experimental biology* 205 (Pt 15), S. 2275–2285. DOI: 10.1242/jeb.205.15.2275.

Shenton, Daniel; Grant, Chris M. (2003): Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Biochemical journal* 374 (Pt 2), S. 513–519. DOI: 10.1042/BJ20030414.

Shiba, Tomoo; Kametaka, Satoshi; Kawasaki, Masato; Shibata, Masahiro; Waguri, Satoshi; Uchiyama, Yasuo; Wakatsuki, Soichi (2004): Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. In: *Traffic* 5 (6), S. 437–448. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.00188.x.

Sies, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. In: *Experimental Physiology* 82 (2), S. 291–295. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

Sies, H.; Cadenas, E. (1985): Oxidative stress: damage to intact cells and organs. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 311 (1152), S. 617–631. DOI: 10.1098/rstb.1985.0168.

Smith, J. B.; Cusumano, J. C.; Babbs, C. F. (1990): Quantitative effects of iron chelators on hydroxyl radical production by the superoxide-driven fenton reaction. In: *Free radical research communications* 8 (2), S. 101–106. DOI: 10.3109/10715769009087980.

Somers, M. J.; Mavromatis, K.; Galis, Z. S.; Harrison, D. G. (2000): Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. In: *Circulation* 101 (14), S. 1722–1728. DOI: 10.1161/01.cir.101.14.1722.

Stamler, J. S.; Meissner, G. (2001): Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. In: *Physiological reviews* 81 (1), S. 209–237. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.1.209.

Suda, Osamu; Tsutsui, Masato; Morishita, Tsuyoshi; Tanimoto, Akihito; Horiuchi, Masataka; Tasaki, Hiromi et al. (2002): Long-term treatment with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. In: *Circulation* 106 (13), S. 1729–1735. DOI: 10.1161/01.CIR.0000029749.16101.44.

Sun, Xiulian; Wang, Yingcheng; Qing, Hong; Christensen, Michelle A.; Liu, Yunqiang; Zhou, Weihui et al. (2005): Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7), S. 739–749. DOI: 10.1096/fj.04-3426com.

Suzuki, H.; Swee, A.; Zweifach, B. W.; Schmid-Schönbein, G. W. (1995): In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine

microfluorography. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 25 (5), S. 1083–1089. DOI: 10.1161/01.hyp.25.5.1083.

Talwar, Deepti; Miller, Colin G.; Grossmann, Justus; Szyrwił, Lukasz; Schwecke, Torsten; Demichev, Vadim et al. (2023): The GAPDH redox switch safeguards reductive capacity and enables survival of stressed tumour cells. In: *Nature metabolism* 5 (4), S. 660–676. DOI: 10.1038/s42255-023-00781-3.

Taylor, Hannah A.; Przemyłska, Lena; Clavane, Eva M.; Meakin, Paul J. (2022): BACE1: More than just a β -secretase. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 (7), e13430. DOI: 10.1111/obr.13430.

Valko, Marian; Leibfritz, Dieter; Moncol, Jan; Cronin, Mark T. D.; Mazur, Milan; Telser, Joshua (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (1), S. 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Vasileiadou, Olga; Nastos, George G.; Chatzinikolaou, Panagiotis N.; Papoutsis, Dimitrios; Vrampa, Dimitra I.; Methenitis, Spyridon; Margaritelis, Nikos V. (2023): Redox Profile of Skeletal Muscles: Implications for Research Design and Interpretation. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 12 (9). DOI: 10.3390/antiox12091738.

Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P. et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440), S. 735–741. DOI: 10.1126/science.286.5440.735.

Vassar, Robert; Kovacs, Dora M.; Yan, Riqiang; Wong, Philip C. (2009): The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (41), S. 12787–12794. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.

Vattemi, G.; Engel, W. K.; McFerrin, J.; Buxbaum, J. D.; Pastorino, L.; Askanas, V. (2001): Presence of BACE1 and BACE2 in muscle fibres of patients with sporadic inclusion-body myositis. In: *Lancet (London, England)* 358 (9297), S. 1962–1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06969-0.

Vetrivel, Kulandaivelu S.; Meckler, Xavier; Chen, Ying; Nguyen, Phuong D.; Seidah, Nabil G.; Vassar, Robert et al. (2009): Alzheimer disease A β production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (6), S. 3793–3803. DOI: 10.1074/jbc.M808920200.

-
- Vogel, Frank; Bornhövd, Carsten; Neupert, Walter; Reichert, Andreas S. (2006): Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. In: *The Journal of cell biology* 175 (2), S. 237–247. DOI: 10.1083/JCB.200605138.
- Voloshin, Nikita; Tyurin-Kuzmin, Pyotr; Karagyaur, Maxim; Akopyan, Zhanna; Kulebyakin, Konstantin (2023): Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. In: *International journal of molecular sciences* 24 (16). DOI: 10.3390/IJMS241612716.
- Wagner, Brett A.; Buettner, Garry R. (2016): Quantitative Changes in Dihydroethidium (DHE) Oxidation Products from Isolated Mitochondria While Respiring on Select Substrates and the Effects Mitochondrial Inhibitors Commonly Used in Bioenergetic Profiling. In: *Free radical biology & medicine* 100, S31. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.079.
- Wang, Haibo; Li, Rena; Shen, Yong (2013): β -Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases. In: *Trends in pharmacological sciences* 34 (4), S. 215–225. DOI: 10.1016/j.tips.2013.01.008.
- Wang, Tiantian; Zhou, Dong; Hong, Zhen (2025): Sarcopenia and cachexia: molecular mechanisms and therapeutic interventions. In: *MedComm* 6 (1), e70030. DOI: 10.1002/mco2.70030.
- Wang, Wang-Xia; Rajeev, Bernard W.; Stromberg, Arnold J.; Ren, Na; Tang, Guiliang; Huang, Qingwei et al. (2008): The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (5), S. 1213–1223. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5065-07.2008.
- Westerblad, Håkan; Bruton, Joseph D.; Katz, Abram (2010): Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. In: *Experimental cell research* 316 (18), S. 3093–3099. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.019.
- White, Amanda T.; Schenk, Simon (2012): NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 303 (3), E308-21. DOI: 10.1152/ajpendo.00054.2012.
- Williams, Bryan; Mancina, Giuseppe; Spiering, Wilko; Agabiti Rosei, Enrico; Azizi, Michel; Burnier, Michel et al. (2018): 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. In: *European heart journal* 39 (33), S. 3021–3104. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy339.

Wink, D. A.; Vodovotz, Y.; Grisham, M. B.; DeGraff, W.; Cook, J. C.; Pacelli, R. et al. (1999): Antioxidant effects of nitric oxide. In: *Methods in enzymology* 301, S. 413–424. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)01105-2.

Xia, Ruohong; Webb, Jason A.; Gnall, Lisa L. M.; Cutler, Kerry; Abramson, Jonathan J. (2003): Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 285 (1), C215-21. DOI: 10.1152/ajpcell.00034.2002.

Xiao, Wusheng; Wang, Rui-Sheng; Handy, Diane E.; Loscalzo, Joseph (2018): NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. In: *Antioxidants & redox signaling* 28 (3), S. 251–272. DOI: 10.1089/ars.2017.7216.

Xie, Ling; Helmerhorst, Erik; Taddei, Kevin; Plewright, Brian; van Bronswijk, Wilhelm; Martins, Ralph (2002): Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (10), RC221. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-j0001.2002.

Yamori, Y. (1991): Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man. In: *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice* 13 (5), S. 631–644. DOI: 10.3109/10641969109042066.

Yan, Riqiang (2017): Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 10, S. 97. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00097.

Yang, Ronghui; Guo, Zihao; Li, Binghui (2025): NADH reductive stress drives metabolic reprogramming. In: *Trends in cell biology*. DOI: 10.1016/j.tcb.2025.07.005.

Yen, T. T.; Yu, P. L.; Roeder, H.; Willard, P. W. (1974): A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. In: *Heredity* 33 (3), S. 309–316. DOI: 10.1038/hdy.1974.97.

Zhang, C. Y.; Baffy, G.; Perret, P.; Krauss, S.; Peroni, O.; Grujic, D. et al. (2001): Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. In: *Cell* 105 (6), S. 745–755. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00378-6.

Zhang, Yi; Zhou, Ben; Zhang, Fang; Wu, Jingxia; Hu, Yanan; Liu, Yang; Zhai, Qiwei (2012): Amyloid- β induces hepatic insulin resistance by activating JAK2/STAT3/SOCS-1 signaling pathway. In: *Diabetes* 61 (6), S. 1434–1443. DOI: 10.2337/db11-0499.

Zhao, Hongtao; Kalivendi, Shasi; Zhang, Hao; Joseph, Joy; Nithipatikom, Kasem; Vásquez-Vivar, Jeannette; Kalyanaraman, B. (2003): Superoxide reacts with hydroethidine but forms a

fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. In: *Free radical biology & medicine* 34 (11), S. 1359–1368. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00142-4.

Zhou, Lujia; Barão, Soraia; Laga, Mathias; Bockstael, Katrijn; Borgers, Marianne; Gijsen, Harry et al. (2012): The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (31), S. 25927–25940. DOI: 10.1074/jbc.M112.377465.

Zurlo, F.; Larson, K.; Bogardus, C.; Ravussin, E. (1990): Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. In: *The Journal of clinical investigation* 86 (5), S. 1423–1427. DOI: 10.1172/JCI114857.

11 Anhang

11.1 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 nichtveröffentlichten 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 Grundsätze 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 Grundsätze 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. Alle 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

12 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich bei all denjenigen aufrichtig bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter für die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsthemas, seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und wertvolle Unterstützung. Sein Engagement und seine fachliche Expertise haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Dr. Rolf Schreckenberger danke ich besonders für seine Unterstützung hinsichtlich der Methodik, seine fachliche Beratung und seine jederzeitige Hilfsbereitschaft.

Ebenso spreche ich Frau Nadine Woitasky, Frau Karin Westermann und Frau Nadja Itani meinen Dank aus. Ohne ihre technische Unterstützung und ihre Hilfe wäre die praktische Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt zudem Frau Prof. Dr. Susanne Rohrbach für das freundliche Zurverfügungstellen der GLUT1- und GLUT4-Antikörper, Frau Prof. Dr. Elena Pohl für den UCP2-Antikörper sowie Herrn Prof. Dr. Péter Ferdinandy für die Bereitstellung der AC16-Zelllinie.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten Team des Physiologischen Instituts sowie allen Promovierenden für das kollegiale Miteinander und die produktive Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt danke ich meinen Großeltern aufrichtig für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionsarbeit.