

Aus dem Bereich Innere Medizin – Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. M. Böhm

**Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer Atmung und reaktiver
Sauerstoffspezies im Herzen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von: Jasmin Anni Saar
geb. am: 09.03.1986 in Saarbrücken

Dekan:

Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Tag des Kolloquiums:

Berichterstatter:

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

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

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

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

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

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

Homburg, den 17.09.2014

(Jasmin Anni Saar)

Sämtliche Messungen an isolierten Myozyten wurden von mir selbst nach Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes (Direktor: Universitätsprofessor Dr. M. Böhm) durchgeführt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	IV
1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer Atmung und reaktiver Sauerstoffspezies im Herzen.....	1
1.2 The role of STAT3 on mitochondrial respiration and reactive oxygen species in the heart.....	2
2. Einleitung.....	5
2.1 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	6
2.1.1 Definition der Herzinsuffizienz.....	6
2.1.2 Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	6
2.2 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung.....	7
2.3 Die Physiologie der mitochondrialen Energetik und ihrer Anpassungsmechanismen.....	9
2.4 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz und deren Auswirkungen auf den Redoxstatus und die mitochondriale Energetik.....	12
2.5 Die Rolle von STAT3 und sein Beitrag zur Herzinsuffizienz.....	16
2.5.1 Die Rolle von STAT3 als Transkriptionsfaktor.....	16
2.5.2 Die Entwicklung und der Phänotyp von STAT3-Knockout Mäusen.....	20
2.5.3 Die Rolle von STAT3 in Mitochondrien.....	22
2.5.4 Die Rolle von STAT3 bei Ischämie/Reperfusion.....	22
2.3 Fragestellung der Arbeit.....	26
3. Materialien und Methoden.....	28
3.1 Materialien.....	28
3.1.1 Versuchsmaterial.....	28
3.1.1.1 Versuchstiere.....	28
3.1.2 Verwendete Substanzen.....	28
3.1.2.1 Substanzen zur Herstellung des Perfusionspuffers.....	28
3.1.2.2 Substanzen zur Herstellung Stopppuffer 1, 2 und Liberasepuffer.....	29
3.1.2.3 Weitere zur Myozytenisolation verwendete Substanzen.....	29
3.1.2.4 Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen.....	30

3.1.2.5 Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere	30
3.1.2.6 Präparations- und Isolationsinstrumentarium.....	30
3.1.2.7 Anlage zur Messung der Fluoreszenzen.....	31
3.1.2.8 Substanzen der Tyrodelösung	33
3.1.2.9 Weitere Substanzen zur Myozytenmessung im Fluoreszenzmikroskop	33
3.1.2.10 Farbstoffe zur Myozytenfärbung und die Lösungsmittel	33
3.1.2.11 Beschichtung der Deckgläschen.....	34
3.1.2.12 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	34
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Myozytenisolation	36
3.2.2 Implantation von osmotischen Minipumpen mit Freisetzung von Isoprenalin.....	40
3.2.3 Transfer der Myozyten auf die Deckgläschen.....	40
3.2.4 Aufbau der Messanlage und Messprotokoll.....	41
3.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe	49
3.2.6 Auswertung der Messergebnisse	53
4. Ergebnisse	54
4.1 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsmessungen der myokardialen STAT3 -KO	
und Wildtyp Mäusemyozyten	54
4.1.1 Zellverkürzungsmessungen	54
4.1.2 Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration	57
4.1.3 Messungen der intrazellulären Natriumkonzentration	59
4.1.4 Messungen des Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD ⁺	60
4.1.5 Messungen des mitochondrialen Membranpotentials	62
4.1.6 Messungen der mitochondrialen Superoxidproduktion	63
4.2 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsmessungen der myokardialen STAT3 -KO	
und Wildtyp-Mäusemyozyten nach subkutan implantierter Isoprenalinpumpe	66
4.2.1 Zellverkürzungsmessungen	66
4.2.2 Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	67
4.2.3 Messungen der intrazellulären Natriumkonzentration	70
4.2.4 Messungen des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD ⁺	71
4.2.5 Messungen des mitochondrialen Membranpotentials	73
4.2.6 Messungen der mitochondrialen Superoxidproduktion	74
5. Diskussion	76

5.1 Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale ATP-Produktion.....	76
5.2 Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale Superoxidproduktion	79
5.3 Der Einfluss von STAT3 auf die Redoxäquivalente NAD(P)H und FADH ₂	84
5.4 Der Einfluss von STAT3 auf den Kalziumhaushalt.....	86
5.5 Der Einfluss von STAT3 auf den Natriumhaushalt	88
5.6 Ausblick	89
5.7 Zusammenfassung.....	90
6. Literaturverzeichnis.....	92
7. Publikationen/ Danksagung	108
8. Lebenslauf.....	111

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AfCS	Alliance for Cellular Signaling
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosin-Triphosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
β -AR	beta-Adrenozeptor
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Kalzium
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	zytosolische Kalziumkonzentration
CCD	charge-coupled device; lichtempfindlicher Chip zur Datenspeicherung
CN	Zyanid
Cre	Rekombinase, Typ I Topoisomerase eines P1 Bacteriophagens
\emptyset	Durchmesser
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DCLP	Dichroic long pass
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FAD^+	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH_2	reduzierte Form von FAD^+
FCCP	Carbonylzyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetales Kalbsserum

GAS-Element	Interferon gamma aktivierte Sequenz
gp130	Glykoprotein 130, transmembranöses Protein, auch CD130 genannt
GSH	Glutathion
h	Stunde
Hz	Hertz (1/s)
I_{ca}	Kalziumeinstrom
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
IL-6	Interleukin 6
Indo-1, AM	Fluoreszenzfarbstoff und Kalziumindikator, Acetoxymethylester
Iso	Isoprenalin
JAK	Januskinase
K^+	Kalium
λ	Wellenlänge
MAP-K	MAP-Kinase
mNCE	mitochondrialer Na^+/Ca^{2+} -Austauscher
ml, μ l	Milliliter, Mikroliter
MCU	Mitochondrialer Kalzium Uniporter
MG	Molekulargewicht
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minuten
mol, mmol,	Mol, Millimol,
μ mol, nmol	Mikromol, Nanomol
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
n	Anzahl der Experimente (bzw. Anzahl der Zellen)
Na^+	Natrium

NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-H+H+
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat-H+H+
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher in der Zellmembran
[Na ⁺] _i	zytosolische Natriumkonzentration
NMRI	Naval Medical Research Institute
Nnt	Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase
NT _A	Normaltyrode A
NT _B	Normaltyrode B
·O ₂ ⁻	Superoxidradikal
p	p-Wert, Signifikanzwert
pc	polychroisch
PCI	Perkutane Koronarintervention
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLB	Phospholamban
PMT	Photomultiplier
PPCM	postpartale Kardiomyopathie
PTP	permeability transition pore
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Relaxationszeit
s.	siehe
s, ms	Sekunden, Millisekunden
s.c.	subkutan
SBFI	Natrium bindendes Benzofuran-Isophthalat
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes

SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA	SR-Ca ²⁺ -ATPase
STAT	Signalübermittler und Aktivator der Transkription
STAT3-KO	STAT-3 Knockout
TMRM ⁺	Tetramethylrhodamin-methylester
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

1.1 Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer Atmung und reaktiver Sauerstoffspezies im Herzen

Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Herabregulation von dem Signal Transducer und Aktivator der Transkription 3 (STAT3), zu einer sympathischen Aktivierung, sowie zu oxidativem Stress. Alle drei Faktoren sind kausal am Progress einer Herzinsuffizienz beteiligt. So prädisponiert zum Beispiel die genetische Deletion des Transkriptionsfaktors STAT3 zu einer Alters- und Schwangerschafts-assoziierten Herzinsuffizienz. Vor kurzem wurde suggeriert, dass STAT3 neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine wichtige Rolle in Mitochondrien bei der Regulation der Atmungskettenfunktion spielt. So war in isolierten Mitochondrien von Mäusen mit genetischer Deletion von STAT3 (STAT3-KO) die maximale mitochondriale Atmungskapazität um etwa 50% reduziert. Um die Rolle von STAT3 für die Regulation der mitochondrialen Energetik und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen, isolierten wir Herzmuskelzellen von Mäusen mit kardiomyozyten-spezifischer Deletion von STAT3 (STAT3-KO) und Wild-Typ Geschwistertieren (WT). Die Kardiomyozyten wurden im elektrischen Feld mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Um eine Arbeitslasterhöhung zu provozieren wurden die Herzmuskelzellen für drei Minuten dem β -Adrenozeptor (β -AR) Agonisten Isoprenalin (30nM) und einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz ausgesetzt. Danach wurde die Stimulationsfrequenz wieder auf 0,5 Hz gesenkt und Isoprenalin ausgewaschen. Mithilfe einer CCD-Kamera wurde die Sarkomerverkürzung in diesen Kardiomyozyten aufgenommen und gleichzeitig durch fluoreszenzoptische Methoden entweder die Autofluoreszenz von NADH, NADPH und FAD^+ , oder alternativ mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die zytosolische Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$), die intrazelluläre Natriumkonzentration ($[Na^+]_i$), das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) oder die mitochondriale Superoxidproduktion ($\cdot O_2^-$) registriert. Die Kinetiken der Zellverkürzung waren in STAT3-KO Myozyten leicht verlangsamt, die globalen $[Ca^{2+}]_c$ und $[Na^+]_i$ jedoch unverändert. Der Redoxstatus von NAD(P)H und FADH war bei WT und STAT3-KO Myozyten unter Basalbedingungen unverändert (~65% reduziert) und wurde durch die erhöhte Arbeitslast (Isoprenalin/5Hz) im gleichen Ausmaß oxidiert, was auf eine vergleichbare Beschleunigung der ADP-induzierten Atmung hinweist. Dementsprechend blieb in beiden Gruppen $\Delta\Psi_m$ während der gesamten Messung gleich. Die $\cdot O_2^-$ -Produktion blieb in WT Myozyten stabil, erhöhte sich aber

zweifach in der ersten Minute nach Arbeitslasterrhöhung in STAT3-KO Myozyten und normalisierte sich im Anschluss. Somit ist festzuhalten, dass unter basalen Bedingungen das Fehlen von STAT3 keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung und nur im geringen Umfang auf die mitochondriale ROS-Produktion hat. Um zu untersuchen, ob durch das Fehlen von STAT3 und *chronischer* β -adrenerger Stimulation mitochondriale Defekte auftreten, wurden in beide Versuchsgruppen für jeweils 24 Stunden osmotische, mit Isoprenalin gefüllte Minipumpen implantiert. Nach dieser Behandlung war der NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD⁺ Redoxstatus in beiden Gruppen stärker oxidiert gegenüber Zellen von Mäusen, die nicht chronisch mit Isoprenalin behandelt wurden (~35% vs. ~65% reduziert). Durch akute β -AR Stimulation und Erhöhung der Frequenz auf 5 Hz kam es in WT Myozyten zu einer kontinuierlichen Regeneration des Redoxstatus auf ca. 55%, während diese in STAT3-KO Myozyten ausblieb und sogar eine weitere Oxidation beobachtet wurde (auf ca. 28%), trotz unverändertem $\Delta\Psi_m$ in beiden Gruppen. Dies war bei STAT3-KO Myozyten mit einer Verringerung der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme sowie einer 2,3-fachen Erhöhung der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion unter Isoprenalin im Vergleich zu WT Kardiomyozyten assoziiert. Darüber hinaus war die Aktivität des Zitratzyklusenzym Aconitase, welches durch oxidativen Stress inhibiert wird, in STAT3-KO Mitochondrien gegenüber WT reduziert. Wir schlussfolgern, dass es durch das Fehlen von STAT3 zu einem Defekt der mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme kommt, die zu einer verringerten Stimulation des Zitratzyklus und somit einer reduzierten Regeneration von NADH und NADPH kommt, was zum einen ein energetisches Defizit und zum anderen oxidativen Stress provozieren könnte, da NADPH für die Regeneration von mitochondrialen antioxidativen Enzymen, wie z. B. Glutathionperoxidase und Thioredoxin benötigt wird. Deshalb könnte die Herabregulation von STAT3 bei Herzinsuffizienz im Rahmen der bei dieser Erkrankung charakteristischen chronischen β -adrenergen Stimulation zu oxidativem Stress und zum Fortschreiten der Erkrankung führen.

1.2 The role of STAT3 on mitochondrial respiration and reactive oxygen species in the heart

In human failing hearts, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is down regulated and chronic sympathetic activation and oxidative stress are important hallmarks of the disease. All three factors are causally linked to the progress of heart failure. For example,

the genetic deletion of STAT3 predisposes to age- and pregnancy-related heart failure. Recently it was suggested that besides its function as a transcription factor, STAT3 plays an important role regulating the function of the respiratory chain. In isolated mitochondria from mice with a genetic knockout of STAT3 (STAT3-KO), maximal mitochondrial respiratory capacity was reduced by approximately 50%. To investigate the role of STAT3 for the regulation of mitochondrial energetics and production of reactive oxygen species (ROS), isolated cardiomyocytes were isolated from mice with a cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 (STAT3-KO) and wild-type littermates (WT). The cardiomyocytes were field-stimulated with a frequency of 0.5 Hz. To induce an increase in workload, myocytes were exposed to the β -adrenoceptor agonist (β -AR) isoproterenol (30nM) and 5 Hz stimulation frequency for three minutes. After this, the stimulation frequency was lowered to 0.5 Hz and isoproterenol was washed-out. With the aid of a CCD camera, sarcomere shortening of the cardiomyocytes was analyzed together with the autofluorescence of NADH, NADPH and FAD⁺. Alternatively, with the use of fluorescent indicators, the cytosolic concentrations of Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c) or sodium ([Na⁺]_i), the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) or the mitochondrial production of superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) were measured. Kinetics of cell shortening were slightly slower in STAT3-KO myocytes, while [Ca²⁺]_c and [Na⁺]_i were unchanged. Redox-states of NAD(P)H and FADH were comparable in WT and STAT3-KO at baseline (~65% reduced) and oxidized by a similar degree upon increased workload (isoproterenol/5Hz), indicating similar increases in ADP-induced respiration. Accordingly, $\Delta\Psi_m$ was maintained during our protocol in both groups. $\cdot\text{O}_2^-$ -production remained stable in WT myocytes, but increased 2-fold in the first minute after the workload transition in STAT3-KO myocytes and normalized thereafter. Thus, under basal conditions lack of STAT3 has no influence on mitochondrial respiration and just in a small amount on the mitochondrial ROS production. To test whether STAT3 deficiency plus *chronic* β -adrenergic stimulation induce mitochondrial damage, mice were treated with isoproterenol for 24 h in vivo (osmotic minipump). After this treatment, NAD(P)H/NAD(P)⁺ and FADH₂/FAD⁺ redox states were more oxidized in isolated cardiomyocytes at baseline in both genotypes in contrast to mice not chronically stimulated with iso (~35% vs. ~65% reduced). Through β -adrenergic stimulation and raising frequency to 5 Hz there was a continuous regeneration to nearly 55% in WT myocytes, while this could not be observed in STAT3-KO, where even further oxidation was observed (to 28%) despite maintained $\Delta\Psi_m$ in both groups. This was associated with a decreased mitochondrial calcium uptake and a 2.3-fold increase in $\cdot\text{O}_2^-$ formation during the

influence of isoproterenol in STAT3-KO compared to WT cardiomyocytes. Furthermore the activity of the Krebs cycle enzyme aconitase, which gets inhibited by oxidative stress, was lowered in STAT3-KO mitochondria compared to WT. We conclude that through deletion of STAT3 there is a malfunction in mitochondrial Ca^{2+} uptake which leads to a decreased stimulation of Krebs cycle enzymes and a reduced regeneration of NADH and NADPH what on the one hand could provoke an energetic deficiency and oxidative stress on the other hand because NADPH is needed for the regeneration of mitochondrial antioxidative enzymes, like glutathione peroxidase and thioredoxin. Thus, in the face of chronic β -adrenergic stimulation in heart failure, down regulation of STAT3 may contribute to oxidative stress and the progression of the disease.

2. Einleitung

Das Syndrom der Herzinsuffizienz ist derzeit der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt in Deutschland (Neumann et al., 2009). Dabei war 2011 in Deutschland die Herzinsuffizienz mit 380.094 Fällen die zweithäufigste Hauptdiagnose. Bei vollstationären Patienten in Deutschland wird die Diagnose Herzinsuffizienz sehr häufig gestellt, bei Männern stand sie 2011 mit 183.000 hospitalisierten Fällen an zweiter Stelle, bei Frauen war sie im gleichen Jahr mit 197.000 hospitalisierten Fällen (wenn man die Diagnose Lebendgeburt nicht einrechnet) die am häufigsten gestellte Diagnose (Statistisches Bundesamt, 2013a). Bezogen auf die absolute Anzahl war die Herzschwäche im Jahr 2011 die dritthäufigste Todesursache in Deutschland nach dem akuten Myokardinfarkt und der chronischen ischämischen Herzkrankheit. Geschlechtsspezifische Unterschiede konnte man nachweisen, bei Frauen spielte die Herzinsuffizienz eine größere Rolle (Rang zwei der Todesursachen), bei Männern belegte sie hingegen Platz vier und folgte den bösartigen Neubildungen der Bronchien und der Lunge (Statistisches Bundesamt, 2013b). Die bundesweiten Krankheitskosten der Herzinsuffizienz wurden für das Jahr 2008 auf rund 3,2 Milliarden Euro geschätzt (Statistisches Bundesamt, 2013c).

Der Krankheitsverlauf der Herzinsuffizienz ist durch wiederkehrende Krankenhausaufenthalte sowie einer schlechten Prognose in Bezug auf das Überleben gekennzeichnet. In der Framingham Studie zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit, in den nächsten fünf Jahren nach Diagnose Herzinsuffizienz zu sterben, für Männer zwischen 62 und 75%, für Frauen zwischen 38 und 42% lag. Im Vergleich dazu betrug im gleichen Jahr in Amerika die Fünfjahresüberlebensrate für Krebserkrankungen im Mittel etwa 50% (McMurray et al., 2000). Bedingt durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft ist zu erwarten, dass die Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz künftig stark ansteigen und noch an Bedeutung bei der ärztlichen Versorgung der Bevölkerung zunehmen, sowie auch in volkswirtschaftlicher Sicht noch größere finanzielle Aufwendungen in der Krankenversorgung verursachen wird (Stewart et al., 2003; McMurray & Pfeffer, 2005). Daher ist es sowohl erforderlich die Ursachen der Herzinsuffizienz weiter zu ergründen, als auch Ansatzpunkte für bessere diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu finden.

2.1 Ursachen und Epidemiologie der Herzinsuffizienz

2.1.1 Definition der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird von der WHO beschrieben als die Unfähigkeit des Herzens, den Körper mit ausreichend Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- und Belastungsbedingungen zu gewährleisten (WHO 1995). Eine Erweiterung der Definition der Herzinsuffizienz (Jackson et al., 2000) verweist zusätzlich auf das komplexe Muster neurohumoraler Veränderungen, z.B. die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, welche angesichts der kontraktilen Dysfunktion den Blutdruck aufrecht erhalten soll, allerdings eine erhöhte periphere Vasokonstriktion sowie Volumenüberladung und somit eine erhöhte kardiale Vor- und Nachlast mit sich bringen.

Klinisch liegt dann eine Herzinsuffizienz vor, wenn der Symptomenkomplex Müdigkeit (Leistungsminderung), Kurzatmigkeit und Flüssigkeitsretention auf dem Boden einer kardialen Funktionsstörung besteht. Bei einer asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion besteht eine objektivierbare kardiale Dysfunktion, der Patient ist jedoch unter Therapie beschwerdefrei (NVL Chronische Herzinsuffizienz, 2012).

2.1.2 Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist ein großes und an Bedeutung zunehmendes Problem in industrialisierten Populationen mit einer immer älter werdenden Bevölkerung. Die Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz ist stark altersabhängig (McMurray et al., 2000). In Europa schätzt man die Zahl herzinsuffizienter Patienten auf mehr als 10 Millionen, ein nochmal so großes Patientenkollektiv weist darüber hinaus eine systolische kardiale Dysfunktion ohne Herzinsuffizienzsymptome auf. Zwischen 45 und 55 Jahren leidet noch weniger als 1% der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz, wohingegen zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr 2-5% der Bevölkerung betroffen sind, bei den über 80-Jährigen fast 10%. Männer weisen mit einer Geschlechterrelation von ca. 1,5:1 im Vergleich zu gleichaltrigen Frauen eine höhere Prävalenz auf. Jedoch nimmt besonders bei Frauen der Anteil einer diastolischen Herzinsuffizienz im Alter zu, bei älteren Patienten macht sie einen Anteil von 30%, bei Patientinnen über 40% aus (Hoppe et al., 2005).

Zu den Ursachen der steigenden Prävalenz von Herzinsuffizienz gehören also auf der einen Seite die alternde Bevölkerung in den Industrienationen und auf der anderen Seite die sich verbessernden Überlebenschancen nach einem Myokardinfarkt, Kardiomyopathien,

sekundären Myokarderkrankungen oder Herzklappenerkrankungen. Dadurch, dass ein stattgehabter Herzinfarkt den größten Risikofaktor für eine Herzinsuffizienz darstellt, wird auch ersichtlich, dass die Prävalenz in Zukunft ansteigen wird (Stewart et al., 2003; Muth et al., 2006). Die genauen Mechanismen, die zur kardialen Dysfunktion und zur terminalen Herzinsuffizienz führen sind jedoch nicht hinreichend aufgeklärt.

2.2 Die Physiologie der elektromechanischen Kopplung

Die elektromechanische Kopplung im Herzen ist der Prozess von der elektrischen Erregung einer Myozyte bis hin zur Kontraktion des Herzens, wobei Kalzium (Ca^{2+}) eine entscheidende Rolle zukommt (Bers, 2002). Während des Aktionspotentials kommt es zur Aktivierung und Öffnung von spannungsabhängigen Natrium(Na^+)-Kanälen. Der einwärts gerichtete Na^+ -Strom führt zur schnellen Depolarisation der Zellmembran und zur Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Dabei triggert der Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle die Öffnung der in direkter Nachbarschaft lokalisierten Ryanodinrezeptoren am Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Scriven et al., 2000), was wiederum zur größeren Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol durch das SR führt, auch Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung genannt (Fabiato, 1983). Wenn sich also ein L-Typ- Ca^{2+} -Kanal öffnet, kommt es zu einer lokalen Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ innerhalb von weniger als einer Millisekunde auf 10-20 μM , was die Ryanodinrezeptoren am SR aktiviert und zur weiteren Ca^{2+} -Freisetzung führt (Bers, 2008). Dieses vom SR entlassene Ca^{2+} führt lokal zu sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Zelle, und zwar zwischen der Zellmembran und dem SR (genannt dyadische oder junktionale Spalte). Durch Computermodelle errechnete man für diesen Ort für die ersten Millisekunden nach Freisetzung durch den Ryanodinrezeptor Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 10 μM bis hin zu 7mM. Durch Diffusion verteilt sich das Ca^{2+} in der Zelle, wobei an entfernteren Orten die maximale Ca^{2+} -Konzentration geringer ausfällt (etwa 1,5 μM im submembranösen Raum und etwa 0,5 μM im restlichen Zytosol) und dort auch die Ca^{2+} -Peak-Konzentrationen erst später zu finden sind (Maack & O'Rourke, 2007). Das ins Zytosol diffundierte Ca^{2+} bindet an das myofilamentäre Protein Troponin C (TnC), welches dann mit Troponin I (TnI) assoziiert. Daraufhin gibt TnI seine Aktin-Bindestelle für Tropomyosin frei. Dadurch kann Myosin an Aktin binden und ist Voraussetzung für das Filamentgleiten und damit die Kontraktion der Zelle (Bers, 2008).

Die Relaxation der Zelle wird ausgelöst durch fallende $[Ca^{2+}]_c$, wodurch Ca^{2+} von TnC abdissoziiert. Hierzu wird Ca^{2+} durch drei (direkt oder indirekt energieabhängige) Transportmechanismen aus dem Zytosol entfernt: durch die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), dem sarkolemmalen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) und der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase. Bei der Nutzung dieser Transporter gibt es speziesspezifische Unterschiede, bei Myozyten aus dem Ventrikel von Hasen wird 70% des Ca^{2+} von der SERCA und etwa 28 % via NCX aus dem Zytosol entfernt, bei der Ratte beträgt diese Relation in Ventrikelmyozyten 92% zu 7%. Dabei ähneln sich diese Relationen im Ventrikel von Ratte und Maus sowie beim Menschen und Hasen (Bers, 2002).

β -adrenerge Stimulation kann in die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase im Herzen beeinflussend eingreifen. Dabei spielen vor allem die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin eine große Rolle, die an α_1 -, β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (AR) binden. Durch β -adrenerge Stimulation kommt es zur verstärkten und beschleunigten Kontraktion (positiv inotroper Effekt), einer beschleunigten Relaxation (positiv lusitroper Effekt), sowie der Abnahme der diastolischen $[Ca^{2+}]_c$. Dabei aktiviert die Bindung an einen β -AR ein GTP-Bindeprotein (G_s), welches die Adenylatzyklase anregt cAMP herzustellen. Dieses cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), welche mehrere für die elektromechanische Kopplung wichtige Proteine (Phospholamban, L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, Ryanodinrezeptor, TnI und das Myosin-bindendes Protein C) phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) zum Beispiel, einem Inhibitor der SERCA, führt zur schnelleren Relaxation und Abnahme des $[Ca^{2+}]_c$ und einem größeren SR- Ca^{2+} -Gehalt dadurch, dass die SERCA besser mit dem NCX konkurriert (Bers, 2002). Der positiv lusitrope Effekt durch die PKA beruht auf der Phosphorylierung von Phospholamban und TnI (Li et al., 2000), was die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR und die Abdissoziation von Ca^{2+} von den Myofilamenten beschleunigt. Der positiv inotrope Effekt beruht auf einem erhöhten I_{ca} und einer größeren Verfügbarkeit von SR- Ca^{2+} , welche die Ca^{2+} -Transienten-Amplitude maßgeblich erhöhen. Das übertrifft auch den Effekt der verminderten myofilamentären Ca^{2+} -Sensitivität (ausgelöst durch die Phosphorylierung von TnI), welcher an sich die Kraft der Kontraktion verringert (Bers, 2002).

2.3 Die Physiologie der mitochondrialen Energetik und ihrer Anpassungsmechanismen

Im Herzen benötigt der Prozess der elektromechanischen Kopplung große Mengen an ATP, was über die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien bewerkstelligt wird. Bei Säugetieren deckt die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette etwa 92% des ATP-Bedarfs (Gunter & Sheu, 2009). Schon bei geringer Arbeitslast wird der gesamte ATP-Pool im Herzen innerhalb einer Minute zwei bis viermal erneuert (Jacobus, 1985). In der mitochondrialen Matrix werden die Hauptprodukte des Zitratzyklus, nämlich NADH und FADH₂, synthetisiert. Diese geben ihre Elektronen an die Atmungskette ab und rufen dadurch sequentielle Redoxreaktionen hervor, die die Translokation von Protonen über die innere mitochondriale Membran zur Folge haben. Dadurch wird das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und der pH Gradient (ΔpH) aufgebaut (Abbildung 1).

$\Delta\Psi_m$ und ΔpH sind die Treibkraft der F₁F₀-ATP Synthase der Atmungskette. Durch diese ATP-Synthase gelangen die zuvor an den anderen Komplexen der Atmungskette ausgeschleusten Protonen wieder, entlang ihrem elektrochemischen Gradienten, in die mitochondriale Matrix und sind der Antrieb zur Umwandlung von ADP zu ATP (Murphy & Steenbergen, 2006). Dabei wird der wechselnde Energiebedarf des Herzens stark von ADP und Ca²⁺ beeinflusst. Bei ATP-Verbrauch stimuliert ADP die ATP-Produktion an der F₁F₀-ATP Synthase, was ΔpH und $\Delta\Psi_m$ dissipiert. Um den Protonengradienten aufrecht zu erhalten wird die Abgabe von Elektronen von NADH und FADH₂ an die Atmungskette gefördert, was einen vermehrten Elektronenfluss, die Regeneration von ΔpH sowie die Oxidation von NADH und FADH₂ zur Folge hat. Eine Erhöhung der Arbeitslast wird unter physiologischen Bedingungen durch β -adrenerge Stimulation induziert und ist assoziiert mit einer erhöhten Amplitude und Frequenz zytosolischer Ca²⁺-Transienten (Bers, 2002). Das geht einher mit einer vermehrten Aufnahme und Akkumulation von Ca²⁺ in die Mitochondrien. Der Auswärtstransport von Ca²⁺ aus den Mitochondrien findet über den mitochondrialen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (mNCE) statt, was die Abhängigkeit der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration von [Na⁺]_i erklärt (Maack et al., 2006).

Ca²⁺ aktiviert wiederum in der mitochondrialen Matrix Schlüsselenzyme des Zitratzyklus (McCormack et al., 1990; Balaban, 2009; Denton, 2009), sowie die F₁F₀-ATP Synthase (Territo et al., 2000), und treibt so die Regeneration von reduziertem NADH aus NAD⁺ an,

um auch unter erhöhter Arbeitslast einen balancierten Redoxstatus von NADH/NAD^+ sowie $\text{FADH}_2/\text{FAD}^+$ und ein ausgeglichenes Verhältnis von ATP/ADP aufrecht zu erhalten.

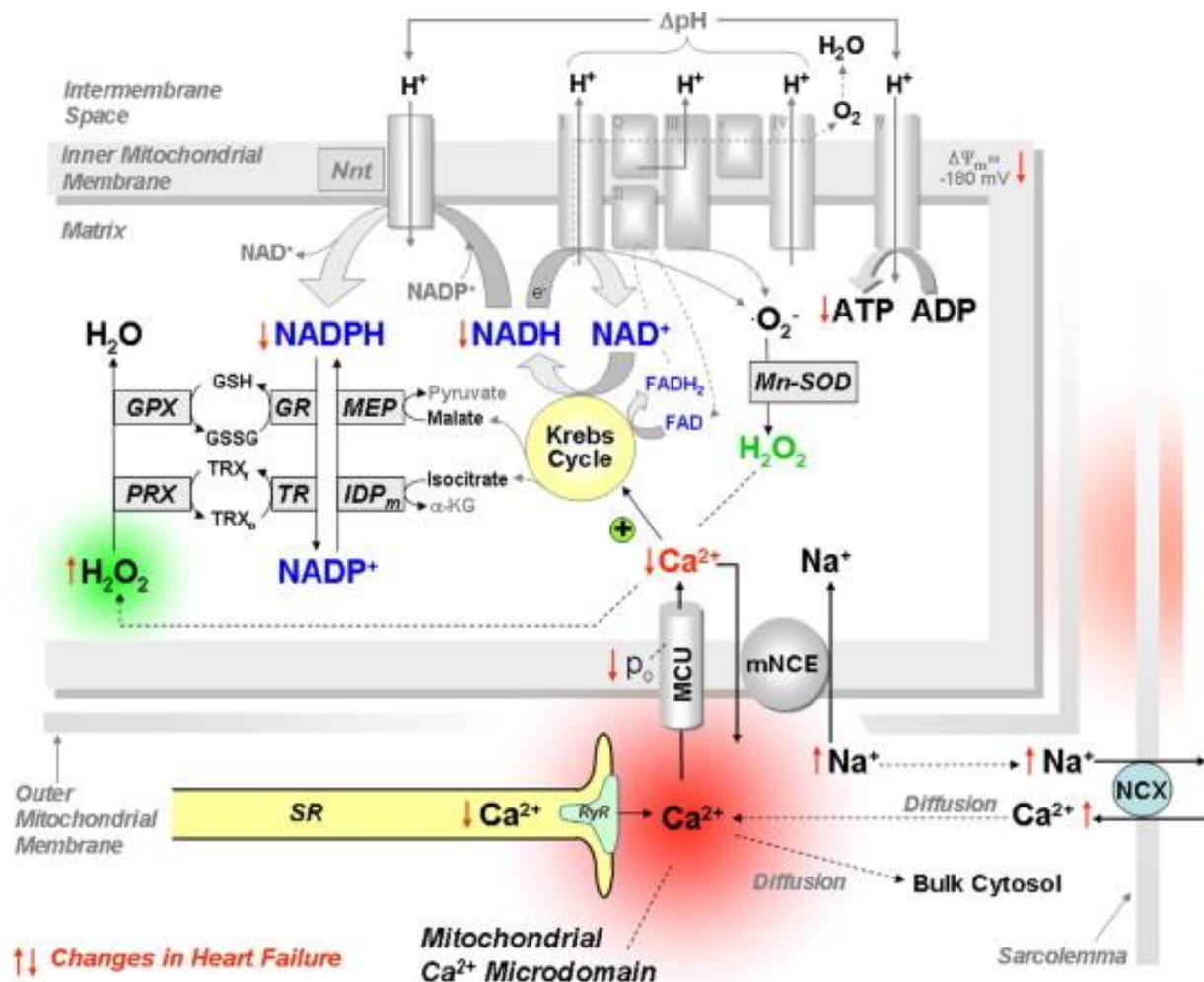


Abbildung 1: Zusammenspiel von elektromechanischer Kopplung, mitochondrialer Energetik und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kardialen Myozyten unter physiologischen und pathologischen Gesichtspunkten. Veränderungen bei Herzinsuffizienz sind rot eingezeichnet. Erläuterungen siehe Text. $\alpha\text{-KG}$, α -Ketoglutarat; GPX, Glutathionperoxidase; GR, Glutathionreduktase; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; H^+ , Proton; IDP_m , Isocitrat-Dehydrogenase im Mitochondrium; MEP, NADP^+ -abhängiges Malatenzym; MCU und mNCE, mitochondrialer Ca^{2+} Uniporter und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher; Mn-SOD, Mangansuperoxiddismutase; Nnt, Nicotinamid Nucleotid Transhydrogenase; PRX, Peroxiredoxin; TR, Thioredoxinreduktase; $\text{TRX}_{r/o}$ reduziertes/oxidiertes Thioredoxin (nach Kohlhaas & Maack, 2011).

Es gibt eine starke Evidenz dafür, dass die Ca^{2+} -Transienten in den Mitochondrien denen im Zytosol ähneln, jedoch leicht andere Kinetiken vorweisen. Dabei wird hauptsächlich durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) entlang einem elektrochemischen Konzentrationsgefälle Ca^{2+} in die Mitochondrien aufgenommen (Kirichok et al., 2004; De Stefani et al., 2011). Den Auswärtstransport von Ca^{2+} aus den Mitochondrien bewerkstelligt hauptsächlich der mitochondriale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (mNCE) (Palty et al., 2010).

Während β -adrenerger Stimulation ist der Abfall der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration langsamer als der im Zytosol, bedingt durch die langsamere Kinetik des mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers (mNCE) im Vergleich zum MCU (Maack et al., 2006). Dabei spiegelt die Akkumulation von Ca^{2+} den Zeitverlauf der NADH-Regeneration wider (Kohlhaas & Maack, 2011). Dieser Zusammenhang zeigt die immense Wichtigkeit der Balance zwischen dem Antrieb der ATP-Produktion an der Atmungskette durch ADP auf der einen-, und der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme für die Regeneration von NADH und FADH_2 auf der einen Seite zur Aufrechterhaltung eines konstanten Redoxstatus von $\text{NAD(P)H}/\text{NAD}^+$ und $\text{FADH}_2/\text{FAD}^+$, und somit einer Bereitstellung von Elektronen zur ATP-Produktion.

Darüber hinaus sind Mitochondrien die Hauptproduzenten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Myozyten, welche als Nebenprodukt der ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette anfallen. Reaktive Sauerstoffspezies sind sauerstoffbasierte chemische Agentien mit hoher Reaktivität. Das sind zum einen die freien Radikale wie das Superoxidradikal ($\cdot\text{O}_2^-$) und das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), als auch Nichtradikale, welche fähig sind, freie Radikale zu bilden, wie zum Beispiel das Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Balance zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und ihrer Entgiftung durch antioxidative Substanzen ergibt die Netto-Emission von ROS, die als oxidativer Stress bezeichnet wird, wenn die Produktion die Elimination deutlich übersteigt (Tsutsui et al., 2011). Dabei wird vornehmlich an Komplex I und III der Atmungskette die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der Zellen verursacht (Balaban et al., 2005; Brand, 2010). Zur Entgiftung dieser potentiell zellschädigenden Substanzen verfügen die Zellen über eine Anzahl verschiedener Enzyme, welche Redoxäquivalente bereitstellen. So wird Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) zum Beispiel durch die Mangansuperoxiddismutase (Mn-SOD) zu H_2O_2 dismutiert, welches durch Peroxiredoxin und die Thioredoxinreduktase weiter zu Wasser umgesetzt wird. Diese Enzyme beziehen ihre Redoxäquivalente allesamt von NADPH (Ying, 2008). Die Regeneration von NADPH aus NADP^+ hängt wiederum von Enzymen ab, die Substrate des Zitratzyklus benutzen, wie zum Beispiel die Isocitrat-Dehydrogenase (IDP_m) und das NADP^+ -abhängige Malatenzym (Abbildung 1). Auch wird reduziertes NADPH über die Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) hergestellt, welche NADH dafür oxidiert (Kohlhaas & Maack, 2011).

Da also die Regeneration von NADPH von Produkten des Zitratzyklus abhängig ist, wird deutlich, dass die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme nicht nur wichtig ist zur Anpassung an

Änderungen des Energiebedarfs, sondern auch zur Verhinderung von oxidativem Stress mittels Stimulation des Zitratzyklus und dadurch Regeneration von mitochondrialem NADPH.

2.4 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz und deren Auswirkungen auf den Redoxstatus und die mitochondriale Energetik

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es zur neuroendokrinen Aktivierung insbesondere des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotenin-Aldosteron-Systems. Diese Regulationsmechanismen sichern das Überleben in verschiedenen akuten Stress- und Gefahrensituationen durch Aufrechterhaltung des Blutdruckes wie zum Beispiel im akuten Schockzustand. Im chronischen Aktivierungszustand kommt es jedoch zu maladaptiven Umbauprozessen des linken Ventrikels, welche u. a. durch Defekte in der elektromechanischen Kopplung, veränderter Na^+ - und Ca^{2+} -Homöostase, einem energetischen Defizit sowie oxidativem Stress begleitet sind. Bei diesen maladaptiven Prozessen spielen die Mitochondrien als Energielieferant in Form von ATP, aber auch als Produzent von reaktiven Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle, wobei sie wiederum entscheidend von intrazellulärem Na^+ und Ca^{2+} reguliert werden (Rizzuto et al., 2000; Pieske & Houser, 2002, Kohlhaas & Maack, 2011).

Die beeinträchtigte systolische Funktion bei chronischer Herzinsuffizienz liegt hauptsächlich in der verminderten Amplitude des zytosolischen Kalziumtransienten begründet (Bers, 2006). Grund dafür ist die verminderte Aktivität und Expression der SERCA mit abnehmender Ca^{2+} -Beladung des SR und die erhöhte Expression und Aktivität des NCX (Studer et al., 1994; Hasenfuss et al. 1999; Hobai et al., 2000). Bei Herzinsuffizienz kommt es auch zu einer Hyperphosphorylierung der Ryanodinrezeptoren, mit erhöhter Ca^{2+} -induzierter Aktivierung (Marx et al., 2000) und womöglich einem diastolischen SR Ca^{2+} -Leck, was zu dem verminderten SR- Ca^{2+} -Gehalt beitragen könnte (Bers, 2002).

Bekannt ist des Weiteren, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ kommt (Despa et al., 2002). Dabei ist der Ca^{2+} -Haushalt der Myozyten eng assoziiert mit dem Na^+ -Haushalt, dadurch, dass der NCX den wichtigsten Transporter darstellt zur transsarkolemmalen Elimination des systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Blaustein & Lederer, 1999). Veränderungen im Na^+ -Haushalt der Myozyten bei Herzinsuffizienz bringen somit auch

Veränderungen des $[Ca^{2+}]_c$ mit sich, zumal die Aktivität des NCX kritisch von $[Na^+]_i$ reguliert wird. Selbst kleine Veränderungen des $[Na^+]_i$ (im mM Bereich) führen dazu, dass der NCX weniger Ca^{2+} aus der Myozyte über die Zellmembran ausschleust, was wiederum die Ca^{2+} Konzentration im Zytosol und SR erhöht (Despa & Bers, 2013).

Angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten entfernt der NCX also unter physiologischen Bedingungen während der Diastole in seinem „forward mode“ die Menge Ca^{2+} über die Zellmembran aus der Zelle (im Austausch mit Na^+ , 1 Ca^{2+} / 3 Na^+), welche zuvor über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal im Rahmen der Zellkontraktion in die Zelle gelangt ist, wobei das Ausmaß der Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol speziesspezifische Unterschiede aufweist (Bassani et al., 1994; Maier et al., 2000). Der NCX kann auch, abhängig vom elektrochemischen Gradienten und einer erhöhten $[Na^+]_i$, in einem „reverse mode“ arbeiten und Ca^{2+} während des Aktionspotentials in die Zelle hinein transportieren (Barry, 2000). Dazu kommt es physiologischerweise während der frühen Depolarisationsphase des Aktionspotentials, wenn das Membranpotential positive Werte annimmt, und insbesondere bei Herzinsuffizienz, wenn der Ca^{2+} -Transient vermindert, die $[Na^+]_i$ erhöht und das Aktionspotential verlängert ist. Dieser einwärts gerichtete Ca^{2+} -Einstrom während des Aktionspotentials trägt dazu bei, die verminderte SR- Ca^{2+} -Beladung bei Herzinsuffizienz, verursacht durch die verminderte SERCA Aktivität, auszugleichen. Auf der anderen Seite trägt die erhöhte $[Na^+]_i$ dazu bei, dass die Elimination von Ca^{2+} über den NCX nach extrazellulär behindert wird, was im Zusammenspiel mit der verringerten SERCA Aktivität eine höhere diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bedingt, die eine erhöhte diastolische Spannung verursacht (Armoundas et al., 2003; Bers, 2006; O'Rourke et al., 1999). Dabei ist eine erhöhte diastolische Spannung genauso Energie konsumierend wie eine systolische Kontraktion, was bedeutet, dass schon allein durch die diastolische Vorspannung eine energetisch ungünstige Situation im insuffizienten Myokard geschaffen wird (Meyer et al., 1998).

Somit haben bei einer Herzinsuffizienz auf der einen Seiten die verminderten systolischen Ca^{2+} -Transienten und auf der anderen Seite die nicht mehr gegebene räumliche Nähe zwischen der maximalen systolischen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und den Mitochondrien eine verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme zur Folge. Dies ist am ehesten dadurch bedingt, dass die effektivste mitochondriale Ca^{2+} - Aufnahme eben dann gegeben ist, wenn der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR über Ryanodin-Rezeptoren triggert, während ein NCX-mediiertes Ca^{2+} -Einstrom keine hinreichend hohen

Ca^{2+} Konzentrationen in der Umgebung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters schafft, die ausreichen, um dessen relativ geringe Affinität für Ca^{2+} zu überkommen (Sipido et al., 1997; Kohlhaas & Maack, 2010). Wo vermindert Ca^{2+} als Stimulator der Schlüsselenzyme der Atmungskette in die Mitochondrien aufgenommen werden kann, bzw. Ca^{2+} vermehrt die Mitochondrien bei erhöhtem $[\text{Na}^+]_i$ verlässt (Liu & O'Rourke, 2008), können auch nicht genügend Redoxäquivalente in Form von NADH und FADH_2 bei vermehrter Arbeitslast akquiriert werden. Also trägt nicht nur das verminderte systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu einem reduzierten Ca^{2+} in den Mitochondrien bei, sondern auch die vermehrte Ausschleusung desselben. Der mNCE hat eine halbmaximale Aktivität bei einem $[\text{Na}^+]_i$ von 5-10mM, also sehr nahe der physiologischen $[\text{Na}^+]_i$, was den vermehrten Auswärtstransport von Ca^{2+} aus den Mitochondrien bei erhöhtem $[\text{Na}^+]_i$ erklärt (Despa & Bers, 2013).

ROS sind auch maßgeblich an der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beteiligt, bei erhöhtem $[\text{Na}^+]_i$ kommt es zu einer erhöhten Produktion von H_2O_2 (Kohlhaas et al., 2010). Auch zeigte sich, dass bei einem verminderten Ca^{2+} -Gehalt der Mitochondrien, ausgelöst mittels Inhibition der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, die H_2O_2 -Produktion erhöht ist (Kohlhaas et al., 2010).

Die erhöhte mitochondriale ROS-Produktion hat negative Effekte auf die elektromechanische Kopplung, zumal viele zytosolische und mitochondriale Proteine und auch Lipide eine Redoxsensitivität aufweisen und führt an sich in einem circulus vitiosus zu einer erhöhten ROS-Produktion. Dabei wird die Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase durch H_2O_2 (Kukreja et al., 1990) oder aber auch durch Lipidperoxidation (Mishra et al., 1989) vermindert. Als redoxsensibel sind auch der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (Gill et al., 1995), der NCX (Kuster et al., 2010), der kardiale Ryanoidin-Rezeptor (Xu et al., 1998; Aracena-Parks et al., 2006), die SERCA (Xu et al., 1997; Kuster et al., 2010), sowie Kalium (K^+)- und Na^+ -Kanäle (Goldhaber & Liu, 1994; Burgoyne et al., 2012) beschrieben. Dabei führt wahrscheinlich auch die durch ROS ausgelöste Modifikation des Ryanidinrezeptors zu einem erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Leck des SR mit einem erniedrigten SR- Ca^{2+} -Gehalt und Ca^{2+} -Transienten, was die reduzierte Kontraktionskraft bei Herzinsuffizienz mit erklären könnte (Santos et al., 2011).

Einen Beitrag zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz könnte auch die Oxidation von myofilamentären Proteinen durch ROS sein. So erhöht oxidativer Stress durch Disulfidbrückenbildung des Titins die Titin-abhängige Steifigkeit der Kardiomyozyten und

kann so zu der erhöhten myokardialen Steifigkeit beitragen, wie man sie oft bei Herzinsuffizienz beobachtet (Grutzner et al., 2009).

Auch sind mehrere Enzyme des Zitratzyklus empfänglich für ROS. Zum Beispiel wird das Zitratzyklusenzym Aconitase durch H_2O_2 und $\cdot\text{O}_2^-$ inaktiviert, und bei längerem Kontakt zu H_2O_2 und $\cdot\text{O}_2^-$ zerstört und schließlich abgebaut (Bulteau et al., 2003). Auch kann die mitochondriale DNA durch Oxidation durch ROS beschädigt werden. Zum einen hat sie keine Chromatinstruktur und zum anderen kann auch ein Großteil der ROS, welche in den Mitochondrien entstehen, sie nicht verlassen, was bei einer Beschädigung der mitochondrialen DNA eine verringerte Proteinsynthese und eingeschränkte mitochondriale Funktion zur Folge hat (Tsutsui et al., 2011).

Darüber hinaus stimulieren ROS das myozytäre Wachstum und sind am Remodeling der myozytären Matrix beteiligt. Sie aktivieren direkt einige an myokardialer Hypertrophie beteiligte Signalkaskaden, wie zum Beispiel den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Flohe et al., 1997), die MAP-Kinasen, die Tyrosinkinase Src, das GTP-Bindeprotein Ras, die Proteinkinase C, die mitogen-activated Proteinkinasen (MAPK) und die Jun-nukleäre Kinase src, PKC, p38, ERK1/2 und JNK MAP Kinasen (Sabri et al., 2003).

Erwähnenswert bleibt, dass klinische Beobachtungen bestätigen, dass ROS zur Herzinsuffizienz beitragen, jedoch ist dies noch nicht bei allen Formen der Herzinsuffizienz nachgewiesen. Dabei ist die Aktivität von ROS im lebenden Modell schwer zu messen, klinische Studien müssen sich auf indirekte Messungen verlassen und viele in diese Studien eingeschlossene Patienten weisen Komorbiditäten auf (Giordano, 2005). Auch gibt es bisher in keiner größeren Studie einen nachgewiesenen Nutzen von antioxidativen Vitaminen oder ihren Vorstufen im Hinblick auf Senkung der Morbidität und Mortalität bei Herzinsuffizienz (Hennekens et al., 1996; Yusuf et al., 2000). Dabei gilt zu bedenken, dass zelluläre Signaltransduktionswege auch physiologischerweise durch den Redoxstatus reguliert werden. Das heißt, dass kleine Mengen an ROS eine Signaltransmitterfunktion wahrnehmen und zum Zellüberleben beitragen können, wohingegen beim Zusammenbruch dieser Redoxhomöostase durch eine starke Erhöhung an ROS der Zelltod induziert werden kann (Kamata & Hirata, 1999).

2.5 Die Rolle von STAT3 und sein Beitrag zur Herzinsuffizienz

2.5.1 Die Rolle von STAT3 als Transkriptionsfaktor

Interzelluläre Signalwege sind wichtig für die Wachstums- und Entwicklungsregulation sowie Homöostase in vielzelligen Organismen. Signaltransduktionswege, die über STAT-Proteine führen, konnten von Schleimpilzen über Würmern und Fliegen bis hin zum Menschen gefunden werden, was für eine evolutionäre Konservierung und frühen Anpassungsmechanismus spricht um die interzelluläre Kommunikation zu erleichtern (Aaronson et al., 2002). Aufmerksam auf die STAT-Protein-Familie wurde man bei Studien über die Signaltransduktion via IFN-Rezeptoren (Darnell et al., 1994). STAT3, also signal transducer and activator of transcription 3, gehört zu den Proteinen der STAT-Familie, welche sich latent im Zytoplasma befinden und Teil des Januskinasen(JAK)-STAT-Signaltransduktionswegs sind (Darnell, 1997). Der Name STAT rührt also von ihrer dualen Funktion zum einen im Hinblick auf die Signaltransduktion im Zytoplasma und zum anderen der Aktivierung der Transkription im Zellkern (Schindler et al., 1995).

Es ist bekannt, dass der JAK-STAT-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen spielt. So kommt es bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Herabregulation des JAK-STAT-Signaltransduktionswegs (Podewski et al., 2003) und auch zu oxidativem Stress (Nakamura et al., 2002). Als Transkriptionsfaktor ist STAT3 an der Regulation von zahlreichen Genen beteiligt welche das Zellüberleben beeinflussen. Dabei spielt STAT3 insbesondere eine Rolle bei der Protektion des Herzens vor oxidativem Stress (Negoro et al., 2001), der myokardialen Angiogenese und Neovaskularisation sowie der kardialen Hypertrophie (Hilfiker-Kleiner et al., 2004; Hilfiker-Kleiner et al., 2005a; Hilfiker-Kleiner et al., 2005b; Beckles et al., 2006). Für seinen Einfluss auf den Energiehaushalt, die Regeneration von Zellen und der Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung (Boengler et al., 2008) und Ischämie/Reperfusion induzierter kardialer Dysfunktion (Booz et al., 2002) ist STAT3 ebenso bekannt. Selbst bei der Embryogenese kommt STAT3 eine immense Bedeutung zu, STAT3-Knockout Mäuse sterben während der frühen Embryogenese, noch vor der Gastrulation (Duncan et al., 1997; Takeda et al., 1997). Weiterhin führt die kardiale STAT3-Defizienz zur Ausbildung einer alters- und schwangerschaftsassozierten Kardiomyopathie. Dementsprechend fand man in linksventrikulären Gewebeproben von Patientinnen mit peripartaler Kardiomyopathie niedrigere Proteinkonzentrationen von STAT3 (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Dass STAT3 auch eine wichtige Rolle für das Überleben von Kardiomyozyten *in vivo* spielt, zeigte sich an linksventrikulärem Myokard von Patienten mit

einer dilatativen Kardiomyopathie, bei denen STAT3 signifikant herabreguliert war (Podewski et al., 2003).

Konkret werden die STAT-Proteine als Gruppe von Proteinen definiert, die ähnliche Aminosäuresequenzblöcke, verteilt über die Spanne ihrer ersten 700 Aminosäuren, aufweisen. Interessanterweise sind dabei die Mitglieder der STAT-Familie die einzigen bekannten Transkriptionsfaktoren, die via Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden (Reich et al., 2006). Alle bekannten STAT-Proteine haben einen einzelnen Tyrosinrest in der Region um den Rest 700, der während der zytoplasmatischen Aktivierung phosphoryliert wird (Schindler et al., 1995), im Falle von STAT3 geschieht das am Tyrosinrest 705 (Boengler et al., 2008). Die meisten STATs, darunter STAT3, haben darüber hinaus eine zweite Phosphorylierungsstelle innerhalb des C-Terminus, bei STAT3 ist das Serin 727 (Boengler et al., 2008), wobei die biochemischen und biologischen Konsequenzen dieser Serinphosphorylierung noch diskutiert werden. Man vermutet, dass diese Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen ausgelöst wird, z.B. ERK1, ERK2, p38, Jun Kinase (JNK) oder einer H-7-sensitiven Kinase (Levy & Lee, 2002). Einige Studien beobachteten eine erhöhte Transkriptionsaktivität nach Serinphosphorylierung (Decker et al., 2000; Hazan-Halevy et al., 2010; Sato et al., 2005; Wen et al., 1995). Auch soll speziell diese Phosphorylierungsstelle wichtig sein für die Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung durch STAT3 in den Mitochondrien, unabhängig von der Bindung des an dem Tyrosinrest phosphorylierten STAT3 im Nukleus (Reich, 2009).

Alternatives Splicen des 3' Endes des Transkriptes fand man bei STAT1, 3, 4, 5A und 5B und führt zu einer β -Isoform, der die C-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt. STAT3 β enthält somit die Phosphorylierungsstelle Tyrosin 705, jedoch fehlt die Phosphorylierungsstelle Serin 727 (Schaefer et al., 1995). Beide STAT3 Isoformen, also STAT3 α und STAT3 β , werden von ähnlichen Signalproteinen aktiviert, jedoch ist STAT3 β stabiler und bindet die DNA fester als STAT3 α . Dem gegenüber weist STAT3 α eine höhere transkriptionelle Aktivität auf (Schaefer et al., 1997).

Die sieben bei Säugetieren vorkommenden Proteinvarianten von STAT, nämlich STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6 teilen sich sieben strukturell gleiche Regionen (Abbildung 2): Eine aminoterminal Domäne (NH₂) fördert die Formation von Homodimeren bei unphosphorylierten STAT-Proteinen; eine gewundene Ringstruktur aus einem potentiell dynamischen 4-Helix-Bündel, welche seitlich aus dem Kern herausragt und mit

regulatorischen Proteinen in Verbindung tritt, kontrolliert wahrscheinlich den Kernimport und -export. Durch die DNA Bindedomäne (DBD) wird eine starke Bindung von aktiviertem STAT an GAS-Palindromsequenzen verursacht, wobei alle aktivierten STAT-Proteine, außer STAT2, direkt am GAS-Element binden. Dem DBD wird auch eine regulatorische Rolle beim Kernimport und -export zugesprochen. Die Linkerdomäne, welche zur DNA-Bindung und Aktivierung der Transkription beiträgt. Via SH₂-Domäne binden die STAT-Proteine an die Rezeptorketten und werden dann phosphoryliert, also aktiviert.

Das tyrosinaktivierende Motiv besteht aus einem Tyrosin zusammen mit fünf bis sieben speziellen carboxyterminalen Aminosäuren in der Region um den 700. Rest und erleichtert die JAK-abhängige Phosphorylierung. Die transkriptionsaktivierende Domäne am Carboxyterminus erleichtert die Rekrutierung von Cofaktoren und stabilisiert wahrscheinlich auch die Proteinstruktur (Schindler et al., 2008).

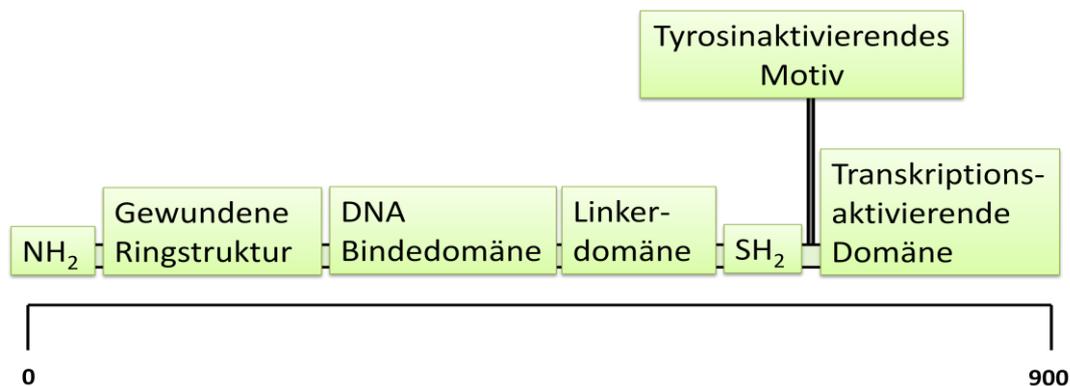


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von STAT-Proteinen. Die sechs STAT-Proteine teilen sich sieben funktionell konservierte Domänen (modifiziert nach Schindler et. al, 2008).

Alle sieben Mitglieder der STAT-Familie werden im Herzen und bei kultivierten kardialen Myozyten (aus neonatalen Ventrikelmyozyten) exprimiert (Booz et al., 2002). Vor ihrer Aktivierung formen die unphosphorylierten STAT-Proteine stabile Dimere im Zytoplasma, welche sich strukturell von den am Tyrosinrest phosphorylierten STAT-Dimeren unterscheiden, die nach der Aktivierung gebildet werden (Mertens et al., 2007). Der JAK-STAT-Signalweg ins Zellinnere wird durch extrazelluläre Signalproteine, hauptsächlich Zytokine und Wachstumsfaktoren, aber auch von einigen Peptiden aktiviert (Levy et al., 2002). Diese Signalmoleküle gehören zu einer 4-Helix-Bündel Zytokinfamilie; STAT3 wird hauptsächlich über die Interferon- und gp130-Familie aktiviert (Schindler et al., 2008). Im Zellkern führt aktiviertes STAT3 zu einer veränderten Genexpression. Dabei wird die Signalkaskade durch Bindung des Liganden an der extrazellulären Domäne des

Zytokinrezeptors initiiert. Die intrazellulären Domänen von vielen Zytokinrezeptoren sind physikalisch assoziiert mit Tyrosinkinassen der JAK-Familie. Es gibt vier JAKs in Säugetierzellen, nämlich JAK 1, 2, 3 und Tyk2. Bis auf die Januskinase 3, die nur in Leukozyten vorkommt, werden die Mitglieder der JAK-Familie in den meisten Geweben exprimiert. Die Bindung eines Liganden am Rezeptor führt zur Rezeptordimerisierung bzw. Oligomerisierung und bringt die rezeptorassoziierten JAK-Kinasen in Apposition (Abbildung 3). Das hat zur Folge, dass sich die JAK-Kinasen gegenseitig transphosphorylieren. Die so aktivierten Kinasen phosphorylieren daraufhin ein distales Tyrosin am Rezeptor. Dieser Phosphotyrosylrest am Rezeptor wird von den STAT-Proteinen mittels ihrer SH₂ (Src Homology 2)-Domäne erkannt, woraufhin sich die STAT-Proteine am Rezeptorkomplex einlagern. Dort findet dann auch eine Tyrosinphosphorylierung der STAT-Proteine statt.

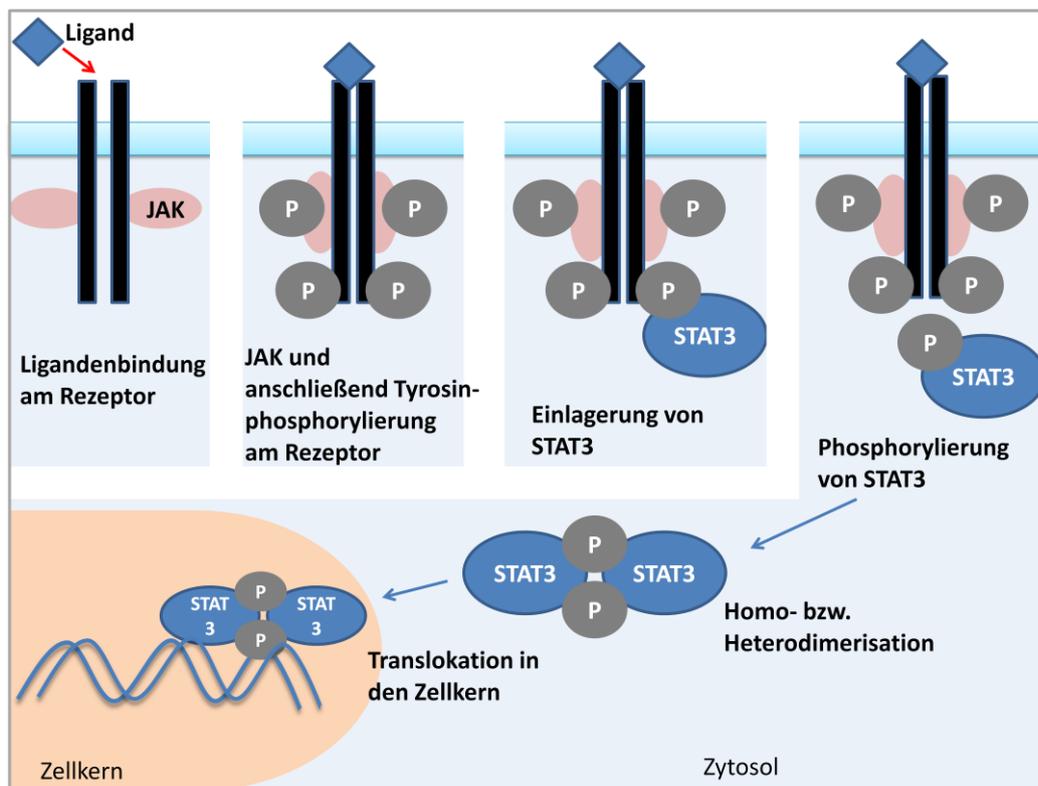


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion via JAK-STAT. Sequentielle Tyrosinphosphorylierung verursacht durch Ligandenbindung am Rezeptor. Die anschließende Rezeptordimerisierung führt zur Transphosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen. Dies ist gefolgt von der Phosphorylierung des Rezeptorendes und der Rekrutierung der STAT-Proteine über ihre Src-homologe-Bindungsdomäne. Anschließend wird STAT am Tyrosinrest phosphoryliert und dimerisiert, bevor es zu einer Translokation in den Zellkern kommt (modifiziert nach Levy et al., 2002).

Die nun aktivierten STAT-Proteine sind in der Lage zu hetero- oder homodimerisieren, in den Zellkern zu translozieren und dort an die DNA zu binden (Mertens et al., 2007; Schindler et al., 1995, Schindler et al. 2008). Die Phosphorylierung am Tyrosinrest von STAT-Proteinen

kann auch durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen stattfinden, wie zum Beispiel dem Epidermalen Wachstumsfaktor oder dem Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptor. Diese Aktivierung kann direkt oder indirekt erfolgen. Alternativ können auch STATs nach Zytokinbindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mithilfe einer JAK am Tyrosinrest phosphoryliert werden. Die vierte Möglichkeit der Aktivierung von STAT-Proteinen ergibt sich über die Phosphorylierung durch verschiedene Nicht-Rezeptor-gebundene-onkogene Tyrosinkinasen. Diese sind oft viralen Ursprungs, entstehen durch Translokationen und sind vor allem bei STAT5 und STAT3 mit der Bildung von Neoplasien assoziiert (Reich et al., 2006). Die aktivierten STAT-Proteine gelangen mit oder ohne Transportprotein durch den nukleären Porenkomplex in den Zellkern, STAT3 benutzt hierfür das Transportprotein Importin- α 3. Dabei zeigte sich, dass das Transportprotein nicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT3 unterscheidet und somit auch unphosphoryliertes STAT3 in den Zellkern gelangt (Mertens et al., 2007). Dadurch, dass unphosphoryliertes STAT3 nicht an der charakterisierten STAT-DNA-Zielstelle bindet, bindet es wahrscheinlich andere DNA-Abschnitte mithilfe anderer Transkriptionsfaktoren, wobei z.B. ein Zusammenspiel vom Komplex von unphosphoryliertem STAT3 und c-Jun beobachtet wurde, welches die Gentranskription verändert (Zhang et al., 1999; Liu et al., 2005).

2.5.2 Die Entwicklung und der Phänotyp von STAT3-Knockout Mäusen

Mäuse mit einem kardiomyozyten-spezifischen Knockout von STAT3 konnten durch die Verpaarung von STAT3-gefloxten Mäusen mit α -Myosin heavy chain (α MHC)-Promoter/Cre Rekombinase Mäusen gezüchtet werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Dabei katalysiert Cre unabhängig von Cofaktoren die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (locus of X-over P1) (Lukowski et al., 2005), wodurch das STAT3-Gen in den Myozyten entfernt wird. Im Alter von drei Monaten ist dabei eine nahezu komplette Deletion von STAT3 in den Kardiomyozyten nachweisbar (Hilfiker-Kleiner et al., 2004).

Bei diesen STAT3-defizienten Tieren zeigt sich im Herzen eine verminderte linksventrikuläre Kapillarisation und vermehrt interstitielles Kollagen. Die gemessene Laktatkonzentration war in STAT3-KO Myozyten erhöht bei tendenziell verminderter Ratio von ATP/ADP nach Dobutamininfusion (Hilfiker-Kleiner et al., 2004) und es zeigt sich ein verminderter ATP-Gehalt in postpartalen STAT3-KO Mäusen (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Daneben zeigen

Mäuse mit einem kardiomyozyten-spezifischen Knockout von STAT3 ab dem neunten Lebensmonat eine erhöhte Mortalität (Hilfiker-Kleiner et al., 2004).

Bei weiblichen Mäusen mit einem kardiomyozyten-spezifischen Knockout von STAT3 kommt es nach der Schwangerschaft zur peripartalen Kardiomyopathie (PPCM). Die PPCM ist eine Erkrankung unklarer Ätiologie, welche auch beim Menschen vorkommt, wobei man bei Patientinnen mit PPCM erniedrigte STAT3 Proteinkonzentrationen, erhöhtes 16kDa Prolaktin und Indikatoren für vermehrten oxidativen Stress (oxidiertes low density lipoprotein) erhöht vorfand (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Bei den STAT3-KO Tieren tritt die PPCM nach der Schwangerschaft auf und führt bei etwa zwei Drittel der betroffenen Tiere nach der zweiten Schwangerschaft zum Tode. Dabei zeigen die meisten Tiere nach der zweiten Gravidität klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz sowie eine dilatative Kardiomyopathie mit echokardiographisch reduzierter fraktioneller Verkürzung (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Bei der PPCM kommt es in STAT3-KO Mäusen als auch bei den Patientinnen mit vermindertem STAT3 zu einer vermehrten Freisetzung des lysosomalen Proteins Cathepsin D, welches dann das physiologisch in der Schwangerschaft vorkommende 23kDa Prolaktin in ein 16kDalton Spaltprodukt umsetzt. Dieses Spaltprodukt fördert maladaptive Umbauprozesse des Herzens, unter anderem kommt es zur Apoptose und einer beeinträchtigten Mikrozirkulation im Herzen im Vergleich zum WT (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Man nimmt an, dass die Ursache der Freisetzung von Cathepsin D aus den Lysosomen in einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen in STAT3-KO liegt, oder auch in der Herabregulation der antioxidativ wirkenden Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) bei STAT-3 defizienten Mäusen (Hilfiker-Kleiner et al., 2007) und somit einem erhöhten Vorliegen von reaktiven Sauerstoffradikalen, oder eben sowohl einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen und einer Herabregulation antioxidativ wirkender Enzyme. Die genauen Mechanismen einer vermehrten myozytären ROS Produktion, insbesondere in intakten Myozyten, sind jedoch noch unzureichend geklärt.

Da die Aktivierung neurohumoraler Stimuli bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle spielt, wurde von Hilfiker-Kleiner et al. auch der Einfluss dieser Faktoren bei STAT3-KO untersucht. Dabei zeigte sich, dass es nur nach kontinuierlicher Isoprenalinapplikation im Mausmodell über zwei Wochen, nicht aber durch Angiotensin II- oder Phenylephrinapplikation oder Aortenligatur im gleichen Zeitraum es zu einer kardialen Hypertrophie sowie Fibrose bei den Tieren kam mit Entwicklung einer dilatativen

Kardiomyopathie. Nach 14 Tagen Isoprenalininfusion starben 60% der STAT3-KO Mäuse, von den Wildtyp Mäusen überlebten alle diese Behandlung mit lediglich Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner, Medizinische Hochschule Hannover). Wieso es durch Isoprenalin, welches β -Rezeptoren stimuliert, nicht aber durch Phenylephrin (bindet an α 1-Adrenozeptoren) oder Angiotensin II (bindet am Angiotensinrezeptor) zur Hypertrophie in STAT3-KO kommt ist unbekannt. Alle drei Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Auch kommt es bei Tieren mit einer kardiomyozyten-spezifischen Überexpression der α -Untereinheit von Gq zu einer PPCM (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Der pathophysiologische Mechanismus für diese Beobachtungen ist nach wie vor unklar.

2.5.3 Die Rolle von STAT3 in Mitochondrien

Vor kurzem wurde beobachtet, dass STAT3 auch in Mitochondrien lokalisiert ist, wo es die Komplex I- und Komplex II-abhängige Atmungsaktivität beeinflussen soll. Dabei wurde gezeigt, dass STAT3 in einer Konzentration in Mitochondrien vorkommt, welche ein Zehntel der zytosolischen STAT3-Konzentration beträgt. In jener Studie zeigte sich, dass in isolierten kardialen Mitochondrien von STAT3-knockout Mäusen die ADP-induzierte Atmung um 50% und mehr reduziert war (Wegrzyn et al., 2009), was eine enorme Einschränkung der ATP-Produktion darstellen würde. Eine andere Studie zeigte ebenfalls die mitochondriale Lokalisation von STAT3. Auch hier war die ADP- induzierte Atmung bei der Untersuchung subsarkolemmaler Mitochondrien leicht beeinträchtigt, jedoch nur bei der Verwendung von Komplex I Substraten und nicht bei der Verwendung von Komplex II Substraten (Boengler et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde in einem proteomischen Ansatz aus aufgereinigten Herzmitochondrien das Verhältnis von Komplex I und II der Atmungskette zu STAT3 mit 1:100.000 berechnet (Phillips et al., 2010). Das macht jedoch einen direkten regulatorischen Einfluss durch eine Protein-Protein Interaktion aufgrund der unverhältnismäßigen Stöchiometrie zwischen den Komplexen I/II und STAT3 unwahrscheinlich.

2.5.4 Die Rolle von STAT3 bei Ischämie/Reperfusion

Wie der Ausspruch „Zeit ist Muskel“ andeutet, zielt die Versorgung von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt auf eine schnelle Reperfusion des okkludierten Gefäßes. Je kürzer die Zeit bis zur Intervention, desto niedriger die Morbidität und Mortalität eines

Myokardinfarktes, wobei der Erfolg der schnellen Reperfusion stark vom Grad und der Dauer der Ischämie abhängt (Reimer & Jennings, 1979; Braunwald & Kloner, 1985; Becker & Ambrosio, 1987). Ganz im Gegensatz zu der eigentlichen Intention, mit der Reperfusion Gewebe zu retten, kommt es aber durch den wieder einsetzenden Blutfluss im ischämischen Gewebe auch zu einer Schädigung des Myokards. Dieser sog. Ischämie/Reperfusionsschaden mindert den positiven Effekt der Rekanalisierung, wobei eine Reperfusion nach kurzer Ischämiedauer nicht zum Ischämie/Reperfusionsschaden führt. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass es durch den Koronarverschluss zur Nekrose des Gewebes kommt, wohingegen Apoptose zur gleichen Zeit induziert, aber erst bei Reperfusion ausgeführt wird. Dementsprechend ist der endgültige Myokardschaden ein Resultat von Nekrose und Apoptose (Ibanez et al., 2010).

Dass vorangehende Traumata jedoch zu einer Adaptation an weitere gleichartige Traumata führen können beobachtete bereits Noble 1942 bei seinen Tierversuchen mit Ratten (Noble, 1942). Murry et al. benutzten den Begriff der Präkonditionierung zum ersten Mal in Bezug auf das Herz als Adaptationsmechanismus auf eine Ischämie (Murry et al., 1986). Ischämische Präkonditionierung bedeutet in diesem Sinne also mehrere kurze ischämische Phasen, gefolgt von einer längeren, zur Infarzierung führenden Phase. Wird diese Form der Konditionierung vor einer längeren ischämischen Phase durchgeführt ist sie also in der Lage, den nach Ischämie eintretenden Schaden zu mindern und durch die Reperfusion eine größere Rettung von Myokardgewebe herbeizuführen. Sinngemäß bezeichnet ischämische Postkonditionierung mehrere kurze ischämische Phasen nach einer längeren ischämischen Phase.

Yellon et al. zeigten zum ersten Mal die Anwendbarkeit von diesem protektiven Mechanismus auf das menschliche Herz, als sie das Prinzip der ischämischen Präkonditionierung bei der Bypasschirurgie anwandten und, als Zeichen der Energiedepletion in der nicht präkonditionierten Gruppe, signifikant höhere myozytäre ATP-Spiegel in der Gruppe mit ischämischer Präkonditionierung nachweisen konnten (Yellon et al., 1993).

Kleinere Studien zeigten bei Patienten mit Myokardinfarkt, welche einer PCI zugeführt wurden, positive Auswirkung (bis hin zur Infarktgrößenreduktion von 36%) durch ischämische Postkonditionierung (Laskey, 2005; Staat et al., 2005; Yang et al., 2007; Thibault et al., 2008). Daneben gibt es Indizien für den infarktgrößenreduzierenden Effekt bei Patienten mit ischämischer Präkonditionierung durch Angina pectoris Beschwerden vor einem Myokardinfarkt (Kloner et al., 1995; Nakagawa et al., 1995; Ottani et al., 1995).

Während einer Ischämie kommt es zur zellulären Ca^{2+} -Überladung, kurz nach Ischämiebeginn kommt es zur intrazellulären ATP-Verarmung, die $[\text{Na}^+]_i$ steigt, die entstehende Laktatazidose führt zum Austausch von extrazellulärem Na^+ und intrazellulärem Wasserstoff. Erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ stimulieren den Ca^{2+} -Einstrom via NCX, zusammen mit einer Reduktion der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR und einem Ca^{2+} -Efflux durch die sarkolemmale Ca^{2+} -Pumpe. Durch die zytosolische Ca^{2+} -Überladung kommt es wahrscheinlich auch zur mitochondrialen Ca^{2+} -Akkumulation. Dabei können in den kardialen Mitochondrien große Mengen Ca^{2+} gespeichert werden, ohne dass sich der mitochondriale PTP (mPTP) öffnet. Es wird also anscheinend nicht durch Ischämie per se der mPTP geöffnet, sie schafft jedoch die geeigneten Bedingungen dafür, wenn die Mitochondrien bei Reperfusion wieder repolarisieren und die Atmungskette die Bildung von ROS ankurbelt. Hohe intrazelluläre und mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen gepaart mit einer Überproduktion von ROS stellen dann die optimalen Bedingungen für die Öffnung des mPTP dar (Rasola & Bernardi, 2011).

Dadurch, dass sich durch Hypoxie und myokardiale Ischämie die Konzentrationen von IL-6 und gp130 erhöhen (Yamauchi-Takahara et al., 1995; Chandrasekar et al., 1999) fand man heraus, dass der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg, insbesondere via STAT3, bei Ischämie/Reperfusion eine protektive Rolle spielt, sowie bei der Reduktion des Myokardschadens durch ischämische Prä- und Postkonditionierung beteiligt ist (Barry et al., 2009; Boengler et al., 2008), und ihm bei der ischämischen Präkonditionierung eine essentielle Rolle zukommt (Xuan et al., 2001; Smith et al., 2004). Die Deletion von STAT3 hebt die Infarktgrößenreduktion durch ischämische Präkonditionierung in Mäuseherzen auf (Smith et al., 2004), wobei es nach dem Protokoll einer einstündigen Ischämie mit nachfolgend 24 Stunden Reperfusion zu größeren Infarkten in STAT3-KO als in WT-Mäuseherzen kam (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Dies zeigte sich in einer anderen Studie mit 30 Minuten Ischämie- und zwei Stunden Reperusionsphase noch nicht (Boengler et al., 2008), was die Schlussfolgerung zulässt, dass STAT3 wahrscheinlich bei länger dauernder Ischämie eine Rolle zukommt. Die Überexpression von STAT3 führte in Versuchstieren nach Ischämie zur Infarktgrößenreduktion (Oshima et al., 2005). Ähnlich günstige Effekte hatte eine pharmakologische Aktivierung von STAT3 durch ischämische Postkonditionierung im Schweinmodell (Heusch et al., 2011). Weiterhin vermindert der STAT3-KO den infarktgrößenreduzierenden Effekt der ischämischen Postkonditionierung (Boengler et al., 2008).

Im Tiermodell zeigte sich, dass der Reperfusionsschaden ausgelöst wird durch mehrere Prozesse, wichtig hierbei ist auch der zelltödliche Reperfusionsschaden. Er wird ausgelöst und variiert durch mehrere Mechanismen, unter anderem oxidativen Stress und Öffnung des mPTP, sowie dem *reperfusion injury salvage kinases* (RISK) Signalweg. Dabei beeinflusst letzterer das Zellüberleben, indem er der Öffnung des mitochondrialen PTP entgegensteuert (Yellon & Hausenloy, 2007; Ibanez et al., 2010).

Der protektive Wirkmechanismus der ischämischen Prä- und Postkonditionierung ist nicht umfassend geklärt. Neuere Daten zeigen, dass die dadurch stimulierten protektiven Signaltransduktionswege sich in den Mitochondrien vereinen und die Inhibition des mPTP eine zentrale Rolle bei der Kardioprotektion spielt (Juhaszova et al., 2004; Murphy & Steenbergen, 2007). Die Öffnung des mPTP führt zur Durchlässigkeit der inneren mitochondrialen Membran und zum Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials. Dadurch kommt es zur ATP-Verarmung, mitochondrialer Schwellung und der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, was den Zelltod zur Folge hat. Die genaue Struktur dieser Pore ist jedoch nicht vollständig geklärt (Hausenloy et al., 2009). Dabei kommt der Öffnung dieser Pore eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod zu und wird aktiviert durch hohe mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen (Gunter & Sheu, 2009), anorganisches Phosphat, ROS, Fettsäuren und eine Reduktion von $\Delta\Psi_m$, was alles bei Ischämie/Reperfusion vorzufinden ist (Murphy & Steenbergen, 2007). Dem gegenüber verhindert ischämische Präkonditionierung (Hausenloy et al., 2002; Javadov et al., 2003; Argaud et al., 2004; Hausenloy et al., 2004) und ischämische Postkonditionierung (Argaud et al., 2005; Bopassa et al., 2006) die Öffnung des mPTP während der Reperfusion. Mitochondrien von STAT3-Knockout Mäusen tolerieren weniger Ca^{2+} , bis sich der mitochondriale PTP öffnet (Boengler et al., 2010), was einen protektiven Einfluss von STAT3 vermuten lässt.

Aus therapeutischer Sicht wäre es also erstrebenswert, STAT3 bei kardiovaskulären Erkrankungen direkt zu aktivieren. Abhängig vom Zelltyp sind jedoch für STAT3 sowohl anti- als auch proapoptotische Effekte beschrieben worden, bei vielen Tumoren ist STAT3 konstitutiv aktiviert (Stephanou & Latchman, 2005), was einen medikamentösen Ansatz direkt an STAT3 schwierig macht (Boengler et al., 2008). Daher ist es von großem Interesse, die Signaltransduktionswege via JAK-STAT aufzuklären, um dort neue Ansatzpunkte für zukünftige Medikamente zu finden.

Ob es durch den Knockout von STAT3 nun zu einer Energieverarmung im Sinne mangelnder ATP-Produktion kommt konnte noch nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen, so wie die Frage ob STAT3 einen direkten Einfluss auf die Komplexe der Atmungskette hat oder ob es auf transkriptioneller Ebene in den Energiehaushalt der Zelle eingreift. Auch inwiefern der Knockout von STAT3 zu Veränderungen im Ca^{2+} -Haushalt, womöglich ausgelöst durch eine veränderte ROS-Produktion, und zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beiträgt konnte bisher noch nicht geklärt werden.

2.3 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob das Fehlen von STAT3 während einer akuten und/oder chronischen β -adrenergen Stimulation zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Energetik und des Redoxstatus führt, und ob dies einen Einfluss auf die mitochondriale ROS-Produktion hat. Hierzu wurden Arbeiten an isolierten Kardiomyozyten von Mäusen mit kardiomyozyten-spezifischer Deletion von STAT3 und Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt.

Im Untersuchungsprotokoll wurden die Myozyten einer niedrigen Stimulationsfrequenz gefolgt von einer Arbeitslasterhöhung durch Frequenzerhöhung mit der gleichzeitigen Gabe des β -AR Agonisten Isoprenalin ausgesetzt, um die akute Auswirkung β -adrenerger Stimulation auf die elektromechanische Kopplung, den Redoxstatus und die mitochondriale Energetik zu untersuchen.

Darüber hinaus wurden die Mäuse in einer zweiten Versuchsgruppe für 24 Stunden einer chronischen β -adrenergen Stimulation durch Isoprenalinfreisetzung aus implantierten osmotischen Minipumpen ausgesetzt. Auch mit den aus diesen Tieren isolierten Kardiomyozyten wurde das oben genannte Versuchsprotokoll durchgeführt, um die nun eingetretenen Veränderungen im Zellmetabolismus genauer untersuchen und vergleichen zu können.

Unter beiden Bedingungen wurden an isolierten Kardiomyozyten von STAT3-KO Mäusen sowie ihren Wildtyp-Geschwistertieren durch lichtmikroskopische Messungen die Zellverkürzungskinetiken und durch fluoreszenzoptische Methoden die Parameter der elektromechanischen Kopplung, $[\text{Ca}^{2+}]_c$, NAD(P)H, FAD^+ , $[\text{Na}^+]_i$, $\cdot\text{O}_2^-$ und das

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchsmaterial

3.1.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere für die Experimente wurden uns freundlicherweise von Frau Professorin Denise Hilfiker-Kleiner, Klinik für Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover, bereitgestellt. Bei den Tieren handelt es sich um NMRIxC57BL/6J Mäuse. Bei den STAT3-KO Mäusen wurde durch das Cre/loxP-System eine Myozyten-spezifische Deletion von STAT3 (α MHC-Cre^{tg/-};STAT3^{flox/flox}: STAT3-KO) hervorgerufen. Dabei nutzte man den nur in Myozyten vorhandenen Promoter α -Myosin heavy chain (α MHC).

Mäuse mit dem kardiomyozyten-spezifischen Knockout von STAT3 zeigen eine normale kardiale Funktion bis zum 3. oder 4. Lebensmonat und neigen zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz in höherem Alter oder nach einer Schwangerschaft (Hilfiker-Kleiner et al., 2007).

Die erste Versuchsgruppe setzt sich aus “ungestressten“ STAT3-KO und WT NMRIxC57BL/6J Mäusen ohne STAT3-KO zusammen. Dabei diente diese Wildtyp-Gruppe als Kontrollgruppe.

Die zweite Versuchsgruppe setzt sich aus STAT3-KO und WT Mäusen zusammen, denen für 24 Stunden vor Myozytenisolation eine Isoprenalinpumpe intraperitoneal implantiert wurde. Bei allen Versuchstieren wurde im Alter zwischen 3-6 Monaten das Herz unter Vollnarkose heraus präpariert und anschließend die Myozyten nach dem abgewandelten AfCS- Protokoll isoliert.

3.1.2 Verwendete Substanzen

3.1.2.1 Substanzen zur Herstellung des Perfusionspuffers

Hersteller und MG der Komponenten des Perfusionspuffers, der zur Myozytenisolation eingesetzt wurde:

Substanz	MG	Hersteller
2,3- Butandion-Monoxim, BDM	101	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chlorwasserstoff, HCl	36	
D-(+)-Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180	
Hepes Natriumsalz, C ₈ H ₁₇ N ₂ NaO ₄ S	238	
Kaliumchlorid, KCl	75	
Kaliumhydrogencarbonat, KHCO ₃	100	
Kalziumchlorid, CaCl ₂	110	
Magnesiumsulfatheptahydrat, MgSO ₄ * 7H ₂ O	246	
Natriumhydroxid, NaOH	40	
Phenolrot		
Taurin, NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H	125	
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	136	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Na ₂ H ₂ PO ₄	120	
Natriumchlorid, NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	84	VWR, Leuven

3.1.2.2 Substanzen zur Herstellung Stopppuffer 1, 2 und Liberasepuffer

Substanz	Hersteller
FCS (Bovines Serum)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Liberase Blendzyme 1	Roche Diagnostics, USA

3.1.2.3 Weitere zur Myozytenisolation verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Hepes-Pufferlösung	
Medium 199, GlutaMAX	
Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat	

3.1.2.4 Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen

Substanz	Hersteller
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
DL-Isoproterenolhydrochlorid (zur Befüllung der osmotischen Pumpe)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa, 5000 I. E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isoprenalinpumpe, alzet, Micro-Osmotic Pump, Model 1003D	Durect Corporation, Cupertino, CA 95014
Rimadyl Injektionslösung, 1ml enthält 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Softasept N Hautdesinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Wärmematte	Sanitas, Uttenweiler

3.1.2.5 Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere

Der instrumentelle Aufbau zur Durchführung der Isoflurannarkose an den Mäusen setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Vaporizer Key Fill Isoflurane, Fluovac Gas Evacuation System, Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5ml/min mit 5% Isofluran), Keyfill Adapter, Tube Adapter to Fluosorber. Alle Teile des Narkosesystems wurden von Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, bezogen.

3.1.2.6 Präparations- und Isolationsinstrumentarium

Benutztes Präparations- und Isolationsinstrumentarium zur Kanülierung und Perfusion der Herzen:

Instrument/ Gerät	Hersteller
Aortic Cannula 1mm Ø	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten
Langendorff- Perfusionsanlage	
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	Aesculap, B. Braun Melsungen AG,

	Messungen
Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Reglo Digital mikroprozessorgesteuerte Dosierpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt

3.1.2.7 Anlage zur Messung der Fluoreszenzen

Die Anlage zur Messung der Fluoreszenzen setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Acquisition Computer (inkl. Monitor), Firma Dell
- CFA Option D: Dual Emission option for CFA300
- CFA300 Cell framing adapter
- FSI700 Fluorescence system interface
- MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable filed rate CCD
- MUS200 μ Step stand alone filter wheel and controller
- PMT400 Photomultiplier sub-system
- PTV100 PMT to Voltage Adapter
- Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3), Warner Instruments
- Mikroskop Nikon Ti-S/L100
- IONWZ IonWizard Core + Analysis (Software)
- SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)
- Model TC-324B Heater Controller, Single Channel
- Stimulus Isolation Unit (SIU-102), Warner Instruments
- Filter und Spiegel siehe Tabelle 1.

Bis auf das Mikroskop, welches von Nikon GmbH, Düsseldorf, bezogen wurde, wurden alle zuvor genannten Gerätschaften von der Firma IonOptix, Dublin, Irland, gekauft. Alle Filter und Spiegel wurden bei Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, gekauft. Die Lampe Xenon short arc lamp -75XE (75W) wurde von Ushio Inc., Tokyo, eingekauft.

Spiegel- Bezeichnung	Spiegel (nm)	Transmission (nm)	Farbstoffe	Ort
T660LPXR		>660	(Durchlicht)	Mikroskop
365/535 pc (Bezeichnung C120299)	340/540	405/485/>600	Indo-1/ TMRM ⁺	Mikroskop (Filter 1)
89017bs F/TR (Bezeichnung 120298)	340/490	435/>505	NAD(P)H/ FAD ⁺ / MitoSOX	Mikroskop (Filter 2)
400DCLP	<400	>400	SBFI	Mikroskop (Filter 3)
650DCXR	<650	>650	(Durchlicht)	Vor der Kamera
490DCLP	<490	>490	NADH/ FAD ⁺	PMT Spiegel
Reiner Spiegel	alles		NADH/ FAD ⁺	PMT Spiegel
440DCLP	<440	>440	Indo-1/ TMRM ⁺	PMT Spiegel
515DCXR	<515	>515	Indo-1/ TMRM ⁺	PMT Spiegel
D435/35x	---	435±17,5	NADH	Vor dem PMT
D525/30x	---	525±15	FAD ⁺	Vor dem PMT
D510/40M	---	510±10	SBFI	Vor dem PMT
D405/30x	---	405±15	Indo-1	Vor dem PMT
D485/30x	---	485±15	Indo-1	Vor dem PMT
D605/55x	---	605±27,5	TMRM ⁺	Vor dem PMT
D340/12x	---	340±6	NADH, Indo-1	Filterrad
S490/20x	---	490±10	FAD ⁺	Filterrad
D540/25x	---	540±12,5	TMRM ⁺	Filterrad
D360±15	---	360±15	SBFI	Filterrad
D380±15	---	380±15	SBFI	Filterrad

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Filter. Transmission, sowie die Farbstoffe, bei deren Messung sie verwendet wurden und Anordnung im Messaufbau. Siehe auch in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt. DCLP, dichroic long pass; pc, polychroic.

3.1.2.8 Substanzen der Tyrodelösung

Substanz	MG	Hersteller
L-(+)-Ascorbinsäure	176	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) N, N, N',N'-tetraessigsäure	468	
Tetranatriumsalz (EGTA)		
D-(+)-Glukose, C ₆ H ₁₂ O ₆	180	
Hepes, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238	
Kaliumchlorid, KCl	75	
Kaliumgluconat, KC ₆ O ₇ H ₁₁	234	
Kalziumchlorid, CaCl ₂	110	
Natriumgluconat, NaC ₆ O ₇ H ₁₁	218	
Natrium-Hepes, C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa	260	
Natriumpyruvat, C ₃ H ₃ NaO ₃	110	
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	95	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.2.9 Weitere Substanzen zur Myozytenmessung im Fluoreszenzmikroskop

Substanz	Hersteller
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
FCCP, Carbonyl Cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon	
Gramicidin (A,B,C und D)	
Isoprenalin	
Monensin	
Natriumzyanid, NaCN	
Strophanthidin	

3.1.2.10 Farbstoffe zur Myozytenfärbung und die Lösungsmittel

Farbstoffe	MG	Hersteller
Dimethylsulfoxid, DMSO, C ₂ H ₆ OS	78	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

SBFI (AM)	1129	TEFLABS, Texas, USA
Indo-1, AM	1010	Invitrogen, Karlsruhe
MitoSOX	760	
Pluronic F-127, P3000MP	-	
TMRM ⁺	501	

3.1.2.11 Beschichtung der Deckgläschen

Substanz	Hersteller
Laminin aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarcoma	Roche Diagnostics, Indianapolis

3.1.2.12 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Seidenfaden (6.0)	Suprama, Berlin
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Discofix C Dreiwegehahn Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Original Perfusor Spritze 50ml Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson-Johnson, Neuss
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Falcon, Blue Max, 15ml und 50ml Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
MoliNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Nadel BSS Microlance 3 Spritze 1ml BD Plastipak	Becton Dickinson, N. J., USA
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht

SafeSeal Reagiergefäße, 2ml	
Sauerstoff	Praxair, Düsseldorf
Zellkulturschalen Ø 100 x 20mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen Ø 60 x 15mm	
Sonstige Geräte	Hersteller
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Galaxy 16DH	
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, NJ, USA
Wärmeschrank Heraeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	

3.2 Methoden

3.2.1 Myozytenisolation

Die Myozytenisolation wurde nach dem AfCS-Protokoll (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02) vorgenommen, welches an unseren Versuchsaufbau und unsere Zielsetzungen angepasst wurde. Es wurden immer 250ml Perfusionspuffer mit Aqua dest. für eine Isolation angesetzt. Der Perfusionspuffer hatte folgende Zusammensetzung (mmol/l): NaCl 113; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,6; $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; Phenolrot 0,032; NaHCO_3 12; KHCO_3 10; Hepes Pufferlösung 10; Taurin 30; Glukose 5,5; BDM 10. Es wurde zur Herstellung des Perfusionspuffers ausschließlich einfach destilliertes Wasser benutzt.

Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters sowie 1M NaOH bzw. 1M HCl auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde 1mM CaCl_2 hinzugefügt. Aus dem Perfusionspuffer wurden Stopppuffer 1, 2 und der Liberasepuffer hergestellt (Tabelle 2).

Stopppuffer 1:	9ml Perfusionspuffer 1ml FCS-Lösung 12,5µl 10 mM CaCl_2
Stopppuffer 2:	28,5ml Perfusionspuffer 1,5ml FCS 37,5µl 10 mM CaCl_2
Liberasepuffer:	20ml Perfusionspuffer 40µl Trypsin 25,2µl 10 mM CaCl_2 2mg Liberase (0,08mg/ml)

Tabelle 2: Zusammensetzung von Stopppuffer 1, 2 und Liberasepuffer

Zum Auffangen und zur Kanülierung des herausgeschnittenen Herzens wurde jeweils 10ml raumtemperierter Perfusionspuffer in ein 60mm Schälchen gegeben. Die Langendorff Perfusionsanlage wurde mit 250ml Aqua dest. vorgespült und ein Schenkel der Perfusionsapparatur mit Perfusionspuffer luftblasenfrei gefüllt. In den zweiten Schenkel wurde anschließend der Liberasepuffer luftblasenfrei eingespült. Zehn Minuten vor Beginn der Myozytenisolation wurde den Mäusen 0,5ml Heparin (1:10 mit NaCl (0,9%) verdünnt), sowie 0,1ml Rimadyl (1:15 mit NaCl (0,9%) verdünnt) s.c. gespritzt. Anschließend wurden

die Mäuse mit Isofluran (1,5-2 Vol% Isofluran und 0,5l O₂/min) betäubt, indem die Schnauze der Tiere an das Narkosesystem für Kleintiere angeschlossen wurde. Nach Reflexauslöschung und dementsprechend tiefer Narkose (es wurde der Zwischenzehenreflex getestet) wurden Bauch und Thorax der Maus mit Softasept N Hautdesinfektionsmittel eingesprüht. Danach begann die Herzentnahme durch Thorakotomie mithilfe einer Schere. Dazu wurde ein V-förmiger Schnitt vom Bauchnabel Richtung Axilla vorgenommen, anschließend das Sternum mithilfe einer Pinzette fixiert und das Zwerchfell brustwirbelnah durchgeschnitten, sodass das Herz sichtbar wurde. Die Brustwirbel wurden sodann beidseits medial durchtrennt und das Sternum nach oben verlagert um das Herz frei zu legen. Das Herz wurde mit einer Feinschere kurz unterhalb des Aortenbogens sowie von anderen zu- und abführenden Gefäßen abgeschnitten und entnommen. Danach wurde das Herz unter einem Auflichtmikroskop kanüliert (und zwar so, dass die Koronargefäße frei blieben und die Aortenklappe nicht durchstoßen wurde) und mittels eines chirurgischen 5-0 Polyesterfadens an der Kanüle fixiert. Umliegende Gewebe (Thymus, Lunge), die noch am Herz befestigt waren, wurden vollständig entfernt.

Im nächsten Schritt wurde das kanülierte Herz an die Langendorff Perfusionsanlage angeschlossen und mit dem Perfusionspuffer 4 Minuten (2ml/min) bei 37°C gespült. Darauf folgte für zirka 8 Minuten der Verdau mit Liberasepuffer (2ml/min) bei 37°C bis das Herz angeschwollen, leicht fahl und schlaff erschien. Exemplarischer Aufbau der Herz-Perfusionsanlage siehe Abbildung 5.

Alle nachfolgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Nach dem Verdau wurde das Herz mithilfe einer Schere unter den Vorhöfen abgeschnitten und in ein 60mm Schälchen mit 5ml Perfusionspuffer transferiert um es mit der Schere viermal einzuschneiden. Anschließend wurde das Herz in ein 60mm Schälchen mit 5ml Perfusionspuffer und 5ml Stopppuffer 1 transferiert, um es für etwa 5 Minuten in der Lösung zu schwenken. Zur Kontrolle der Qualität der Isolation wurde nach diesem Schritt ein Tropfen der Myozytenlösung entnommen und unter dem Durchlichtmikroskop die Ausbeute kontrolliert.

Typisches Bild einer Myozytenisolation unter dem Durchlichtmikroskop siehe Abbildung 6.

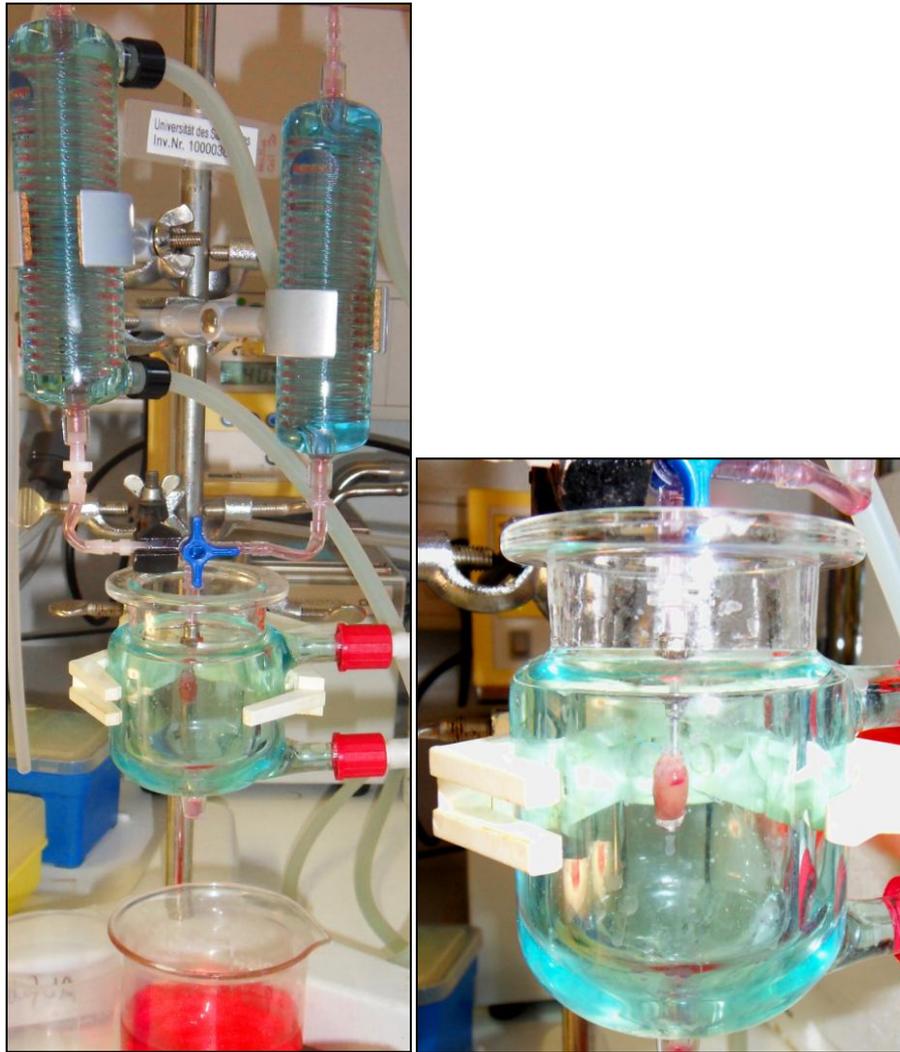


Abbildung 5: Langendorff-Perfusionsanlage mit retrograd perfundiertem Mäuseherzen. Linkes Bild: oben zuführende Leitungen mit Perfusionspuffer bzw. Liberasepuffer. Rechtes Bild: vergrößerte Darstellung eines kanülierten Mäuseherzens beim Verdauungsprozess zur Zellisolation.

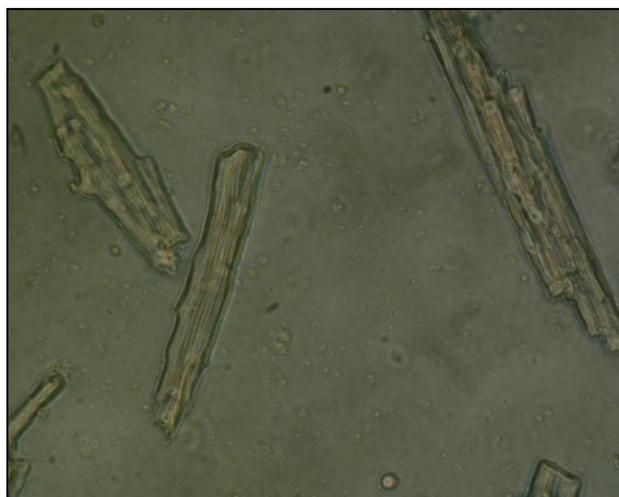


Abbildung 6: Isolierte kardiale Mäusemyozyten. Ansicht unter dem Durchlichtmikroskop zur Kontrolle des Isolationserfolges. Vergrößerung 20-fach.

Bei guter Qualität (stabförmige Zellen und sichtbare Querstreifung) der vereinzelt Myozyten wurde das restliche Herz verworfen, die gelösten Myozyten in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt und für 5-10 Minuten sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde entnommen und für eine Minute bei 800 U/min zentrifugiert. Zum ersten Pellet wurde gleichzeitig 5ml Stopppuffer 2 gegeben und vorsichtig resuspendiert. Dem Pellet des Zentrifugats wurde ebenfalls 5ml Stopppuffer 2 zugegeben und resuspendiert. Beide im Stopppuffer 2 gelösten Pellets wurden in einem 100mm-Schälchen vereint. Nun begann der Kalziumaufbau der Myozyten, der sich aus den nun folgenden Schritten zusammensetzte.

Alle vier Minuten wurde die neue Kalziumlösung dazugegeben und anschließend vorsichtig geschwenkt.

1. 50 μ l einer 10mM Kalziumchloridlösung, entsprechend einer Kalziumendkonzentration von 62 μ M.
2. 50 μ l einer 10mM Kalziumchloridlösung, entsprechend einer Kalziumendkonzentration von 112 μ M.
3. 100 μ l einer 10mM Kalziumchloridlösung, entsprechend einer Kalziumendkonzentration von 212 μ M.
4. 30 μ l einer 100mM Kalziumchloridlösung, entsprechend einer Kalziumendkonzentration von 500 μ M.
5. 50 μ l einer 100mM Kalziumchloridlösung entsprechend einer Kalziumendkonzentration von 1mM.

Die Lösung wurde danach in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt und für 8 Minuten sedimentieren gelassen. Daraufhin wurde der Überstand entnommen und bei 800 U/min zentrifugiert. Beide Pellets wurden vereint und unter sterilen Bedingungen 25ml des auf 37°C vorgewärmten Mediums (Medium 199 mit 5% FCS und 1% Penicillin Streptomycin, welchem kurz vor Benutzung 1% HEPES beigemischt wurde) dazugegeben. Die Zellen wurden in ihrem Medium bis zu ihrer Verwendung im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre aufbewahrt.

Für die Verifikation des Knockouts mittels PCR wurden von den Mäusen post mortem jeweils ein Stück Ohr und Schwanz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Implantation von osmotischen Minipumpen mit Freisetzung von Isoprenalin

In der zweiten Versuchsgruppe wurde den Mäusen eine osmotische Minipumpe (Alzet) implantiert, die den β -AR Agonisten Isoprenalin enthielt. Diese verblieb für 24 Stunden im Körper der Maus, bevor diese geopfert wurde. Die osmotische Pumpe wurde nach Herstellerangaben einen Tag vor Implantation unter sterilen Bedingungen mit Isoprenalin befüllt, sodass sie an die Maus 10mg Isoprenalin pro kg Körpergewicht pro Tag abgab. Die fertige Pumpe wurde bis zur Implantation bei Raumtemperatur in einer 0,9% NaCl-Lösung in einem 50ml Falcon Röhrchen im Dunkeln gelagert.

Zur Analgesie wurde den Mäusen 15 Minuten vor dem Eingriff 0,1ml Rimadyl (1ml enthält 50mg Carprofen und 10mg Benzylalkohol) s.c. gespritzt. Die Narkose erfolgte mittels Isofluran-Insufflation (0,5l O₂/min zusammen mit 5% Isofluran zur Einleitung, reduziert auf 1,5% im Verlauf) über ein Narkosegerät der Firma Harvard Apparatus. Nach Eintreten der Narkose wurde bei der Maus in Bauchlage eine wenige mm messende Inzision der Haut und der darunter liegenden Faszie kaudal des rechten Schulterblattes durchgeführt und die Isoprenalinpumpe subkutan in den Rücken implantiert. Nach Einbringen der Pumpe wurden Faszie und Haut mit einer 5.0 Seidenfaden-Naht verschlossen. Die Implantation der Minipumpe erfolgte erst bei tiefer Narkose, wenn das Tier unter kontrolliertem Schmerzreiz keine Reaktion mehr zeigte. Um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden, wurden diese mit Augensalbe (Dexpanthenol) versehen. Zum Schutz vor Unterkühlung wurden die Mäuse während des Eingriffs und bis zum Erwachen aus der Narkose auf eine Wärmematte gelegt. Noch während der Narkose wurde eine Ohrmarkierung gesetzt. Als Schmerztherapie erhielten die Tiere auch am Folgetag Carprofen (5 mg/kg s.c.).

3.2.3 Transfer der Myozyten auf die Deckgläschen

Zur Fixierung der Myozyten für die mikroskopischen Messungen wurde Laminin in einer Konzentration von 0,5mg/ml verwendet. Davon wurde vor jeder Messung 4 μ l Laminin sowie 0,3ml Messtyrode auf ein Deckgläschen mittig aufgetragen und anschließend 20 Minuten gewartet, bevor die Myozyten auf die beschichteten Deckgläschen transferiert wurden. Danach folgte wieder eine 10-minütige Ruhezeit (um ein Anhaften der Zellen an das Laminin zu gewährleisten), bevor das Deckgläschen anschließend in die Versuchskammer und dann damit in das Mikroskop zur jeweiligen Messung eingespannt wurde.

3.2.4 Aufbau der Messanlage und Messprotokoll

Sämtliche Messungen der Fluoreszenzen sowie der Zellverkürzung wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop sowie einer Anlage der Firma IonOptix vorgenommen und am PC mit einem Programm der Firma IonOptix (IONWizard Version 6.3) aufgezeichnet.

Die nativen (bei der NAD(P)H/FAD⁺-Autofluoreszenz Messung) oder mit Fluoreszenzfarbstoff vorher inkubierten Myozyten wurden in ihrer Versuchskammer im Mikroskop mittels einer Kamera, der Myocam-s, in das Computerprogramm (IONWizard Version 6.3) projiziert. Dieses Programm ist imstande, das Echtzeit-Bild der Myozyte während der Messung auf dem Computer darzustellen, gleichzeitig die Sarkomerlänge zu messen und somit die prozentuale Sarkomerverkürzung zu errechnen. Am Epifluoreszenzmikroskop (Nikon Ti-S/L100) wurde der jeweilige Farbstoff in der Myozyte mittels einer UV-Lampe (Xenon Short Arc Lamp -75EX) angeregt und der Emission des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes aufgezeichnet. Eine Übersicht der verschiedenen gemessenen Autofluoreszenz bzw. Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen gibt Tabelle 3:

Indikator #1	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Indikator #2	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450	FAD ⁺	FAD ⁺	485	525
MitoSOX	·O ₂ ⁻ in Mitochondrien	390	580	--	--	--	--
Indo-1 (AM)	[Ca ²⁺] _c	340	405/ 485	TMRM ⁺	$\Delta\Psi_m$	540	605
SBF1 (AM)	[Na ⁺] _i	340/ 380	505	--	--	--	--

Tabelle 3: Verwendung einzelner bzw. mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Autofluoreszenzmessung in derselben Zelle. λ_{exc} , Anregungswellenlänge; λ_{em} , Emissionswellenlänge.

Die einzelnen Komponenten der IonOptix-Anlage und deren Aufbau zur Messung der Fluoreszenz und der Sarkomerlänge zeigt Abbildung 7.

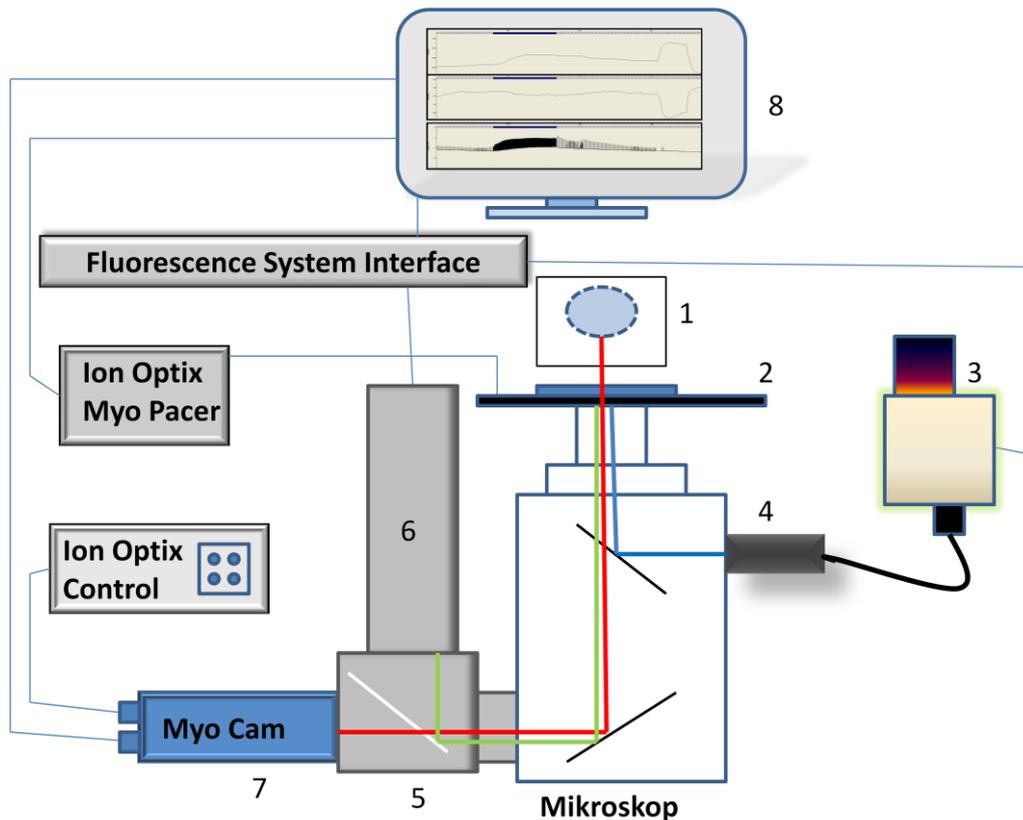


Abbildung 7: Schematische Darstellung der IonOptix Anlage zur Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung. Die Linien zeigen die Verbindung der einzelnen Komponenten an. 1 Lampe zur Myozytendarstellung und Sarkomermessung, rote Linie Strahlengang (Durchlicht). 2 Objektkammer auf Mikroskoptisch. 3 Xenon Arc Lamp mit IonOptix µStep und Filter Bausatz. 4 Lichtleitereinkoppler am Mikroskopgehäuse, Anregungslicht blaue Linie, Emissionslicht der Farbstoffe grüne Linie. 5 Zell-Frame-Adapter. 6 Photomultiplier eins bis drei. 7 MyoCam-S. 8 Computer mit Programm IonWizard von IonOptix.

Der Aufbau der einzelnen Filter und der Strahlengang wird schematisch in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt. Eine Übersicht der verwendeten Filter gibt Tabelle 1.

Zur Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H und FAD⁺ wurde das Licht mit der Xenon Short Arc Lamp durch zwei Filter (D340/12x und S490/20x) abwechselnd, je nach Messsubstrat (NAD(P)H und FAD⁺), mit verschiedenen Wellenlängen auf die Messkammer im Mikroskop geleitet, wo es die Farbstoffe zur Lichtemission anregte (Abbildung 8).

Zur Messung des SBFi-Signals wurde ein ähnliches Messsetup benutzt, hier wurde der Xenonlampe der Filter D360 ± 15 nachgeschaltet. Das gefilterte Licht der Xenonlampe traf anschließend im Mikroskop wiederum auf einen dichroischen Spiegel (NAD(P)H/FAD⁺: 89017bs F/TR; SBFi: 400DCLP) bevor es die Fluoreszenz der Farbstoffe in den Myozyten anregen sollte. Nach Anregung emittierten die Myozyten daraufhin Licht, welches zusammen mit dem Durchlicht des Mikroskoplichtes in die Messstation auf einen Spiegel (650DCXR)

vor der Myocam-S ausgeleitet wurde. Das Durchlicht passierte diesen Filter auf dem Weg in die Myocam-S, das emittierte Licht der Farbstoffe mit $\lambda > 650\text{nm}$ wurde in Richtung der PMTs weitergeleitet, wo es bei den NAD(P)H/FAD⁺ Messungen auf den Spiegel 490DCLP traf, welcher nur $\lambda > 490\text{nm}$ passieren ließ und die kürzeren Wellenlängen PMT1 zuleitete, wo die NAD(P)H Fluoreszenz aufgenommen wurde und dem noch der Filter D435/35 zur genaueren Signaleinschränkung ($\pm 17,5\text{nm}$) vorgeschaltet war. FAD⁺ wurde im PMT2 aufgenommen, dem alle Wellenlängen $> 490\text{nm}$ zugeleitet wurden und welchem noch der Filter D525/30x vorgeschaltet war. Bei der Messung des SBFI-Signales wurden nur die Messsignale aus PMT2 ausgewertet, dem der Filter D510/30M vorgeschaltet war.

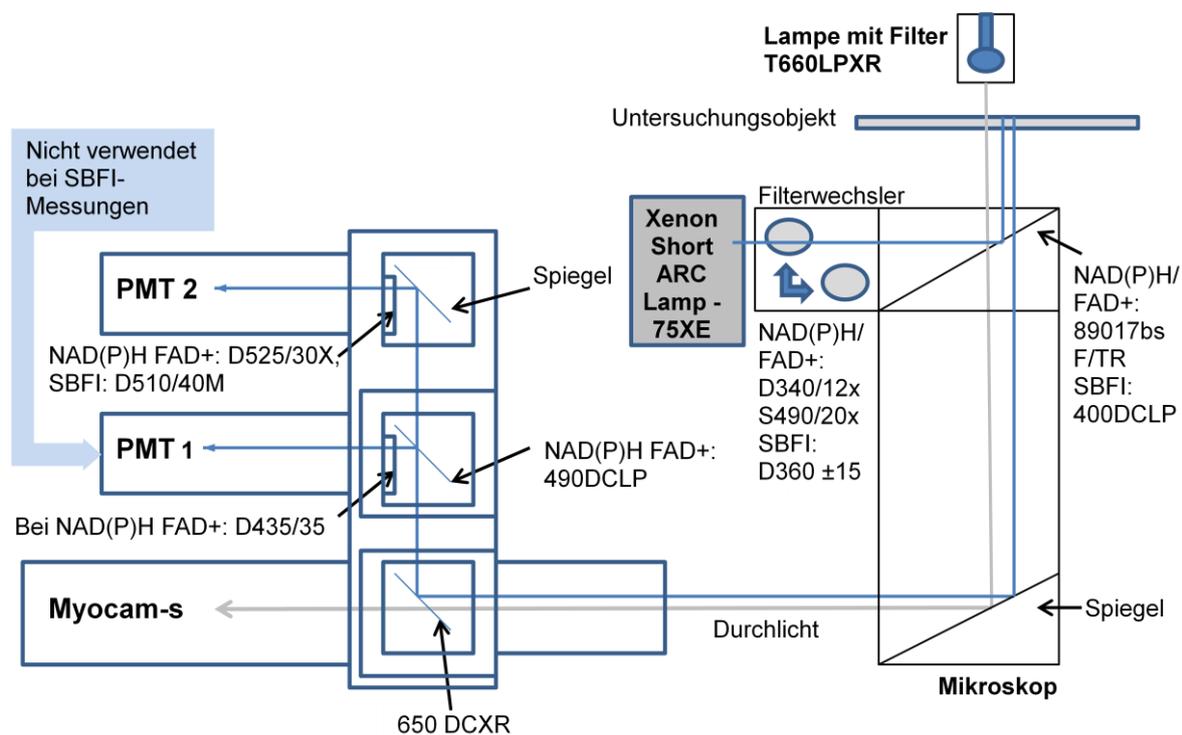


Abbildung 8: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H /FAD⁺ bzw. SBFI. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegeln, Band-Pass Filtern und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der (Auto-) Fluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ bzw. der Fluoreszenz des Na⁺-Farbstoffs SBFI sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

Die zeitgleiche Messung des $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mittels Indo-1 und des Membranpotentials mittels TMRM⁺ sowie die Messung der Superoxidproduktion mittels MitoSOX wurden in einem ähnlichen Setup vorgenommen (Abbildung 9). Dabei wurden auch hier die Myozyten mit der Xenon Short Arc Lamp angeregt, welcher ein Filterset nachgeschaltet wurde (TMRM⁺: D540/25x, MitoSOX: D380±15, Indo-1: D340/12x) um die entsprechenden Anregungswellenlängen zu erzeugen. Das Anregungslicht wurde hier über einen Filterspiegel

(Indo-1/TMRM⁺: 365/535pc; MitoSOX 89017bs F/TR) auf das Objekt weitergeleitet. Das emittierte Licht durch Anregung der Farbstoffe in den Zellen wurde an einem Seitenausgang des Mikroskops zusammen mit dem Durchlicht, erzeugt durch der Lampe und dem Filter T660LPXR, auf einen dichroitischen Spiegel (650DCXR) weitergeleitet. Dieser, mit einer Ausrichtung von 45° zum Strahleneinfall ausgerichtete Spiegel teilte das sichtbare Licht für die Myocam-S vom UV-Licht, wobei letzteres zu den Photomultipliern weitergeleitet wurde. In diesen traf es zuerst auf den Spiegel 440DCLP, welcher nur Licht $\lambda > 440\text{nm}$ passieren ließ und alles darunter in den PMT 1 leitete. Das Licht, welches 440DCLP passieren konnte traf auf den zweiten PMT Spiegel (515DCXR), welcher nur noch Licht mit einer Wellenlänge $> 515\text{nm}$ passieren ließ und alles darunter in den PMT 2 spiegelte. Allen PMTs war ein weiterer Filter vorgeschaltet (PMT1: D405/30x; PMT2: D485/30x; PMT3: D605/55), welcher das Licht nur in den interessierenden Wellenlängen passieren ließ. Bei den Messungen mit dem Farbstoff MitoSOX wurde in dieser Messanordnung nur PMT3 benutzt.

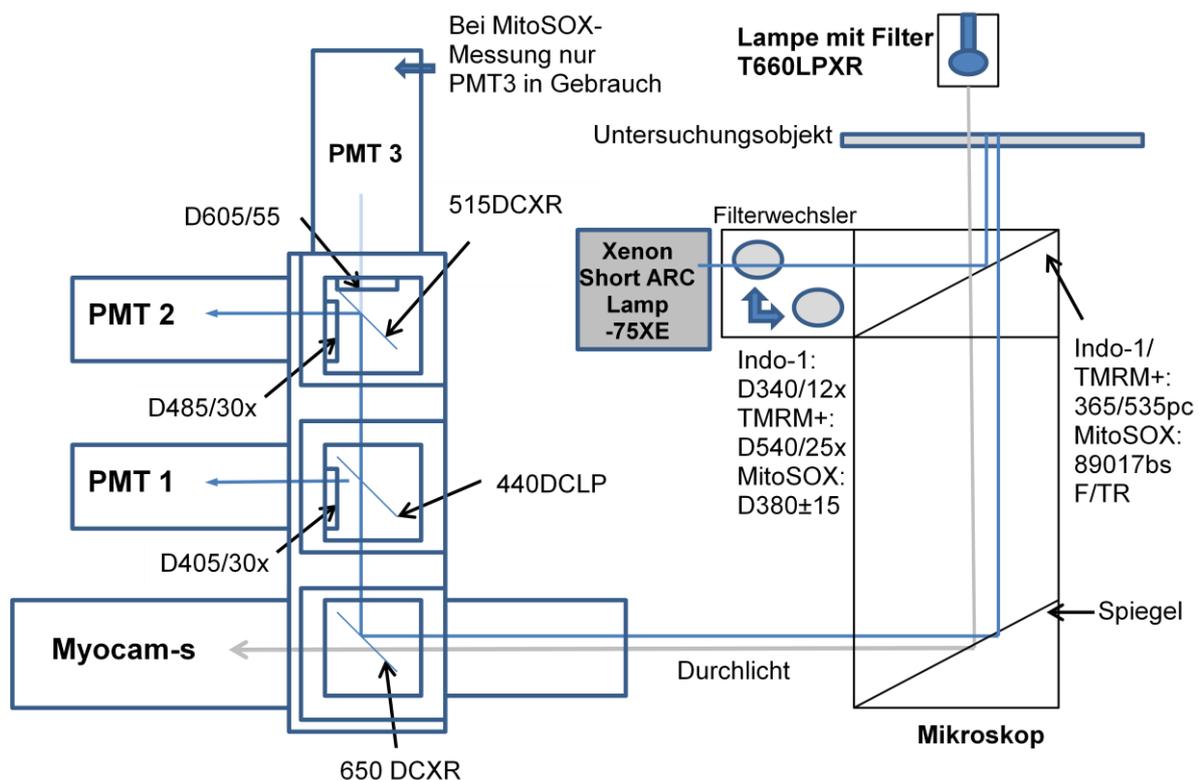


Abbildung 9: PMT- Einstellung zur Messung der Fluoreszenzen von MitoSOX oder Indo-1/TMRM⁺. Schematische Anordnung der Lichtquelle, Filterwechsler, dichroitischen (DC) Spiegeln, Band-Pass Filtern und Photomultiplier Röhren (PMT) zur Messung der Fluoreszenzen von Indo-1 und TMRM⁺ bzw. der Fluoreszenz des Superoxidfarbstoffes MitoSOX sowie der Zellverkürzung. Die Zahlen neben der Anlage bezeichnen die entsprechend eingebauten Filter.

Das emittierte Licht, erzeugt durch die jeweiligen Farbstoffe, wurde durch die PMTs aufgenommen, verstärkt und anschließend in eine Spannung umgewandelt. Diese Spannung wurde im Fluoreszenz System Interface der Firma IonOptix so umgesetzt, dass sie mit dem Programm IonWizard auf dem Bildschirm des Computers visualisiert und aufgezeichnet werden konnten.

Das Durchlicht, welches in die Myocam-s geleitetet wurde und die Myozyten abbildete, wurde zur Messung der Sarkomerlänge durch das Programm IonWizard herangezogen und später zur Auswertung der Sarkomerverkürzung bzw. der Darstellung der Zellverkürzungskinetiken benutzt.

Die Messungen der Myozyten wurden gemäß einem vorher etablierten Protokoll für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff vorgenommen. Während der Messung wurden den Myozyten in ihrer Messkammer im Mikroskop verschiedene Lösungen (Tabelle 4) zugeleitet, welche vorher durch eine Heizung auf dem Mikroskoptisch auf 37°C erwärmt wurden. Eine schematische Darstellung der zuführenden Gefäße und deren Zuleitung zum Messtisch findet sich in Abbildung 10.

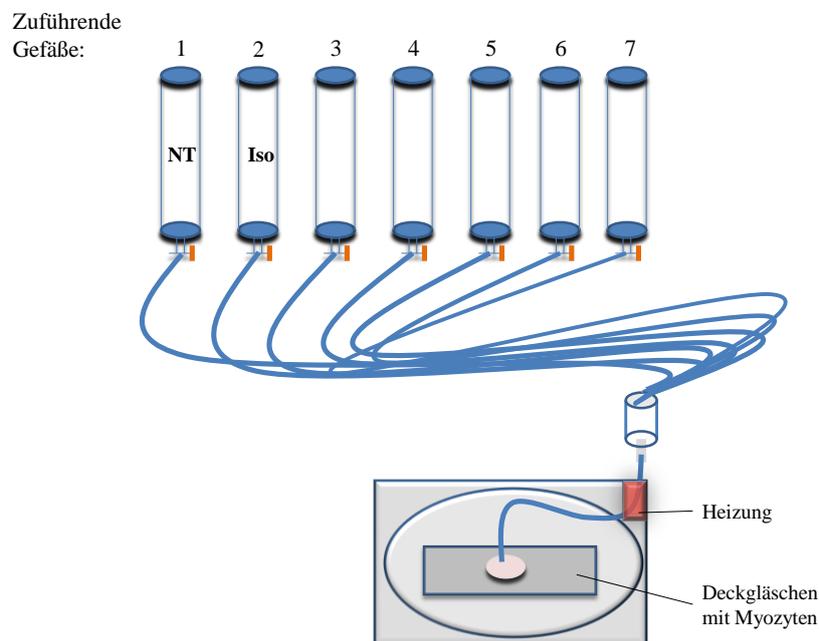


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Messkammer mit den Myozyten auf dem Mikroskop. Zuführenden Leitungen und Gefäße (1 bis 7) zur Zugabe der verschiedenen Lösungen während der Messung.

Allen Protokollen gleich ist eine zu Beginn bei 0,5Hz zugeleitete Normaltyrode (NT_A und NT_B). Diese hatten folgende Zusammensetzung:

NT_A (in mmol/l): NaCl 130; KCl 5; MgCl₂ 1; Na-Hepes 10; Na-Pyruvat 2; Ascorbinsäure 0,3; Glukose 180,16; CaCl₂ 1.

NT_B (in mmol/l): NaCl 130; KCl 5; MgCl₂ 1; Na-Hepes 10; Glukose 180,16; CaCl₂ 1.

Vor der Zugabe von CaCl₂ zur Normaltyrode wurde der pH mittels eines pH-Meters und 1M HCl bzw. 1M NaOH bei Raumtemperatur auf pH 7,5 eingestellt. NT_A diente zur Messung der Fluoreszenzen von NADH/ NADPH/ FAD⁺, Indo-1, TMRM⁺ und SBFI. NT_B wurde für die MitoSOX-Messungen ohne die antioxidativ wirkenden Substanzen Na-Pyruvat und Ascorbinsäure hergestellt. Nachfolgend eine Auflistung der mit den Myozyten während den Messungen in Kontakt gebrachten Lösungen:

Messung der Fluoreszenzen von	Lösungen in den Gefäßen						
	1	2	3	4	5	6	7
NADH/ NADPH/ FAD ⁺	NT _A	50ml NT _A + Iso (30 nmol/L)	50ml NT _A + 5µl FCCP	50ml NT _A + 10 mg HCN			
MitoSOX	NT _B	50ml NT _B + Iso (30 nmol/L)	50ml NT _B + 50mM Antimycin A				
Indo-1 / TMRM ⁺	NT _A	50ml NT _A + Iso (30 nmol/L)					
SBFI	NT _A	50ml NT _A + Iso (30 nmol/L)	0 mM Na ⁺	10 mM Na	20 mM Na ⁺	40 mM Na ⁺	145 mM Na ⁺

Tabelle 4: Auflistung der Lösungen, die während der Messung am Fluoreszenzmikroskop den Myozyten zugeführt wurden. Antimycin A wurde in Ethanol gelöst.

Initial wurde allen Zellen unter 0,5Hz Stimulation für 60 Sekunden NT_A bzw. NT_B zugeleitet. Um dann einen physiologischen Anstieg der Arbeitslast zu simulieren, wurde kurz vor und während der 5-Hz-“Stress“-Sequenz Isoprenalin (Iso) zu den Myozyten hinzugegeben, um möglichst nahe einer Stresssituation in vivo zu kommen, da Stress und β-AR Stimulation

meist einhergehen und die Gabe von Isoprenalin die Herzfrequenz auf das gleiche Niveau steigert wie körperliche Betätigung (Kass et al., 1998).

Nach 60 Sekunden des Protokolls wurden den sich kontrahierenden Zellen die Lösung NT_A bzw. NT_B, mit Iso versetzt (Endkonzentration von $3 \cdot 10^{-8} \text{M}$) zugeleitet, bis die Kontraktionsamplitude signifikant zunahm (sichtbar an der gemessenen Amplitude im IonOptix Computerprogramm) um dann unter laufender NT+Iso Infusion die Stimulationsfrequenz für drei Minuten auf 5Hz zu erhöhen. Dieser Sequenz folgte immer ein Auswaschen von Isoprenalin durch die Zugabe von NT für 60 Sekunden (Fehler! erweisquelle konnte nicht gefunden werden.).

Abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff wurden dann gegen Ende des Experiments die Signale kalibriert, im Fall der Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H/FAD⁺ mit FCCP (5 μM) und Zyanid (4 mM). Dabei wurde nach Zugabe von FCCP jeweils ein stabiles Plateau des Messsignals abgewartet, bevor Zyanid zugeleitet wurde (Abbildung 12). Bei dem Protokoll MitoSOX wurde am Ende der Messung Antimycin A (150 μM) zugegeben, um eine maximale Fluoreszenz des Farbstoffes zu erhalten sowie als Positivkontrolle des Signals des Farbstoffes welches unter Antimycin A stark ansteigen sollte. Es wurde bei der Antimycin A Kalibrierung des MitoSOX-Messsignals bis zum Zelltod (sichtbar am Computerbildschirm, starke Kontraktion der Myozyte mit anschließendem Verbleib in nicht mehr stabförmiger Konfiguration, sowie Verschwinden der Querstreifung) gepaart mit einem stagnierenden Messsignal.

Bei den Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SBFI am Fluoreszenzmikroskop wurde, um Eichdaten für die anschließende Auswertung zu generieren, die Myozyten nach dem eigentlichen Messprotokoll definierten ansteigenden Na⁺-Lösungen ausgesetzt (Tabelle 4, Tabelle 5). Durch die Ionophoren Gramicidin und Monensin, sowie Strophanthidin, einem Hemmer des Na⁺-K⁺-Austauschers der Zellmembran, wurde die Aufnahme von Na⁺ in die Zelle bzw. das Verbleiben dort gewährleistet, da sich die intrazelluläre von der extrazellulären Na⁺-Konzentration unter physiologischen Bedingungen normalerweise unterscheidet. Gramicidin, Monensin und Strophanthidin wurden laut Herstellerangaben gelöst.

	0,5 Hz	Wenn Iso Wirkung zeigt, 5 Hz für 180s	0,5 Hz						
NAD(P)H / FAD ⁺	60 s NT	NT _A + Iso 3*10 ⁻⁸ M	60 s NT	FCCP	CN	NT			
				Bis stabiles Plateau erreicht	Bis stabiles Plateau erreicht				
MitoSOX	60 s NT	NT _B + Iso 3*10 ⁻⁸ M	60 s NT	Antimycin A	NT				
				Bis Zelle gestorben					
Indo-1 / TMRM ⁺	60 s NT	NT _A + Iso 3*10 ⁻⁸ M	60 s NT						
SBFI	60 s NT	NT _A + Iso 3*10 ⁻⁸ M	60 s NT	mM Na ⁺					
				0	10	20	40	145	NT
				Jeweils bis stabiles Plateau erreicht					

Abbildung 11: Übersicht der Messprotokolle der zellulären Fluoreszenzen von NAD(P)H/FAD⁺, MitoSOX, Indo-1 mit TMRM⁺ und SBFI. Beginn jeder Messung bei 0,5Hz und Normaltyrode (NT_{A/B}). Nach 60 Sekunden Zugabe Normaltyrode mit Isoprenalin (Iso, 3*10⁻⁸M). Bei sichtbarer Zunahme der Zellverkürzung Steigerung der Arbeitslast für 180s auf 5Hz und weiterhin NT_{A/B} + Iso. Danach Arbeitslastverminderung auf 0,5Hz und auswaschen von Iso mit NT. Kalibrierung des gemessenen Signals bei NAD(P)H/FAD⁺, MitoSOX und SBFI am Ende jeder Messung bei 0,5Hz.

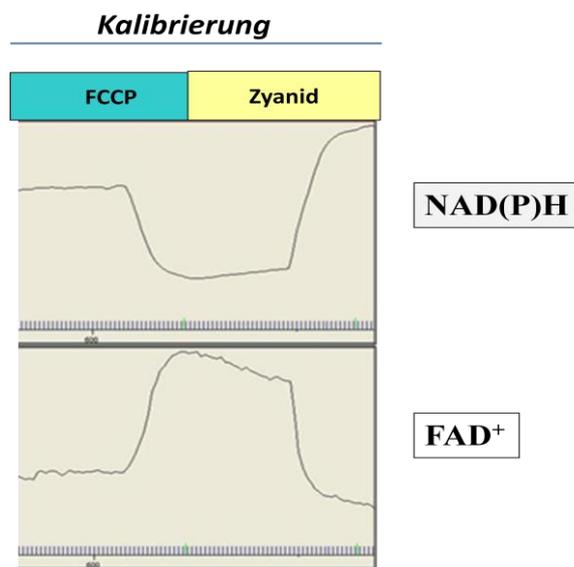


Abbildung 12: Exemplarische Kalibrierung des NAD(P)H und FAD⁺-Messsignales am Ende der Messung. Am Ende jeder Messung von NAD(P)H und FAD⁺ wurde FCCP eingewaschen und eine vollständige Oxidation der Redoxäquivalente abgewartet (100% NAD(P)⁺, 0% NAD(P)H; 100% FAD⁺, 0% FADH₂) sichtbar an einem stabilen Plateau der NAD(P)H und FAD⁺-Signale. Anschließend wurde Zyanid (HCN) hinzugegeben, um eine vollständige Reduktion der Redoxäquivalente zu erreichen. Anhand dieser Ergebnisse wurde bei der Auswertung eine Kalibrierung der Messsignale vorgenommen.

Begonnen wurde jeweils mit dem Einwaschen Na^+ -freier Lösung (0mmol/l). Daraufhin wurde die Na^+ -Konzentration sukzessiv bis auf 145 mmol/l erhöht. Es wurde jeweils nach Zugabe von Na^+ -Lösung das Erreichen eines stabilen Plateaus des Messsignales abgewartet, bevor die nächst höhere Na^+ -Konzentration eingewaschen wurde. Anhand der Eichkurve (nach Messung der Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380nm wurde die 340/380-*Ratio* berechnet und gegen die $[\text{Na}^+]_i$ aufgetragen) wurde aus den Messdaten die $[\text{Na}^+]_i$ berechnet.

Konzentrationen der Na^+ -Lösungen

Substanz	0mM	10 mM	20mM	40mM	145mM
Gramicidin	2 μM				
Monensin	40 μM				
Strophanthidin	100 μM				
KCl	30mM	27,9mM	25,9mM	21,7mM	
K-Gluconat	115mM	107,1mM	99,1mM	83,3mM	
Hepes	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
EGTA	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM
NaCl		2,1mM	4,1mM	8,3mM	30mM
Na-Gluconat		7,9mM	15,9mM	31,7mM	115mM

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen zur Kalibrierung des SBFI-Signals.

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen Indo-1 zusammen mit TMRM⁺ war eine Kalibrierung am Ende der Messung nicht notwendig. Indo-1 ist ein ratiometrischer Farbstoff, es wurde eine qualitative Analyse der Veränderung des Messsignales vorgenommen. Auch bei TMRM⁺ wurden keine absoluten Messwerte, sondern nur die qualitative Veränderung analysiert.

3.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe

In den Versuchen wurden die Autofluoreszenzen von NADH, NADPH und FAD⁺, die mitochondriale Superoxidproduktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX, das intrazelluläre Ca^{2+} mittels Indo-1, das mitochondriale Membranpotential via TMRM⁺ und intrazelluläres freies Na^+ mit SBFI sowie die Sarkomerlänge und deren Veränderung gemessen.

NAD(P)H/FAD⁺-Autofluoreszenzmessungen

Um die primäre Elektronenquelle der Atmungskette, nämlich NADH, welches an Komplex I der Atmungskette seine Elektronen abgibt, und deren relative Veränderungen im Rahmen unseres Messprotokolls aufzuzeichnen, wurde die Autofluoreszenz von NADH benutzt, um die metabolische Regulation der intakten Myozyten im Verlauf zu untersuchen. Mit dieser Methode kann man nicht-invasiv und schnell den mitochondrialen myokardialen NADH-Haushalt beobachten, ohne großen Einfluss auf das zu beobachtende System zu nehmen. NADH absorbiert ultraviolettes Licht bei etwa $\lambda = 340\text{nm}$ und emittiert eine blaue Breitbandfluoreszenz bei etwa $\lambda = 450\text{nm}$. Oxidiertes NADH, also NAD⁺, absorbiert oder fluoresziert bei diesen Wellenlängen nicht signifikant. Im Herzen kommt die blaue Fluoreszenz von gebundenem NADH und reduziertem NADPH (im Weiteren als NAD(P)H bezeichnet) in den Mitochondrien und geringfügig von freiem im Zytosol befindlichem NAD(P)H (Eng et al., 1989). In den Versuchen wurde neben NAD(P)H auch die Autofluoreszenz von FAD⁺ (und damit indirekt FADH₂, einem Elektronendonator an Komplex II der Atmungskette) bestimmt, dessen Autofluoreszenz mit $\lambda = 485\text{nm}$ angeregt wurde. Das Emissionsmaximum von FAD⁺ wurde bei $\lambda = 525\text{nm}$ gemessen, wobei die FADH₂ Fluoreszenz minimal ist. Eine Abschätzung des Oxidations- bzw. Reduktionsstatus der Zelle, also dem „Redoxstatus“, gelingt durch das Teilen der Fluoreszenzintensität von NADH durch die Fluoreszenzintensität von FAD⁺. Der errechnete Wert ist ein sehr sensibler Parameter des Oxidations/Reduktionsstatus der Zelle und verändert sich je nach metabolischem Zustand und der Sauerstoffversorgung. Eine Oxidation des Redoxstatus zeigt erhöhte zelluläre metabolische Aktivität an (Skala & Ramanujam, 2010) im Hinblick auf erhöhten Verbrauch der Redoxäquivalente. Am Ende der Messungen der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ wurden, durch Zugabe des mitochondrialen Entkopplers FCCP, die Myozyten maximal oxidiert (0% NADH, 100% NAD⁺; 100% FAD⁺, 0% FADH₂), bzw. durch den Atmungskettenblocker Zyanid vollständig reduziert (100% NADH, 0% NAD⁺; 0% FAD⁺, 100% FADH₂), sichtbar jeweils durch Ausbildung eines stabilen Plateaus von NAD(P)H bzw. FAD⁺ im Messverlauf. Dies wurde genutzt, um später bei der Auswertung der Daten eine Kalibrierung durchführen zu können.

Messung der Fluoreszenz von MitoSOX:

Als Indikator für die mitochondriale Superoxidproduktion wurde der Farbstoff MitoSOX gewählt, welcher sich selektiv in den Mitochondrien anreichert und dort, wenn von Superoxidradikalen oxidiert, eine rote Fluoreszenz zeigt (Absorptions-/ Emissionsmaxima $\lambda \sim$

510/580nm). Die mitochondriale Atmungskette ist in den meisten Geweben die größte intrazelluläre Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Zur Färbung der Myozyten wurde 1ml Zellsuspension aus dem Wärmeschrank in ein Eppendorfgefäß überführt, für 5 Minuten sedimentieren gelassen, der Überstand verworfen und mit NT_B die Lösung wieder auf 1ml aufgefüllt. Anschließend wurde mittels einer Eppendorfpipette ca. 1µl MitoSOX -Lösung (20µl Pluronic auf 50µg MitoSOX) zugegeben und die Zellen für 27 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde für 3 Minuten sedimentieren gelassen, der Überstand verworfen und NT_B auf 1ml aufgefüllt. Als Positivkontrolle wurde am Ende jeder Messung mit dem Farbstoff MitoSOX Antimycin A (150µM, gelöst in Ethanol) eingewaschen (Abbildung 11). Antimycin A bindet an Komplex III der Atmungskette, speziell an die Cytochrom c-Reduktase, und blockiert dadurch die Elektronenübertragung von Coenzym Q auf Cytochrom c. Der Komplex III der Atmungskette überträgt die Elektronen normalerweise über den intermembranösen Spalt auf Cytochrom c, welches die Elektronen auf Komplex IV überträgt, der wiederum die Elektronen auf Sauerstoff überträgt und Sauerstoff zu Wasser reduziert (Chandel, 2010). Die Komponenten der Atmungskette vor dem Wirkungsort von Antimycin A im Komplex III bleiben reduziert, alle dahinter bleiben oxidiert. Dadurch wird der Verbrauch von Sauerstoff an Komplex IV und die Synthese von ATP im Komplex V gehemmt (Turrens et al., 1985; Turrens et al., 2003) und bei Anwesenheit des Farbstoffes MitoSOX führt die Zugabe von Antimycin A zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals (Mukhopadhyay et al., 2007).

Messung der Fluoreszenz von Indo-1:

Zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde der ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Indo-1, AM verwandt, welcher, um die Zellmembran permeieren zu können, als Acetoxymethylester(AM) vorliegen muss. Wenn Indo-1, AM die Zellmembran permeiert, wird die AM-Gruppe von intrazellulären Esterasen abgespalten, sodass der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Indo-1 gehört zu den Ca²⁺-Indikatoren mit hoher Ca²⁺-Affinität (Paredes et al., 2008). Das Absorptionsmaximum liegt bei 346nm, ungebundenes Indo-1 hat ein Emissionsmaximum bei 485nm, durch die Ca²⁺-Bindung verschiebt sich das Emissionsmaximum auf 410nm (Grynkiewicz et al., 1985). Die Ca²⁺-freie und Ca²⁺-gebundene Form des Fluoreszenzfarbstoffes wurden durch Aufnahme der beiden Emissionsmaxima gemessen (PMT 1 und 2, Abbildung 9) und zueinander ins Verhältnis gesetzt, also die Ratio gebildet; dies ist eine sehr sensitive Methode um Veränderungen der

Ca²⁺-Konzentration aufzuzeichnen. Die Bildung der Ratio reduziert auch Messartefakte durch ungleichmäßige Farbstoffbeladung der Zelle, austreten von Farbstoff aus der Zelle oder Artefakte bedingt durch die Zellkontraktion (Takahashi et al., 1999). Um die Zellen zu färben wurde 1µl Indo-1, AM (4,95µM, in DMSO gelöst) auf 1ml Zellsuspension aus dem Wärmeschrank gegeben. Die Zellen wurden für 15 Minuten inkubiert, sowie 5 Minuten sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde verworfen, mit NT_A die Menge wieder auf 1ml aufgefüllt und anschließend auf die Deckgläschen ausplattiert. Gleichzeitig mit der Messung der Fluoreszenz von Indo-1 wurde auch das mitochondriale Membranpotential bzw. dessen Veränderungen mittels TMRM⁺ gemessen.

Messung der Fluoreszenz von TMRM⁺:

TMRM⁺ ist ein Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, wirkt nicht zytotoxisch und kann die Zellmembran sowie die mitochondriale Membran permeieren. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert der Farbstoff in den negativ geladenen Mitochondrien. Für die Fluoreszenzmessung von TMRM⁺ wurde auf 1ml der murinen kardialen Myozyten 0,25µl (0,025µM) TMRM⁺ gegeben. Die Zellen wurden für 5 Minuten sedimentieren gelassen, der Überstand verworfen und die Suspension mit NT_A auf 1ml aufgefüllt.

Messung der Fluoreszenz von SBFI:

Als Fluoreszenzindikator für intrazelluläres freies Na⁺ wurde SBFI, AM (Natrium bindendes Benzofuran-Isophthalat) benutzt, welcher in Form eines Acetoxymethylesters vorlag und so die Plasmamembran der Zellen permeieren konnte. Im Zytosol wurde der Farbstoff durch unspezifische Esterasen in die freie, fluoreszierende Form umgesetzt. Bei der Messung der Myozyten wurde sich zunutze gemacht, dass erhöhtes Na⁺ die Ratio der Exzitationseffizienz bei 340nm zu der bei 370nm erhöht, bei Aufnahme der Emission bei 505nm (Minta & Tsien, 1989). Zum Färben der Zellen wurde für eine Stockkonzentration von 10mM verwendet, dazu wurden 50µg SBFI in 4,429µl DMSO und 5% Pluronic aufgenommen. Von dieser Stocklösung wurde jeweils 1µl auf 1ml Zellsuspension aus dem Wärmeschrank gegeben und für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten sedimentieren gelassen, der Überstand verworfen und NT_A dazugegeben, sodass wieder ein Volumen von 1ml erreicht wurde. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension für 30 Minuten deesterifizieren gelassen bevor die Zellen gemessen wurden.

3.2.6 Auswertung der Messergebnisse

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Windows Excel und dem Graphikprogramm der Firma GraphPad Software Inc. (GraphPad Prism 5.01). Dazu wurden die Messdaten aus dem Programm IonWizard in Windows Excel übertragen. Bei den Fluoreszenzmessungen wurden alle Ergebnisse mit in die Berechnungen einbezogen, bei den Messungen der Zellverkürzung nur die Daten zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 13). Von jedem dieser Zeitpunkte wurden 3-4 Verkürzungsamplituden in die Auswertung einbezogen, gemittelt und dann zwischen STAT3-KO und WT verglichen.

Die statistische Signifikanz wurde durch eine two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bzw. einem gepaarten oder ungepaarten t-Test ermittelt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung des Mittelwertes ($SEM = \text{Varianz} / \sqrt{n}$; $n = \text{Anzahl der Experimente}$) aus den jeweiligen gemessenen Einzelwerten berechnet und dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsmessungen der myokardialen STAT3-KO und Wildtyp Mäusemyozyten

4.1.1 Zellverkürzungsmessungen

Der Einfluss des STAT3-KO auf die Parameter der elektromechanischen Kopplung bei normaler und erhöhter Arbeitslast wurde mit den zuvor beschriebenen Protokollen (Abbildung 11) im Vergleich zu den WT Mäusemyozyten untersucht. Ein exemplarisches Messfenster des Protokolls NAD(P)H, FAD^+ mit Zellverkürzung, dargestellt mit dem Computerprogramm IonWizard, ist in Abbildung 13 zu sehen.

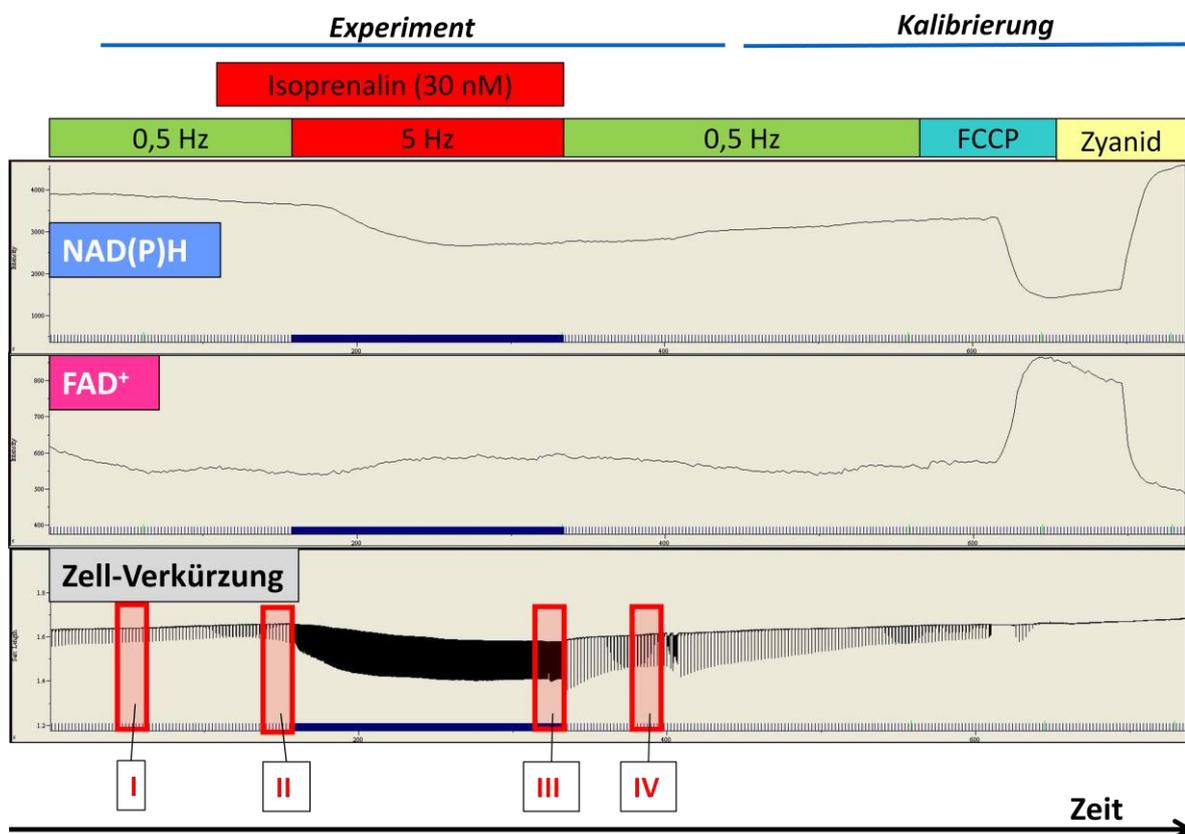


Abbildung 13: Exemplarische Messung von NAD(P)H und FAD^+ sowie der Zellverkürzung mit dem Programm IonWizard. Hier gezeigt ein komplettes Messprotokoll. I-IV ausgewertete Messpunkte der Zellverkürzung.

Eingezeichnet sind die vier Zeitpunkte, welche in unserer Auswertung miteinander verglichen wurden, benannt mit I, II, III und IV. Dabei steht I für die Messzeit nach 60 s bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. II steht für den Zeitpunkt, an dem der β -Adrenozeptor Agonist Isoprenalin (30nM) Wirkung zeigte (sichtbar an einer zunehmenden

Zellverkürzungsamplitude). III wurde 160 Sekunden nach Erhöhung der Feldstimulation, also der Arbeitslast auf 5 Hz unter anhaltender β -adrenerger Stimulation aufgezeichnet. Messpunkt IV liegt bei 60 Sekunden nach Senkung der Stimulationsfrequenz auf 0,5 Hz sowie dem Auswaschen von Isoprenalin aus den Zellen durch Zugabe von Isoprenalin-freier Normaltyrode. In Abbildung 14 sind exemplarische Zellverkürzungsamplituden, errechnet aus den Zellverkürzungsamplitudenmessungen während des Protokolls NAD(P)H und FAD^+ von einer STAT3-KO- bzw. WT-Myozyte zu sehen.

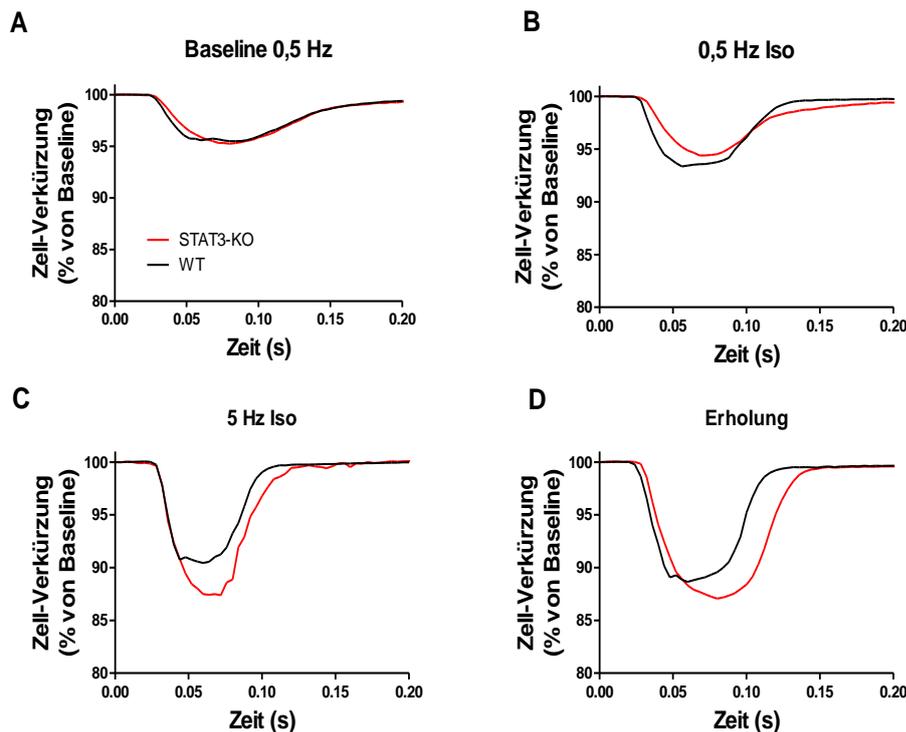


Abbildung 14: Repräsentative Zellverkürzungsamplituden zu den in Abbildung 13 dargestellten Messpunkten im Vergleich einer STAT3-KO- und WT-Myozyte. Dargestellt sind die auf die basale Zelllänge normierten Zellverkürzungen in Prozent. A) Zum Zeitpunkt I. B) Zum Zeitpunkt II. C) Zeitpunkt III. D) Zeitpunkt IV.

Bei den Untersuchungen der Zellverkürzungsparameter wurde jeweils die diastolische und die systolische Sarkomerlänge sowie die fraktionelle Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur 50-prozentigen Sarkomerrelaxation sowie die Zeit bis zur 90-prozentigen Sarkomerrelaxation zwischen WT und STAT3-KO errechnet und verglichen. Dabei zeigte sich, dass es hier keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO im Hinblick auf die diastolische Sarkomerlänge gibt (Abbildung 15A) und sich im Rahmen des Messprotokolls nach dem Einbringen des β -AR Agonisten Isoprenalin in beiden Gruppen die systolische Sarkomerlänge (Abbildung 15B) gleich stark vermindert, die

Zellen beider Gruppen sich unter Isoprenalineinfluss also in gleichem Ausmaß stärker verkürzen.

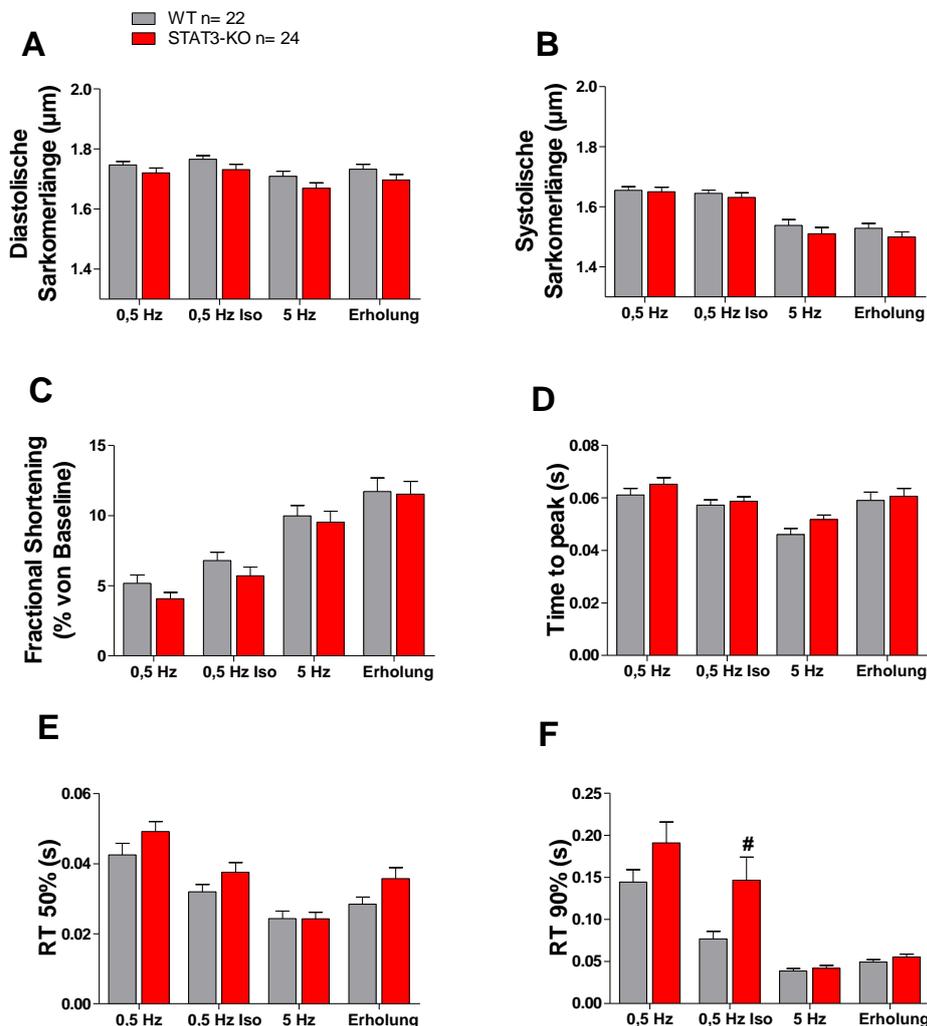


Abbildung 15: Parameter der Zellverkürzung der ersten Versuchsgruppe WT (n=22) und STAT3-KO (n=24) anhand der Sarkomerlänge, gemessen mit dem Protokoll NAD(P)H, FAD⁺, Zellverkürzung. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. **A)** Diastolische Sarkomerlänge. **B)** Systolische Sarkomerlänge. **C)** Fraktionelle Verkürzung in Prozent vom Basalwert. **D)** Time to peak in Sekunden. **E)** Zeit bis zur 50%-igen Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude. **F)** Zeit bis zur 90%-igen Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude. # = p < 0,01 (2way Anova mit Bonferroni Posttest), p im Vergleich zu WT.

Die fraktionelle Zellverkürzung (Abbildung 15C) nimmt im Laufe der Messungen nach Einwaschen von Isoprenalin in beiden Gruppen gleich stark zu. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion (Abbildung 15D) ist in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, genauso wie die Zeit bis zur 50-prozentigen Relaxation (Abbildung 15E). Lediglich die Zeitdauer bis zur 90-prozentigen Relaxation (Abbildung 15F) ist unter basalen Bedingungen in beiden Gruppen gleich ausgeprägt und nach dem Einwaschen von Isoprenalin bei 0,5 Hz bei STAT3-KO statistisch signifikant (p < 0,01) verlängert. STAT3-KO-Myozyten

brauchen unter β -adrenerger Stimulation zur 90-prozentigen Relaxation also länger ($0,077s \pm 0,015$ in WT; $0,147s \pm 0,027$ in STAT3-KO; $p < 0,01$ vs. WT, ANOVA mit Bonferroni posttest) als die WT-Zellen, was sich während 5 Hz und danach nicht mehr als signifikant unterschiedlich zeigte.

4.1.2 Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration

Die $[Ca^{2+}]_c$ wurde mit dem ratiometrischen Farbstoff Indo-1 aufgenommen. Es wurde die diastolische $[Ca^{2+}]_c$, die systolische $[Ca^{2+}]_c$, sowie die Amplituden der zytosolischen Ca^{2+} -Transienten der Myozyten beider Gruppen berechnet und verglichen.

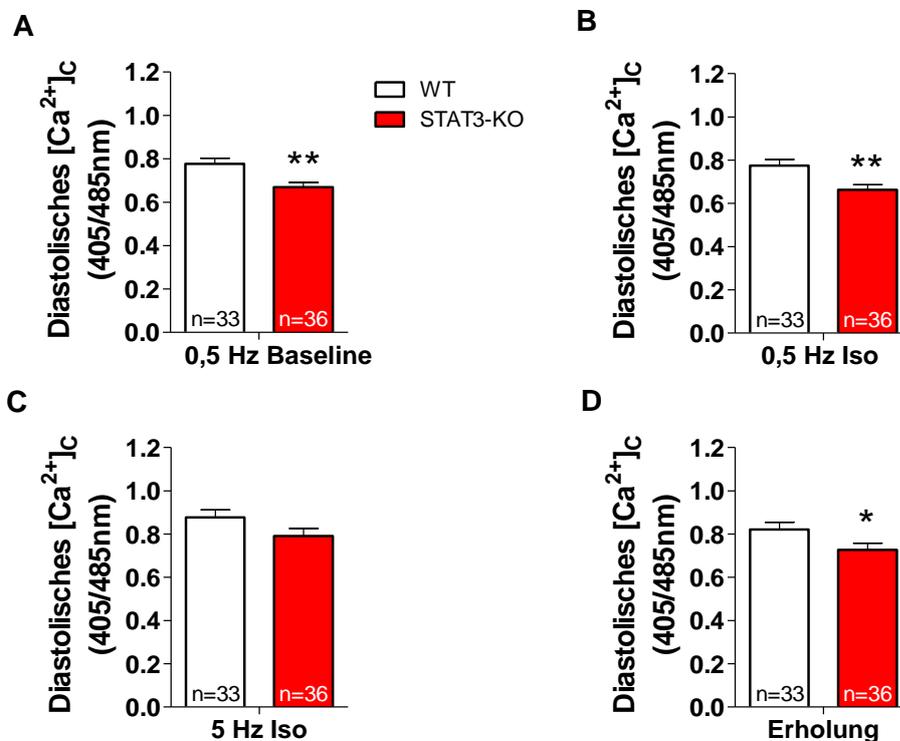


Abbildung 16: Diastolische Parameter der zytosolischen Kalziumkonzentration bei WT-(n=33) und STAT3-KO-Myozyten (n=36). Gemessen mit Indo-1. **A)** Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. **B)** Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz und Iso. **C)** Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei 5 Hz und Iso. **D)** Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Iso. Signifikant verminderte diastolische $[Ca^{2+}]_c$ in STAT3-KO bis auf die 5 Hz-Sequenz. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich mit WT, ungepaarter t-Test.

Hier zeigt sich, dass die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ unter Basalbedingungen ($0,77 \pm 0,026$ in WT vs. $0,669 \pm 0,022$ in STAT3-KO, $p < 0,01$; Abbildung 16A) und nach dem Einwaschen von Isoprenalin ($0,775 \pm 0,028$ in WT; $0,663 \pm 0,023$ in STAT3-KO, $p < 0,01$; Abbildung 16B) sowie nach dem Auswaschen von Isoprenalin ($0,821 \pm 0,033$ in WT; $0,727 \pm 0,031$ in

STAT3-KO, $p < 0,01$; Abbildung 16D) bei STAT3-KO statistisch signifikant niedriger war als in WT Myozyten. Nur während der 5 Hz-Sequenz des Messprotokolls zeigten sich innerhalb beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 16C).

Bei der Bestimmung des systolischen Ca^{2+} , also des $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei maximaler Sarkomerkontraktion, zeigte sich ein signifikant erniedrigter Wert bei STAT3-KO unter Basalbedingungen ($0,737 \pm 0,027$ in WT; $0,852 \pm 0,030$ in STAT3-KO; $p < 0,01$; Abbildung 17A), sowie nach dem Einwaschen von Isoprenalin ($0,860 \pm 0,033$ in WT; $0,732 \pm 0,027$ in STAT3-KO; $p < 0,01$; Abbildung 17B). Während der 5 Hz Stimulation mit Isoprenalin und danach zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr im $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Abbildung 17C, D).

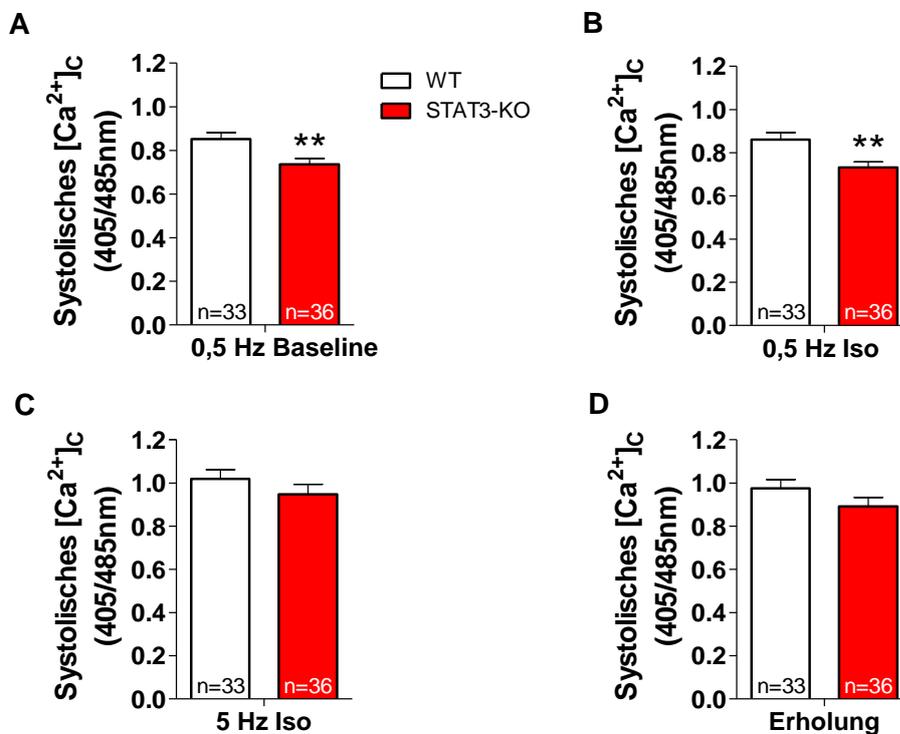


Abbildung 17: Systolische Parameter der zytosolischen Kalziumkonzentration bei WT-(n=33) und STAT3-KO-Myozyten (n=36). Gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1. **A)** Systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz. **B)** Systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz nach Zugabe von Isoprenalin. **C)** Systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei 5 Hz und Isoprenalin. **D)** Systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Isoprenalin. Signifikant verminderte systolische $[\text{Ca}^{2+}]_c$ unter Basalbedingungen und nach Zugabe von Iso bei STAT3-KO. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. ** = $p < 0,01$ im Vergleich mit WT, ungepaarter t-Test.

Bei den Amplituden der $[\text{Ca}^{2+}]_c$, also der Differenzen der systolischen und diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ der Myozyten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen STAT3-KO und WT (Abbildung 18, ungepaarter t-Test).

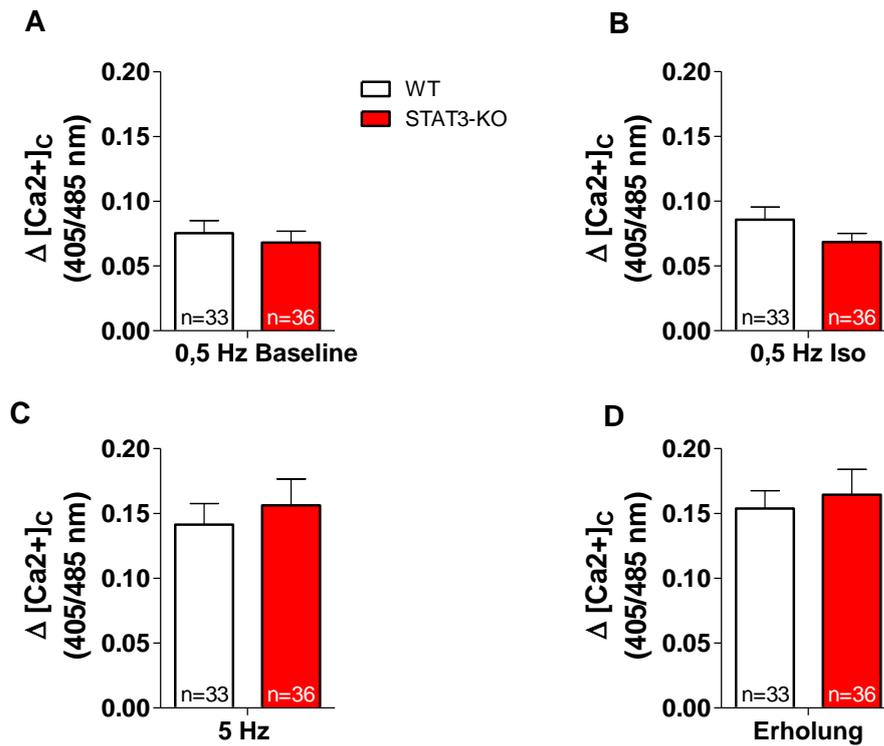


Abbildung 18: Keine signifikanten Unterschiede der Amplituden der zytosolischen Kalziumkonzentration bei WT-(n=33) und STAT3-KO-Myozyten (n=36). Gemessen mit Indo-1. **A)** bei 0,5 Hz. **B)** bei 0,5 Hz nach Zugabe von Iso. **C)** bei 5 Hz mit Iso. **D)** bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Iso. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM, ungepaarter t-Test.

4.1.3 Messungen der intrazellulären Natriumkonzentration

Die Abbildung 19 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes mit dem Farbstoff SBF1 zur Messung von Na^+ (Protokoll SBF1, siehe Abbildung 11). Dabei sind die oberen beiden Spalten Messungen des Farbstoffes mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, darunter ist die Messung der Zellverkürzung zu sehen. Abbildung 20 fasst die Ergebnisse der Messungen der STAT3-KO und WT Myozyten mit SBF1 zusammen.

Die Werte für das $[\text{Na}^+]_i$ bewegen sich in beiden Gruppen zu Beginn der Messung mit 0,5 Hz (WT $14,3 \pm 1,6$ mM; STAT3-KO $14,9 \pm 1,3$ mM) sowie unter Erhöhung der Arbeitslast (WT $14,6 \pm 2,0$ mM; STAT3-KO $15,8 \pm 1,3$ mM) um annähernd gleiche Werte, um dann nach Verminderung der Arbeitslast und dem Auswaschen von Isoprenalin auf wiederum nicht signifikant unterschiedliche niedrigere Werte abzufallen (WT $9,9 \pm 1,8$ mM; STAT3-KO $10,6 \pm 1,3$ mM).

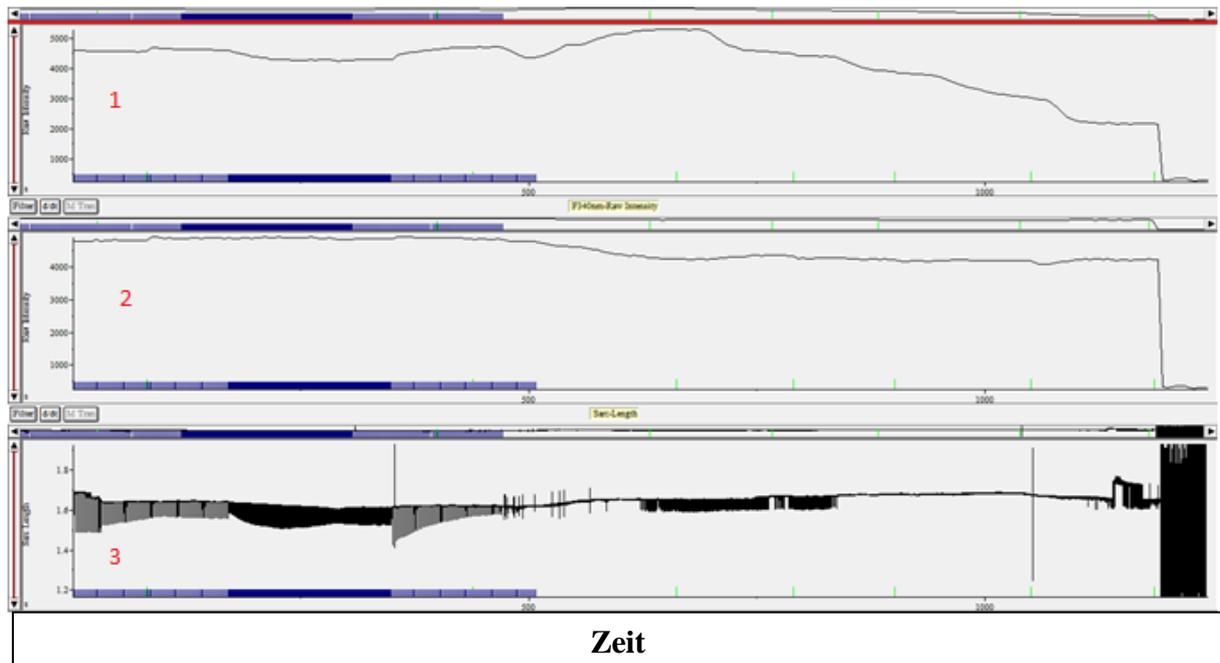


Abbildung 19: Exemplarisches Messprotokoll der intrazellulären Na⁺-Konzentration mit Kalibrierung am Ende der Messung. 1 Exzitation bei 340 nm, Emission bei 505 nm. **2** Exzitation bei 370 nm, Emission bei 505 nm. **3** Aufnahme der Zellverkürzung. Erstellt mit dem Programm IonWizard der Firma IonOptix.

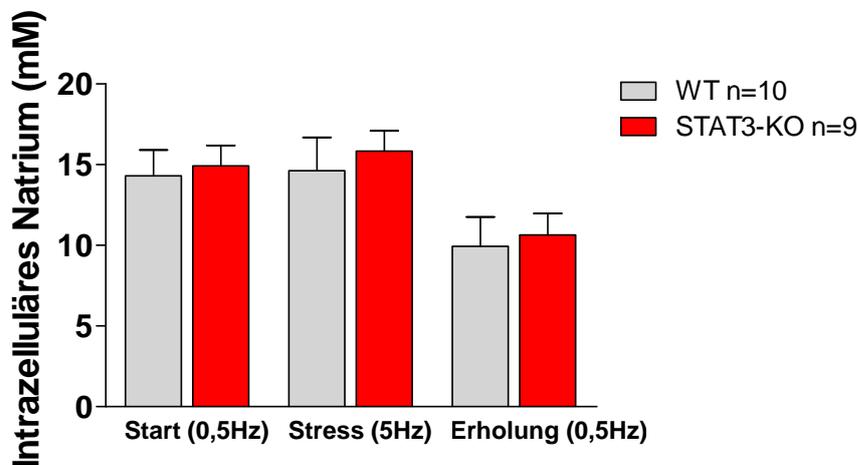


Abbildung 20: Intrazelluläres freies Na⁺ in mM der ersten Versuchsgruppe. STAT3-KO vs. WT gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SBFI und dem Messprotokoll SBFI. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.1.4 Messungen des Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD⁺

Die Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FAD⁺ gemäß dem vorher beschriebenen Protokoll NAD(P)H/FAD⁺ (Abbildung 11) ergaben bei 0,5 Hz Stimulation nahezu gleiche

Werte für NAD(P)H sowie FAD^+ in WT- und STAT3-KO-Myozyten (WT NAD(P)H ca. 66% reduziert, FAD^+ ca. 37% oxidiert. STAT3-KO NAD(P)H ca. 65% reduziert, FAD^+ ca. 38% oxidiert). Jedoch kam es zu einer transienten Oxidation des Redoxstatus nach Arbeitslasterhöhung auf 5 Hz unter gleichzeitiger β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin, sowohl in STAT3- defizienten Myozyten als auch in deren Wildtyp Geschwistertieren (Abbildung 21). Im weiteren Verlauf der 5 Hz-Sequenz kam es aber in beiden Gruppen zu einer anschließenden wiedereinsetzenden Regeneration der Reduktionsäquivalente. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H und FAD^+ zwischen STAT3-KO und WT.

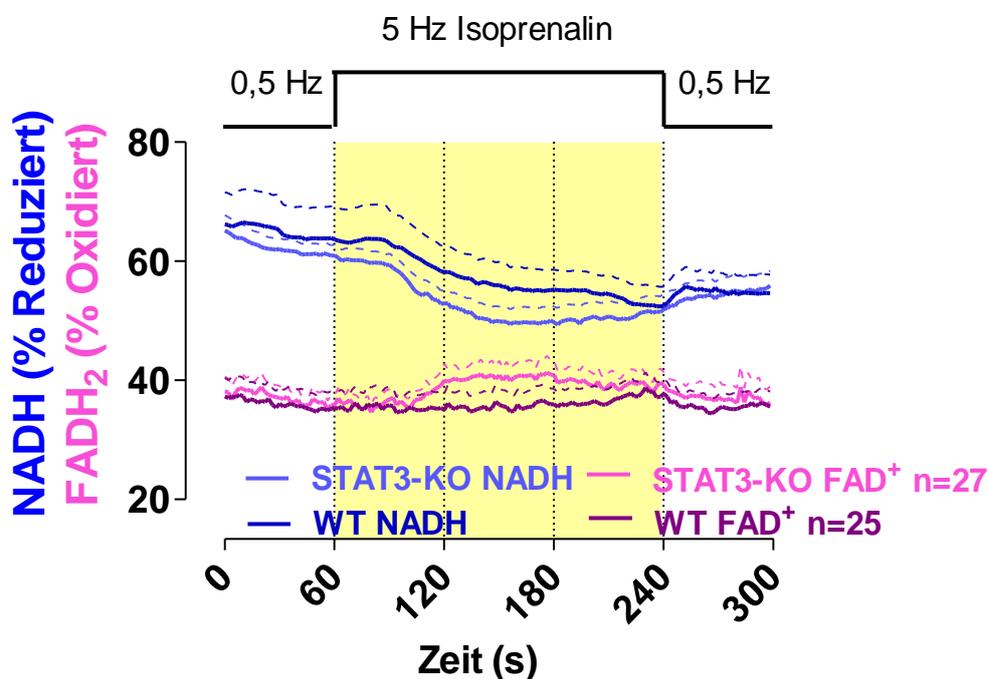


Abbildung 21: Bestimmung Redoxstatus der beiden Versuchsgruppen im Verlauf. Messung der Fluoreszenzen von NAD(P)H und FAD^+ , welche sich gegenläufig verhalten. Angaben in Prozent der am Ende jeder Messung mit FCCP und CN kalibrierten NAD(P)H und FAD^+ Gesamtmenge. Während der Messung kam es nach β -adrenerger Stimulation und dem Anheben der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz zu einer transienten Oxidation des Redoxstatus von NADH und FAD^+ in beiden Gruppen. Im weiteren Verlauf Erholung des Redoxstatus sowohl in STAT3-KO als auch in WT Myozyten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen STAT3-KO und WT.

Das Verhältnis von NAD(P)H zu FAD^+ ist ein sensitiver und ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus, welcher sich, wie in Abbildung 22 gezeigt, unter basalen Bedingungen nicht signifikant in beiden Gruppen unterschied. Hier auch sichtbar die transiente Oxidation des Redoxstatus beider Versuchsgruppen ab ca. Sekunde 80 des

Messprotokolls, also kurz nach dem Anstieg der Arbeitslast auf 5 Hz unter Isoprenalin und anschließender Regeneration der Redoxäquivalente NAD(P)H und FADH₂.

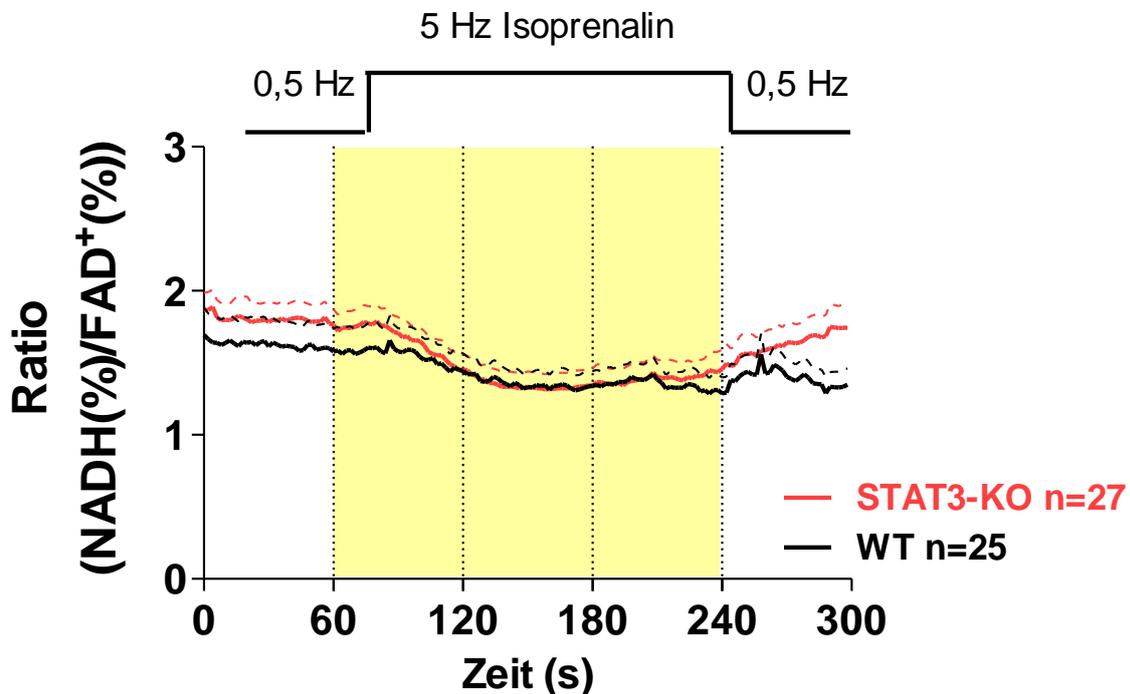


Abbildung 22: Ratiometrische Bestimmung der Verhältnisse der Autofluoreszenzen von NAD(P)H/FAD⁺, welche sich gegenläufig verhalten. Unter basalen Bedingungen bei 0,5 Hz konstante Ratio NADH/FAD⁺ bei STAT3-KO und WT. Oxidation des Redoxstatus im Verlauf des Protokolls bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz und Regeneration der Redoxäquivalente im Verlauf in beiden Gruppen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen STAT3-KO und WT.

4.1.5 Messungen des mitochondrialen Membranpotentials

Das Messergebnis des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM⁺ und dem Messprotokoll TMRM⁺, werden dargestellt als Fluoreszenzintensität (F) zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen auf die unter Basalbedingungen bei 0,5 Hz am Anfang der Messungen gemessene Fluoreszenzintensität (F₀). Die Messungen des mitochondrialen Membranpotentials ergaben, wie in Abbildung 23 zu sehen ist, über den gesamten Verlauf der Messungen in beiden Versuchsgruppen nahezu konstant gleiche Werte; selbst bei Erhöhung der Arbeitslast der Myozyten auf 5 Hz und Gabe des β -AR Agonisten Isoprenalin.

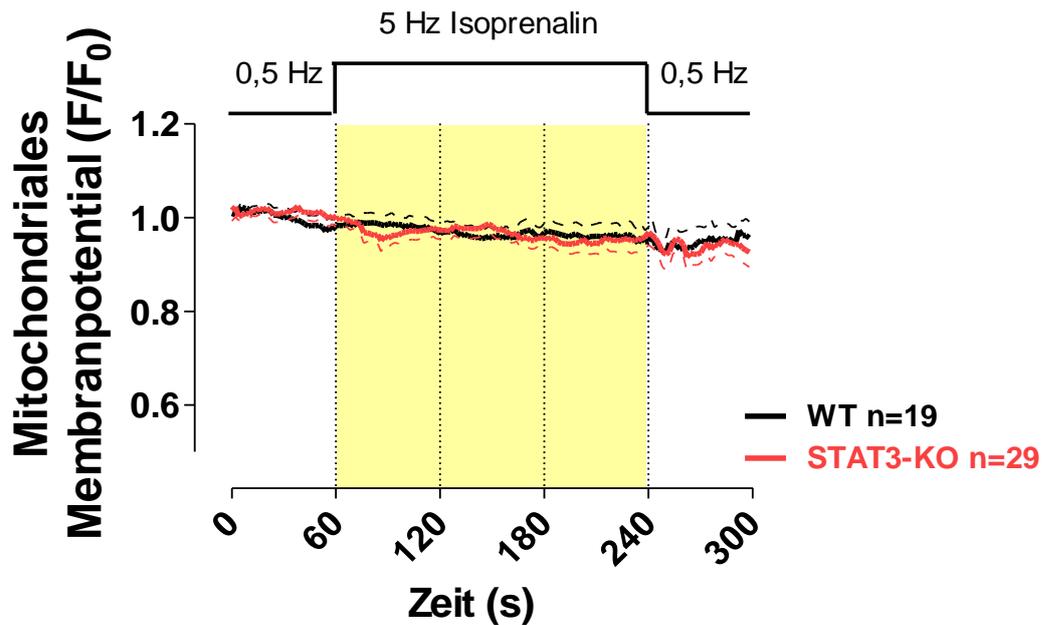


Abbildung 23: Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ mittels TMRM⁺ in STAT3-KO und WT Myozyten über die Zeit als Intensität des Fluoreszenzsignals F durch die basale Fluoreszenz von TMRM⁺ (F_0). Darstellung der Mittelwerte und des SEM. In beiden Gruppen blieb $\Delta\Psi_m$ während der gesamten Messung nahezu konstant und unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

4.1.6 Messungen der mitochondrialen Superoxidproduktion

Mithilfe des Farbstoffes MitoSOX wurden die Auswirkungen des STAT3-KO auf die mitochondriale Superoxidproduktion der Myozyten untersucht. Weiterhin wurden auch unstimulierte Myozyten (0 Hz) auf ihre Superoxidproduktion untersucht. Die Messergebnisse werden dargestellt als Fluoreszenzintensität (F) zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung bezogen auf die unter Basalbedingungen bei 0,5 Hz am Anfang der Messungen gemessene Fluoreszenzintensität (F_0). Dabei zeigte sich, dass die Rate der basalen Superoxidproduktion in alle Zellen nahezu identische Werte annahm und die Rate der Superoxidproduktion in elektrisch stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen erhöht war (Abbildung 24). Bei einer Zunahme der Arbeitslast nahm die Rate der Superoxidproduktion in WT und STAT3-defizienten Myozyten zu, und es kam in der ersten Minute nach Anheben der Stimulationsfrequenz von 0,5 auf 5 Hz zu einer größeren Zunahme der Superoxidproduktion in STAT3-KO Myozyten. In der zweiten und dritten Minute der Stimulation bei 5 Hz glich sich die zuvor erhöhte Rate der Superoxidproduktion der STAT3-KO Myozyten wieder an die Rate der Superoxidproduktion in WT an. Als Positivkontrolle wurde bei jeder Messung am Ende des Messprotokolls Antimycin A als Positivkontrolle in die Messkammer gegeben,

welches zu einer Superoxidproduktion am Komplex III der Atmungskette und zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignales des Farbstoffes MitoSOX führte.

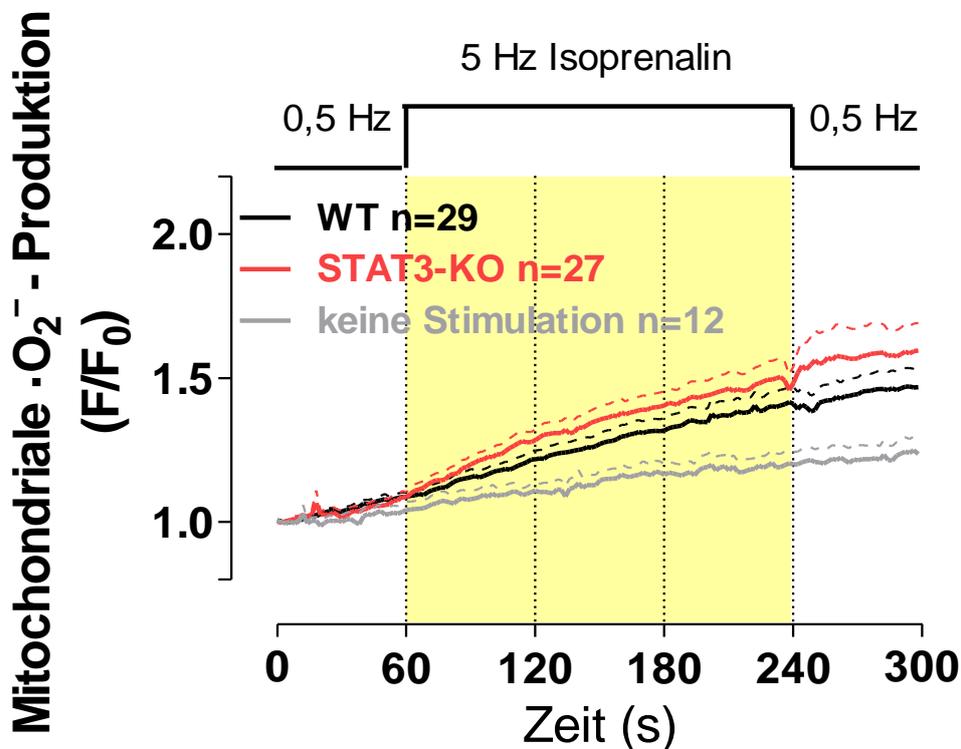


Abbildung 24: Mitochondriale Superoxidproduktion, gemessen mit dem Farbstoff MitoSOX. Vergleich zwischen unstimulierten Myozyten (0 Hz), welche nur Isoprenalin ausgesetzt wurden, sowie STAT3-KO und WT Myozyten. Geringe basale Superoxidproduktion in unstimulierten Myozyten. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Nach Zunahme der Arbeitslast Zunahme der Superoxidproduktion in WT und STAT3-KO, keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO (2way Anova).

Die Darstellung der Ergebnisse als Säulendiagramm mit dem fraktionellen Anteil der Superoxidproduktion als Differentialquotient über die Zeit ($\Delta F / (F_0 \cdot \text{min})$) zeigt Abbildung 25, und dass sich die Rate der $\cdot O_2^-$ -Produktion in STAT3-KO-Myozyten in der ersten Minute nach erhöhter Arbeitslast nahezu verdoppelt (0,5 Hz: $0,09 \pm 0,02$ vs. 5 Hz 1.Minute: $0,20 \pm 0,03$ in STAT3-KO; $p < 0,05$, gepaarter t-Test), was sich aber ab der zweiten Minute nach Erhöhung der Arbeitslast wieder normalisierte. Jedoch zeigte sich noch kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Rate der Superoxidproduktion in WT Myozyten.

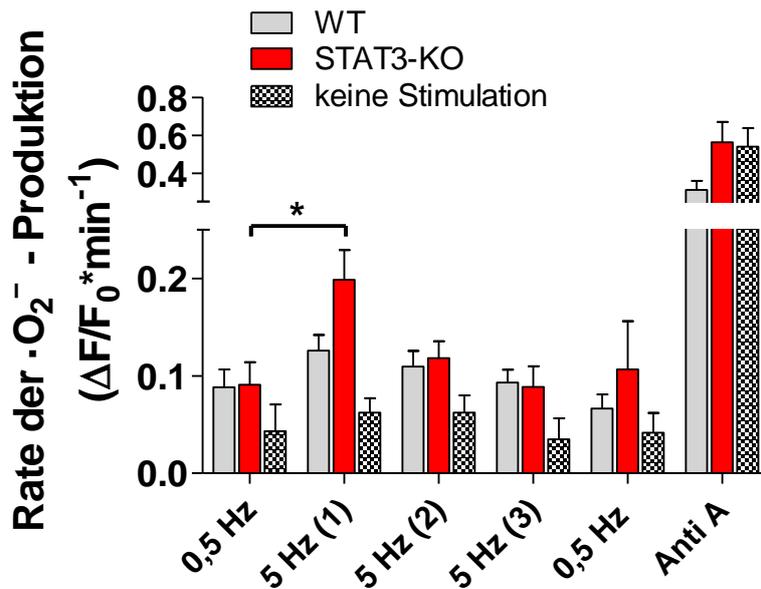


Abbildung 25: Rate der Superoxidproduktion im Verlauf des Protokolls MitoSOX von WT, STAT3-KO und unstimulierten Myozyten. In der ersten Minute nach Arbeitslasterrhöhung auf 5 Hz erhöhte ROS-Produktion bei STAT3-KO im Vergleich zu 0,5Hz, was sich nach einer weiteren Minute jedoch wieder normalisierte. Eingezeichnet sind die Messpunkte bei 0,5 Hz, die drei Minuten unter 5 Hz und nach der Arbeitslastsenkung auf 0,5 Hz. Am Ende der Messung Positivkontrolle des Fluoreszenzsignals mit Antimycin A (Anti A). * = $p < 0,05$; STAT3-KO 0,5 Hz vs. 1. Minute bei 5 Hz; gepaarter t-Test. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte + SEM.

4.2 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsmessungen der myokardialen STAT3-KO und Wildtyp-Mäusemyozyten nach subkutan implantierter Isoprenalinpumpe

Um die Rolle von STAT3 bei kontinuierlicher β -adrenerger Stimulation zu erfassen, implantierten wir mit Isoprenalin befüllte osmotische Minipumpen in WT und STAT3-KO Mäuse für jeweils 24 Stunden vor Myozytenisolation. Dabei wollten wir feststellen, ob sich durch die chronische β -adrenerge Stimulation Veränderungen unserer Messparameter ergeben, welche auf eine Ursache der Herzinsuffizienz bzw. eine veränderte elektromechanische Kopplung bei STAT3-KO hinweisen.

4.2.1 Zellverkürzungsmessungen

Auch bei der zweiten Messgruppe bei welcher 24 Stunden vor der Myozytenisolation eine Isoprenalinpumpe in STAT3-KO und deren WT-Geschwistertiere implantiert wurde, wurden die Parameter der Sarkomerverkürzung der Myozyten gemäß dem zuvor beschriebenen Messaufbau untersucht.

Dabei wurden wiederum die diastolische und systolische Sarkomerlänge, die fraktionelle Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung, die Zeit bis zur 50-prozentigen Sarkomerverkürzung sowie die Zeit zur 90-prozentigen Sarkomerverkürzung zwischen WT und STAT3-KO mit der IonOptix Messanlage und dem Fluoreszenzmikroskop aufgezeichnet und verglichen (Abbildung 26). Hier zeigten sich interessanterweise innerhalb der Gruppe mit implantierter Isoprenalinpumpe (STAT3-KO und WT) bei allen gemessenen und verglichenen Parametern der Zellkinetik keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 26A-F).

Auch die in der ersten Versuchsgruppe unter 0,5 Hz und Iso verlängerte Zeit bis zur 90-prozentigen Sarkomerverkürzung in STAT3-KO (Abbildung 15) zeigte sich nun nicht mehr signifikant unterschiedlich in STAT3-KO und WT.

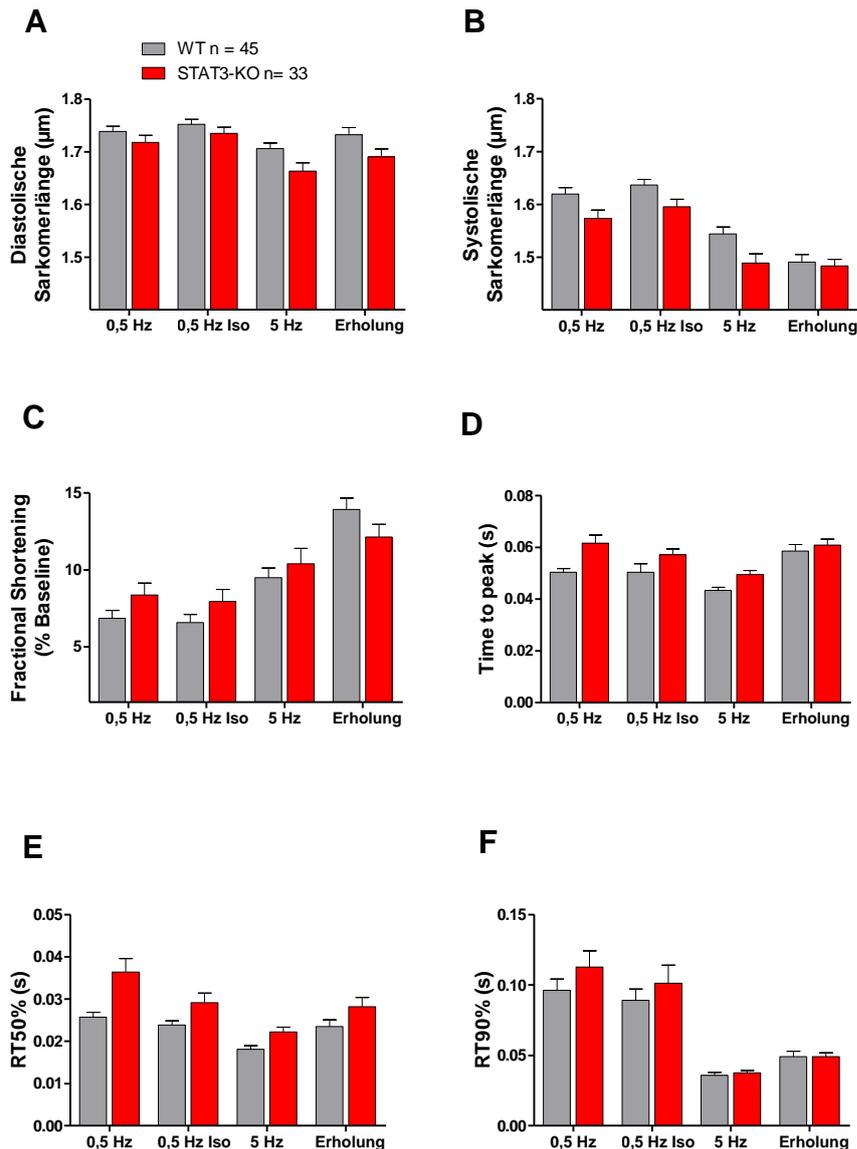


Abbildung 26: Parameter der Sarkomerverkürzung der zweiten Versuchsgruppe (WT und STAT3-KO) nach 24-stündiger Isoprenalinstimulation. A) Diastolische Sarkomerlänge. B) Systolische Sarkomerlänge. C) Fraktionelle Verkürzung in Prozent vom Basalwert. D) Time to peak in Sekunden. E) Zeit bis zur 50% Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude. F) Zeit bis zur 90% Relaxation vom Maximalwert der Verkürzungsamplitude. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte mit SEM. Keine signifikanten Unterschiede WT vs. STAT3-KO.

4.2.2 Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration

Bei den Messungen mittels dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 in den Myozyten der mit dem β -AR Agonisten Isoprenalin vorbehandelten Mäuse wurde das diastolische $[Ca^{2+}]_c$ (Abbildung 27), das systolische $[Ca^{2+}]_c$ (Abbildung 28) sowie die Amplituden der zytosolischen Ca^{2+} -Transienten (Abbildung 29) von STAT3-KO und WT gemessen und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu den nicht mit einer Isoprenalinpumpe vorbehandelten

Tieren (Abbildung 16, Abbildung 27) keine signifikanten Unterschiede bei den mit einer Isoprenalinpumpe vorbehandelten Tieren mehr (STAT3-KO vs WT).

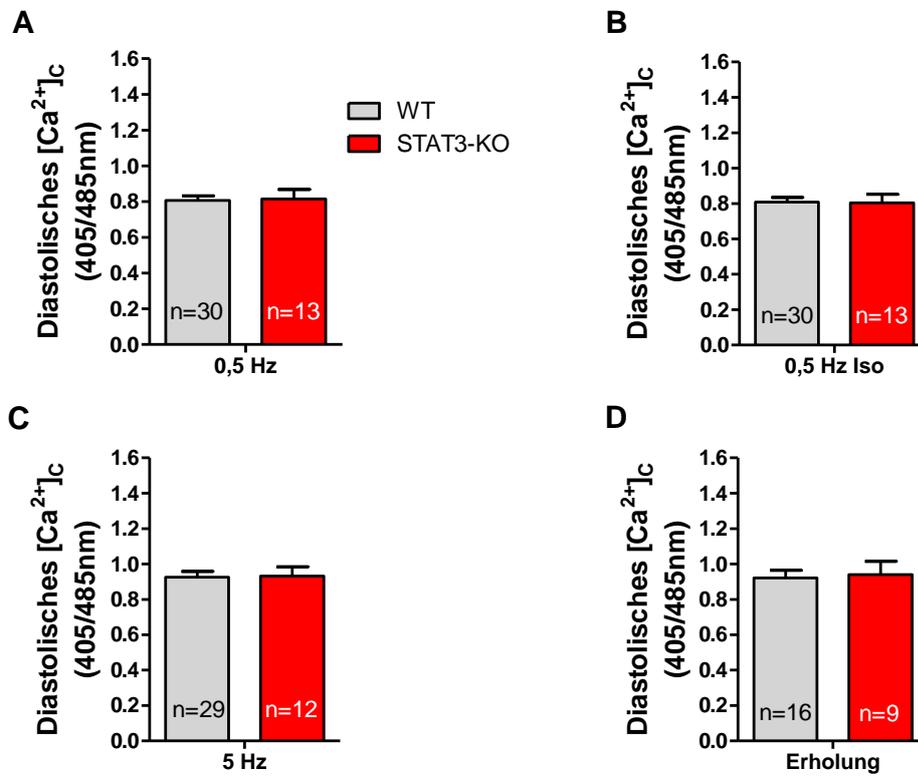


Abbildung 27: Diastolische Parameter der zytosolischen Kalziumkonzentration (WT und STAT3-KO) nach 24-stündiger Isoprenalinstimulation. Gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1. A) Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. B) Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz nach Zugabe von Isoprenalin. C) Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ nach Arbeitslasterhöhung auf 5 Hz mit Isoprenalin D) Diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Isoprenalin. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte mit SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen STAT3-KO und WT.

Weiterhin unterschied sich die gemessene systolische $[Ca^{2+}]_c$ in den Sequenzen 0,5Hz und 0,5Hz mit Isoprenalin zwischen WT und STAT3-KO nach Vorbehandlung mit 24h Isoprenalin nicht mehr signifikant (Abbildung 28A-D). Auch während der „Stressesequenz“ unter 5 Hz Stimulation und der Erholungsphase zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede.

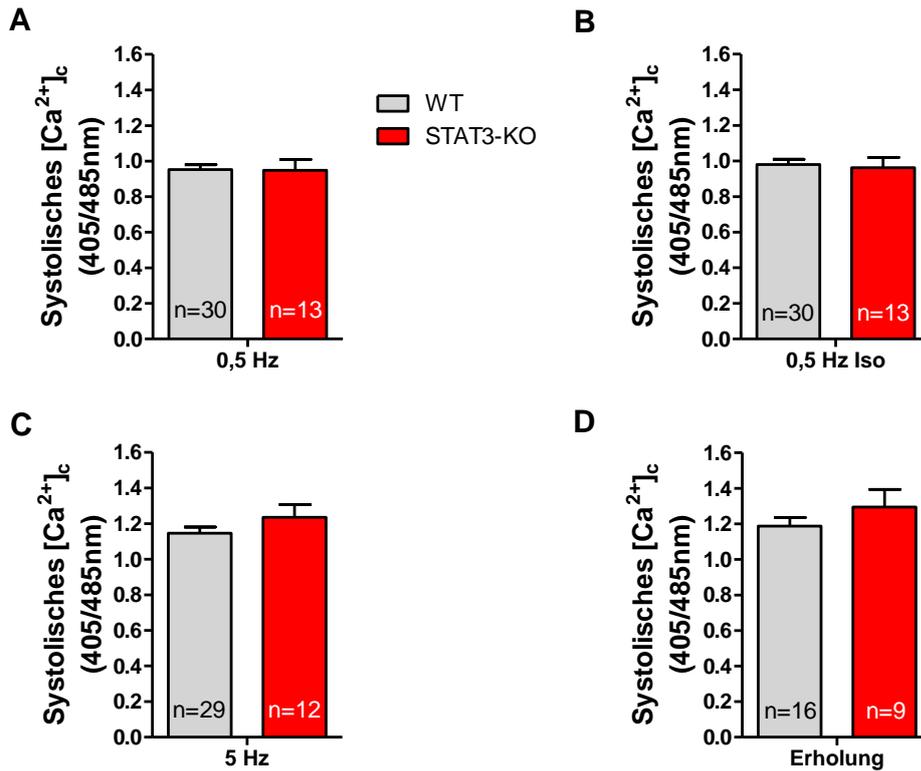


Abbildung 28: Systolische Parameter der zytosolischen Kalziumkonzentration WT und STAT3-KO nach 24-stündiger Isoprenalinstimulation. Gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1. **A)** Systolisches $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz. **B)** Systolisches $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz nach Zugabe von Isoprenalin. **C)** Systolisches $[Ca^{2+}]_c$ bei 5 Hz mit Isoprenalin. **D)** Systolisches $[Ca^{2+}]_c$ bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Isoprenalin. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte + SEM. Keine signifikanten Unterschiede zwischen STAT3-KO und WT.

Im Vergleich der Ca^{2+} -Amplituden nach 24-stündiger β -AR Stimulation zeigte sich nur unter erhöhter Arbeitslast bei 5 Hz eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Amplitude in STAT3-KO ($0,22 \pm 0,02$ WT; $0,30 \pm 0,03$ STAT3-KO, $p = 0,024$), Abbildung 29C. Auch während der Erholungsphase war die Ca^{2+} -Amplitude nur leicht erhöht in STAT3-KO Myozyten im Vergleich zu WT Myozyten, jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus ($0,27 \pm 0,03$ WT; $0,36 \pm 0,03$ STAT3-KO; $p = 0,0543$), siehe Abbildung 29D.

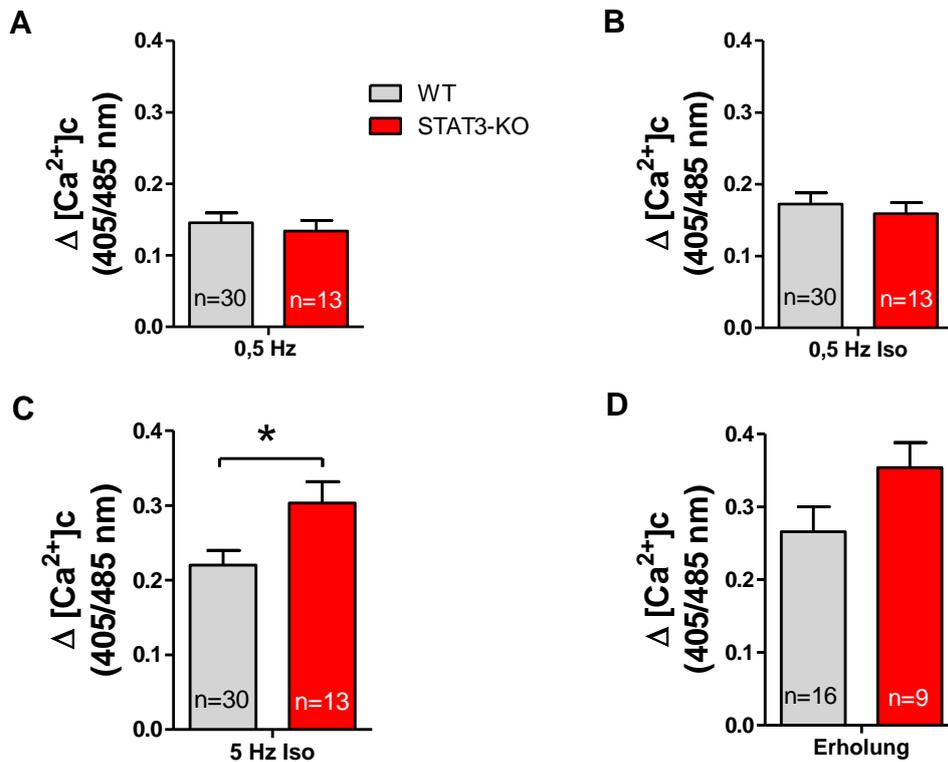


Abbildung 29: Amplituden der zytosolischen Kalziumkonzentration WT vs. STAT3-KO nach 24-stündiger Isoprenalinstimulation. Gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1. **A)** bei 0,5 Hz. **B)** bei 0,5 Hz nach Zugabe von Isoprenalin. **C)** bei 5 Hz mit Isoprenalin. **D)** bei 0,5 Hz und dem Auswaschen von Isoprenalin. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte + SEM. * = $p < 0,05$;

4.2.3 Messungen der intrazellulären Natriumkonzentration

Die Messungen der intrazellulären freien Na^+ -Konzentration der Myozyten mittels SBF1 bei den mit Isoprenalinpumpe vorbehandelten Tieren zeigte, dass $[\text{Na}^+]_i$ in beiden Gruppen zu Beginn der Messung nahezu gleich hoch ist ($16,3 \pm 0,9$ mM WT; $16,9 \pm 1,3$ mM STAT3-KO, Abbildung 30) und unter erhöhter Arbeitslast und Isoprenalineeinfluss in WT im Vergleich zu STAT3-KO signifikant zunahm ($20,1 \pm 0,8$ mM WT; $17,0 \pm 1,1$ mM STAT3-KO; $p < 0,05$). Nach Senkung der Arbeitslast auf 0,5 Hz und dem Auswaschen von Isoprenalin zeigte sich ein Abfall des $[\text{Na}^+]_i$ wieder auf niedrigere, nicht mehr signifikant unterschiedliche Werte in beiden Versuchsgruppen ($16,5 \pm 1,1$ mM WT; $13,7 \pm 1,0$ mM STAT3-KO).

Eine genauere Übersicht über den Verlauf von $[\text{Na}^+]_i$ gibt Abbildung 31. Dabei wird ersichtlich, dass nach Arbeitslasterhöhung auf 5 Hz in beiden Gruppen $[\text{Na}^+]_i$ ansteigt, um in WT Myozyten bis zur Senkung der Arbeitslast auf einem nahezu konstant hohen Niveau zu bleiben.

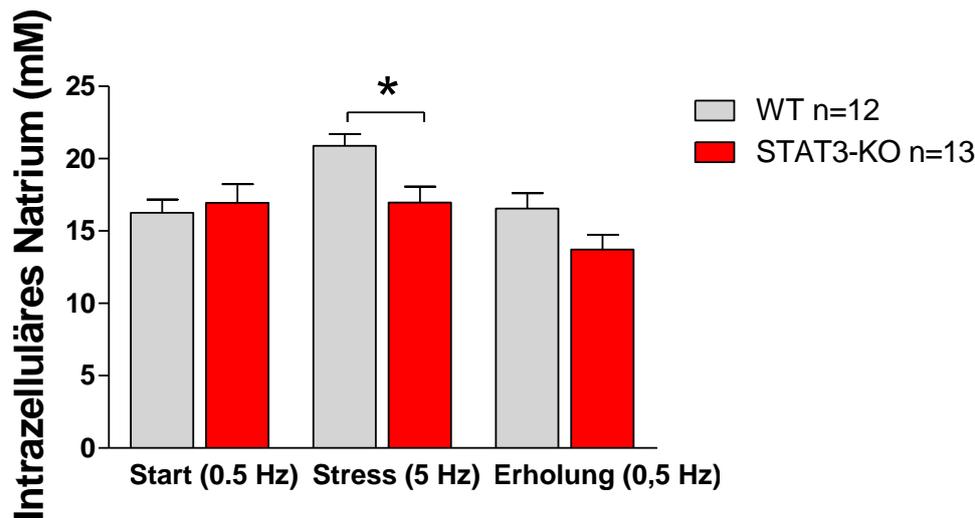


Abbildung 30: Intrazelluläres freies Na^+ in mM nach β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalinpumpe für 24 Stunden. Signifikant erhöhtes $[\text{Na}^+]_i$ in WT während 5 Hz und Isoprenalin im Vergleich zu STAT3-KO. * = $p < 0,05$; 2way Anova mit Bonferroni Posttest. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte mit SEM.

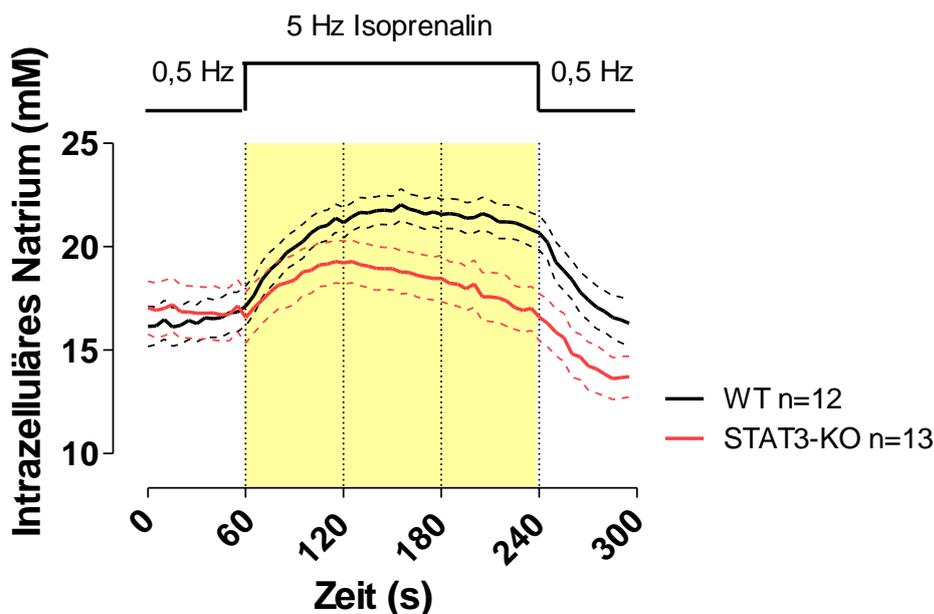


Abbildung 31: $[\text{Na}^+]_i$ im Verlauf des Messprotokolls in mM nach β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalinpumpe für 24h. Darstellung von WT und STAT3-KO in Mittelwerten \pm SEM.

4.2.4 Messungen des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)^+ und $\text{FADH}_2/\text{FAD}^+$

Die Messergebnisse in der Gruppe der Tiere mit über 24 Stunden implantierter Isoprenalinpumpe zeigten, dass der Redoxstatus der Myozyten, gemessen anhand der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD^+ , in beiden Genotypen nach kontinuierlicher β -adrenerger Stimulation in vivo oxidiert ist, als in nicht mit Isoprenalinpumpe

vorbehandelten Tieren (Abbildung 32, zum Vergleich nicht mit Isoprenalin vorbehandelte Tiere Abbildung 21).

Zu Beginn der Messungen konnte man einen etwa gleich stark oxidierten Zustand in STAT3-KO als auch in WT Myozyten feststellen (NADH: WT 37,5% \pm 2,6 vs. STAT3-KO 35,0% \pm 3,6; FAD⁺: WT 58,0% \pm 2,8 vs. STAT3-KO 53,4 \pm 3,0). In WT Myozyten kam es jedoch während β -adrenerger Stimulation zu einer kontinuierlichen Regeneration des NAD(P)H und FADH₂ (umgekehrt proportionaler Verlauf zu FAD⁺) Redoxstatus, während diese Regeneration in STAT3-KO- Myozyten komplett ausblieb.

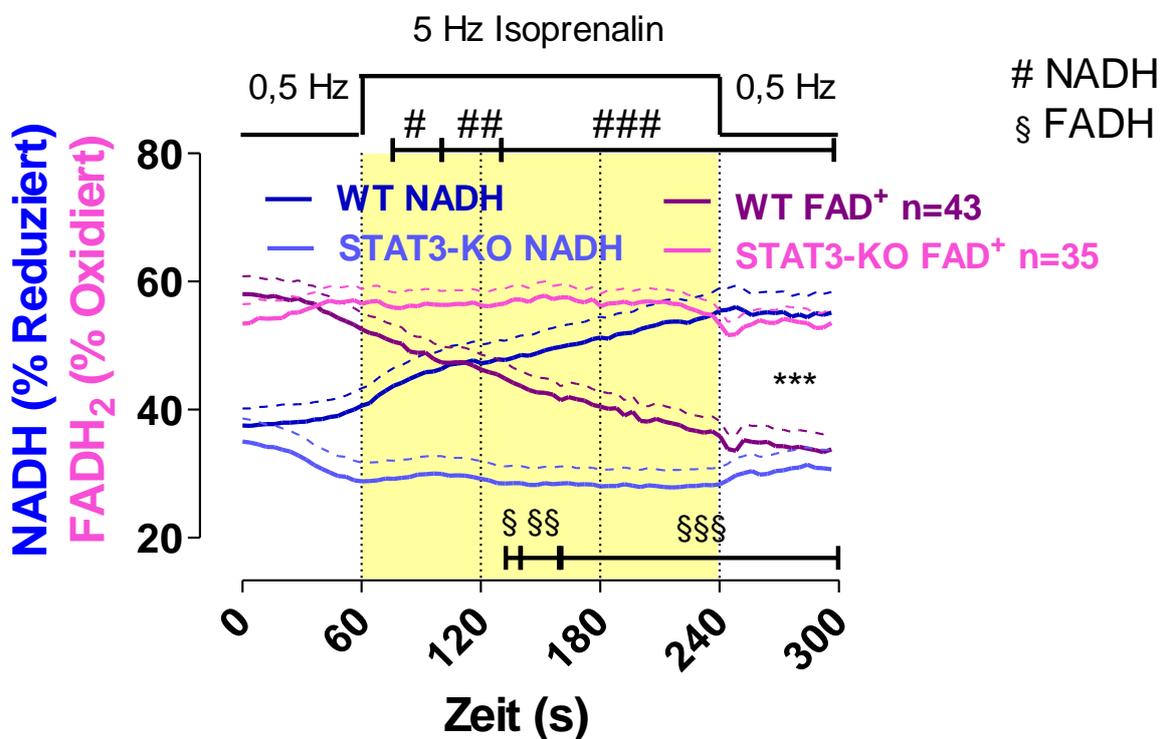


Abbildung 32: Redoxstatus der zweiten Versuchsgruppe anhand der Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ in Mittelwerten + SEM. Oxidierter Redoxzustand in beiden Gruppen zu Beginn, jedoch Erholung der Reduktionsäquivalente bei WT im Verlauf der Messung, was in STAT3-KO Myozyten komplett ausblieb. *** $p < 0,001$, bei FAD⁺ als auch NAD(P)H (2way Anova); # und § = $p < 0,05$, ## und §§ = $p < 0,01$, ### und §§§ = $p < 0,001$ (Bonferroni Posttest) für # NADH, § FAD. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte + SEM.

Dabei unterschieden sich die Messwerte für NAD(P)H in STAT3-KO und WT signifikant voneinander, zwischen Sekunde 76 bis 96 hat der Unterschied ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$; zwischen Sekunde 96 bis 128 ist $p < 0,01$ und zwischen Sekunde 128 bis 300 ist $p < 0,001$ (Bonferroni Posttest). Bei der Messung der Autofluoreszenz von FAD⁺ zeigten sich signifikante Unterschiede im Bonferroni Posttest ab Sekunde 128 mit $p < 0,05$, ab Sekunde

136 bis 152 mit $p < 0,01$ und ab Sekunde 152 bis Ende der Messung mit einer Signifikanz von $p < 0,001$.

NAD(P)H zu FAD^+ zueinander ins Verhältnis gesetzt zeigt, als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus, dass zwischen dem Redoxstatus der WT- und STAT3-KO Myozyten zu Beginn der Messung unter basalen Bedingungen keine signifikante Unterschiede vorliegen. Im Verlauf des Protokolls jedoch erholte sich der Redoxstatus von WT deutlich, was in STAT3-KO ausblieb (Abbildung 33; $p < 0,001$; 2way Anova).

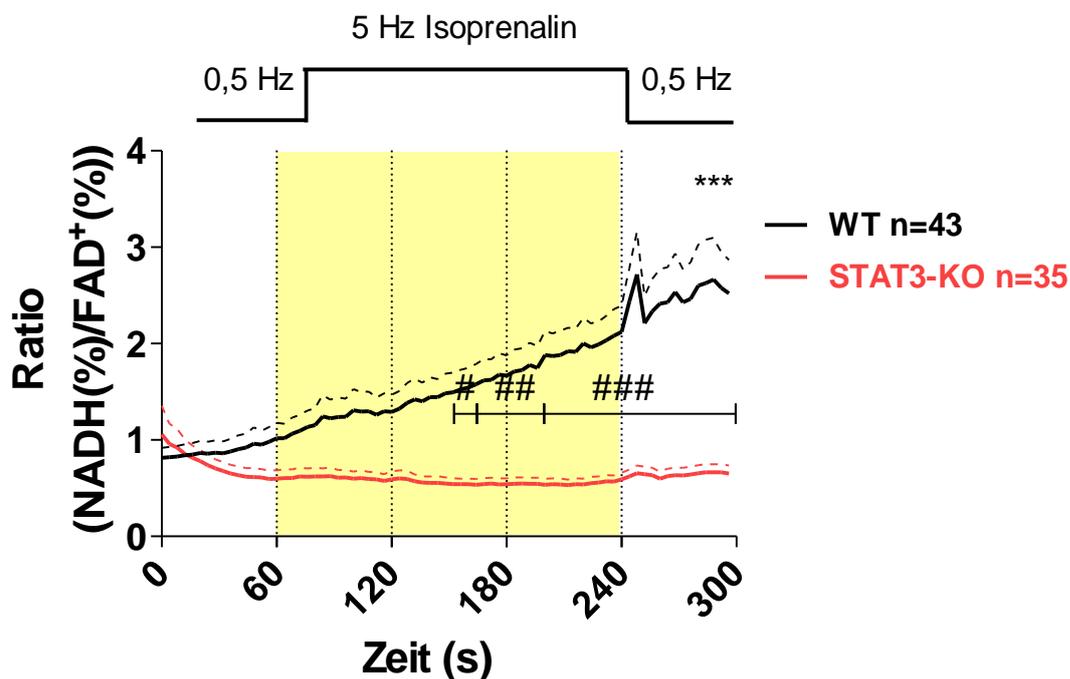


Abbildung 33: Ratiometrische Bestimmung der Verhältnisse der Autofluoreszenzen von NAD(P)H/ FAD^+ bei WT und STAT3-KO Tieren mit 24-stündiger Isoprenalinvorbehandlung. Deutliche Regeneration des Redoxstatus von WT im Verlauf des Protokolls, was in STAT3-KO komplett ausblieb. *** $p < 0,001$ (2way Anova). # = $p < 0,05$; ## = $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$ (Bonferroni Posttest). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte + SEM.

4.2.5 Messungen des mitochondrialen Membranpotentials

Bei der Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels TMRM⁺ zeigten sich auch in der Gruppe der zuvor über 24 Stunden mit Isoprenalin vorbehandelten Tiere keine signifikanten Unterschiede im Verlauf des Messprotokolls im Vergleich zum Ausgangswert, das Membranpotential blieb auch hier über die gesamte Messung nahezu konstant in STAT3-KO und WT (Abbildung 34). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede auch nicht nach Arbeitslasterhöhung oder -senkung.

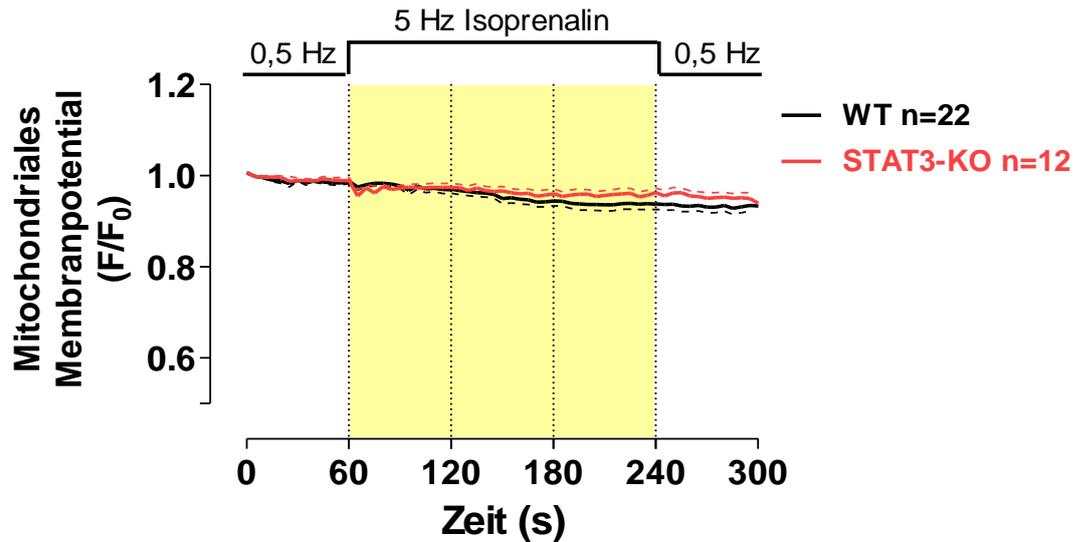


Abbildung 34: Mitochondriales Membranpotential (F/F_0) bei STAT3-KO und WT nach 24-stündiger Isoprenalinvorbehandlung. Gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM⁺. Fluoreszenzintensität zum jeweiligen Zeitpunkt (F) der Messung bezogen auf die unter Basalbedingungen bei 0,5 Hz am Anfang der Messungen gemessene Fluoreszenzintensität (F_0). Das mitochondriale Membranpotential blieb in beiden Gruppen während der gesamten Messung nahezu konstant. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM.

4.2.6 Messungen der mitochondrialen Superoxidproduktion

Die Auswirkungen des STAT3-KO auf die mitochondriale Superoxidproduktion wurde auch an den Myozyten der mit Isoprenalin vorbehandelten Tiere mithilfe des Farbstoffes MitoSOX mittels isolierter muriner Myozyten untersucht. Weiterhin wurde auch hier die Rate der Superoxidproduktion von unstimulierten, nicht mit Isoprenalin vorbehandelten Mausmyozyten, zugrunde gelegt, siehe Abbildung 35. Am Anfang der Messung war die Rate der Superoxidproduktion über die ersten 60 Sekunden in allen drei Messgruppen (WT, STAT3-KO und den unstimulierten Myozyten) nahezu gleich stark ausgeprägt. Im Verlauf des Messprotokolls jedoch stieg die Rate der Superoxidproduktion bei STAT3-KO deutlich an und unterschied sich dann signifikant von der Superoxidproduktion in WT Myozyten ($p < 0,05$, 2way Anova).

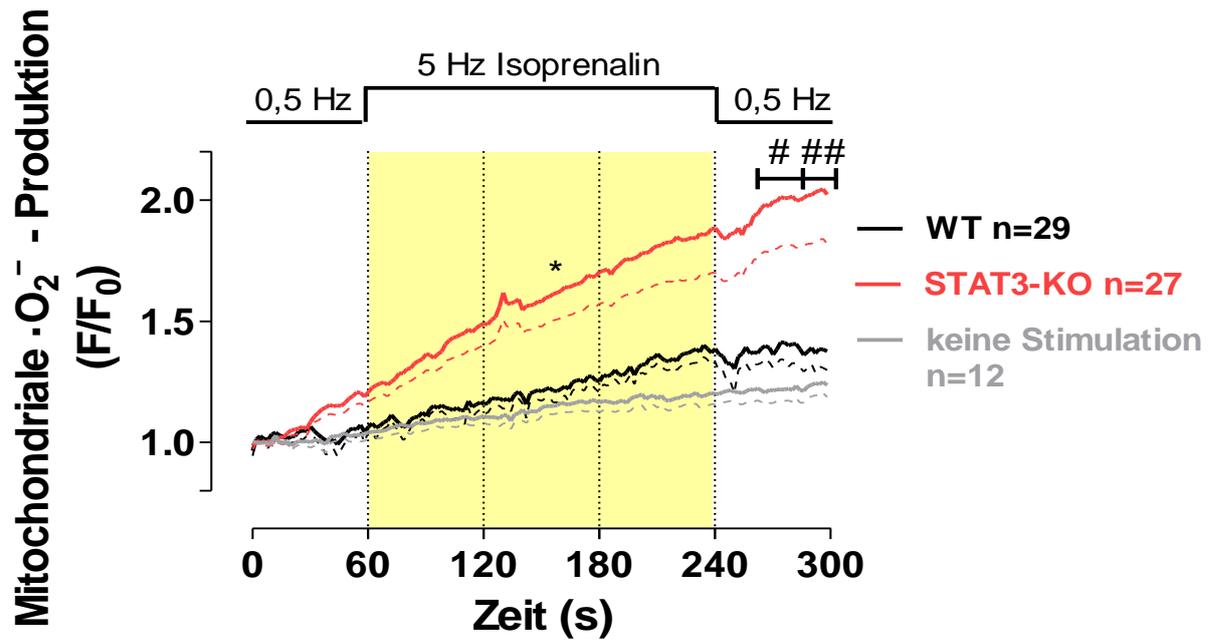


Abbildung 35: Mitochondriale Superoxidproduktion in WT, STAT3-KO und unstimulierten Wildtyp-Zellen. Signifikanter Anstieg der Superoxidproduktion in STAT3-KO während der gesamten Messung im Vergleich zum WT. * $p < 0,05$ WT vs. STAT3-KO (2way Anova). # = $p < 0,05$; ## = $p < 0,01$ (Bonferroni Posttest). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte - SEM.

5. Diskussion

5.1 Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale ATP-Produktion

In der Arbeit von Wegrzyn et al. zeigte sich, dass in isolierten Mitochondrien von STAT3-KO pro-B-Zellen die ADP-induzierte Atmung um 50% und mehr vermindert war. In einer ähnlichen Studie fand man eine etwas geringere Einschränkung der ADP-induzierten Atmung bei Versuchen an isolierten subsarkolemmalen myozytären Mitochondrien, dort jedoch nur bei Verwendung von Komplex I Substraten (Boengler et al., 2010).

Die Erkenntnis dieser enorm defizitären Atmungskapazität zeigte sich jedoch nicht in unseren Experimenten an intakten Kardiomyozyten von STAT3-KO Mäusen im Vergleich zu WT Geschwistertieren. Auch zeigten sich unter ähnlichen Messbedingungen (wie in der Arbeit von Wegrzyn et al. beschrieben) in Versuchen an isolierten myozytären Mitochondrien von STAT3-KO Mäusen in unserem Labor keine signifikante Beeinträchtigung der ADP-induzierten Atmung in STAT3-KO Mitochondrien, weder bei Verwendung von Komplex I, noch von Komplex II Substraten (Experimente an isolierten STAT3-KO Mitochondrien von Dr. rer. nat. Alexander Nickel, nicht gezeigt). Bei den Messungen an intakten Myozyten hätte man bei einer solch großen Einschränkung der Atmungskapazität auch größere Unterschiede in den Zellverkürzungsmessungen erwartet. Das ergibt sich daraus, dass die zwei größten myozytären Energiekonsumenten während des Kontraktionszyklus im Herzen die Ca^{2+} -abhängige Myosin ATPase des kontraktiven Apparates und die Ionen-ATPasen sind, also zum Beispiel die SERCA oder die plasmalemmale Na^+/K^+ -ATPase (Bers, 2008). Hier würden bereits kleinste Änderungen der ATP-Konzentration zu einer großen Einschränkung der SR- Ca^{2+} -Beladung (Balaban, 2009) und somit zu deutlich veränderten Zellverkürzungsparametern führen, was sich weder im akut noch im chronischen Stressprotokoll in unseren Versuchen bei STAT3-KO im Vergleich zu WT Myozyten zeigte. Lediglich die Zeit bis zur 90-prozentigen Relaxation der Myozyten zeigte sich isoliert in der ersten Versuchsgruppe unter 0,5Hz und Isoprenalinstimulation signifikant verlängert in STAT3-KO im Vergleich zum WT.

Dieser Unterschied zu den Studien an isolierten Mitochondrien könnte womöglich daher rühren, dass in den Messungen an isolierten Mitochondrien der Einfluss des von den Mitochondrien im Rahmen der elektromechanischen Kopplung aufgenommene Ca^{2+} in vivo, welches stimulierend auf die Enzyme des Zitratzyklus (McCormack et al., 1990; Balaban,

2009; Denton, 2009) und die F_1/F_0 -ATPase der Atmungskette (Territo et al., 2000) wirkt, nicht genau berücksichtigt werden kann. Eine quantitative Analyse der genauen Proteinkonzentration von STAT3 in den Mitochondrien konnte in diesen Studien auch nicht durchgeführt werden. Für die Validität der Ergebnisse der Messung an intakten Kardiomyozyten im Kontrast zu den Ergebnissen an isolierten Mitochondrien spricht auch, dass sich Mitochondrien im Rahmen des Isolationsprozesses verändern. Zum Beispiel werden dadurch Membranen aufgebrochen, welche sich dann in einem unphysiologischen Maß wieder zusammensetzen können, ein eigentlich physiologischer Prozess in intakten Zellen im Sinne der normalen Fusion und Teilung von Mitochondrien intrazellulär (Chan, 2006). Ein anderer Vorteil der Messungen an intakten Myozyten ist weiterhin, dass die Mitochondrien in ihrem physiologischen Kontext vorliegen und die mitochondriale Struktur und die Konzentrationen der Komponenten des Mediums um die Mitochondrien ähnlicher denen in vivo sind (Gunter & Sheu, 2009). So wird in isolierten Mitochondrien nicht dem Vorhandensein von Mikrodomänen (Sharma et al., 2000; Rizzuto et al., 2009; Giacomello et al., 2010) zwischen Mitochondrien und anderen zellulären Strukturen wie zum Beispiel dem SR Rechnung getragen. Dass diese Mikrodomänen eine wichtige Rolle spielen, zeigt auch die Erkenntnis, dass die maximale $[Ca^{2+}]_c$ während der elektromechanischen Kopplung in Myozyten 1-2 μ M beträgt, die gemessene halbmaximale Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters jedoch höher als 5 μ M ist, die Aktivierung dieses Uniporters also auf höhere Ca^{2+} -Konzentrationen als die durchschnittliche $[Ca^{2+}]_c$ angewiesen ist. Weiterhin kam es bereits in einigen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen, wenn Versuche an isolierten Mitochondrien oder intakten Zellen durchgeführt wurden. So zeigte sich in Studien an isolierten Mitochondrien, dass eine Entkoppelung der Atmungskette zu einer verminderten ROS-Produktion führt (Korshunov et al., 1997; Starkov & Fiskum, 2003), wohingegen sich in intakten Myozyten das Gegenteil zeigte (Kohlhaas et al., 2010).

Auch ist es zum Beispiel schwieriger bei der Untersuchung von insuffizienten Herzmuskelzellen nach der Isolation der Mitochondrien den Einfluss der bei Herzinsuffizienz erhöhten $[Na^+]_i$ und der dadurch verminderten mitochondrialen Ca^{2+} -Akkumulation (Maack et al., 2006) durch die Aktivierung des mitochondrialen Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (Palty et al., 2009) mit in die Untersuchung einfließen zu lassen.

Gegen einen direkten Einfluss von STAT3 auf die Atmungskette sprechen auch die Ergebnisse der protein-biochemische Studie von Phillips et al. (2010), in der sich zeigte, dass

das Verhältnis von STAT3 zu den Komplexen I und II der Atmungskette $1:10^5$ beträgt. Das würde eine direkte Protein-Protein Interaktion und den direkten Einfluss von STAT3 auf die Atmungskette unwahrscheinlich machen, denn nahezu äquimolare Mengen von STAT3 und Komplex I/II wären für eine direkte Protein-Protein Interaktion notwendig (Phillips et al., 2010). Die in dieser Studie errechneten Konzentrationen von STAT3 in Mitochondrien würden sich jedoch mit der durchschnittlichen Expression von Proteinen, welche als Transkriptionsfaktoren fungieren, decken. Deshalb ist es demnach an intakten Myozyten wahrscheinlicher, dass die STAT3-Defizienz auf transkriptioneller Ebene als direkt an Komplex I und II der Atmungskette eingreift und es in vivo im Vergleich zu Kontrollzellen dadurch zu einer leichten Einschränkung im Energiehaushalt der STAT3-defizienten Myozyten kommt.

5.2 Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale Superoxidproduktion

Bei vielen Formen der Herzinsuffizienz konnte eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gezeigt werden. Diese beeinträchtigen die elektromechanische Kopplung und aktivieren maladaptive Signalwege im Herzen. Die Quellen für reaktive Sauerstoffspezies sowie die Regulation der Produktion sind hingegen nicht hinreichend geklärt. Es wurden die NADPH-Oxidase (Maack et al., 2003) sowie Mitochondrien (Ide et al., 1999) als wichtige Quellen für ROS in insuffizientem Myokard beschrieben. Während der oxidativen Phosphorylierung entsteht $\cdot\text{O}_2^-$ an der Atmungskette, welches durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 dismutiert wird. H_2O_2 wird wiederum von Enzymen entgiftet, die allesamt NADPH benötigen (Ying, 2008).

In der ersten Versuchsgruppe (also ohne 24-stündige β -AR Stimulation der Versuchstiere), konnte bei STAT3-KO Myozyten eine transient etwa verdoppelte Rate der Superoxidproduktion in der ersten Minute nach Erhöhung der Arbeitslast gemessen werden, bei WT Myozyten zeigte sich kein signifikant erhöhter Anstieg der Superoxidproduktion als Reaktion auf den Arbeitslastwechsel. Diese Differenz zeigte sich noch viel deutlicher in den Messungen nach 24-stündiger β -AR-Behandlung. Hier wurde in den STAT3-KO Myozyten eine signifikant vermehrte Superoxidproduktion während des gesamten Messprotokolls im Vergleich zu den WT Myozyten gemessen. Dies lässt vermuten, dass eine β -AR Stimulation mit einhergehender erhöhter Arbeitslast, bzw. chronischer Stress, in STAT3-defizienten Tieren zu einem weit größeren $\cdot\text{O}_2^-$ -Vorkommen führt. Unterstützt werden die Ergebnisse von Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, welche zeigen konnten, dass eine STAT3-Defizienz die Zellen für oxidativen Stress anfälliger macht (Barry et al., 2009) bzw. auch vermehrt Superoxidradikale produziert werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007; Sarafian et al., 2010). Auch zeigte sich, dass bei STAT3-KO Zellen mehrere Indikatoren für chronischen oxidativen Stress heraufreguliert sind, zum Beispiel die NADPH Quinon Dehydrogenase (7,6-fach heraufreguliert), die GSH-Peroxidase 7 (2,5-fach heraufreguliert) und die GSH-Synthase (0,3-fach heraufreguliert) (Sarafian et al., 2010). Daneben fand sich auch in nicht kardialen Zellen bei STAT3-Defizienz eine erhöhte ROS-Produktion (Mantel et al., 2012; Sarafian et al., 2010; Zhou et al., 2011).

Es stellt sich die Frage *weshalb* es in STAT3-KO Myozyten nach Steigerung der Arbeitslast und β -AR Stimulation bzw. chronischem Stress zu einem erhöhten Vorliegen von $\cdot\text{O}_2^-$ kommt.

So könnte die Ursache in einem verminderten Abbau von $\cdot\text{O}_2^-$ in STAT3-KO liegen. Ein Grund für die nach Arbeitslaststeigerung erhöht gemessenen $\cdot\text{O}_2^-$ bei STAT3-KO Myozyten könnte die verminderte Induktion antioxidativ wirkender Enzyme sein, die das $\cdot\text{O}_2^-$ dismutieren und unschädlich machen, wenn es zur gesteigerten Produktion an der Atmungskette bei Erhöhung der ATP-Produktion kommt. Tatsächlich ist die Induktion und Expression antioxidativ wirkender Enzyme durch STAT3, wie z.B. Metallothionein-1 und -2 Peroxiredoxinen und der GSH-Reduktase, erniedrigt (Oshima et al., 2005; Sarafin, 2010). Auch die Induktion der Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) ist bei STAT3-Defizienz herabgesetzt (Negoro et al., 2001; Hilfiker-Kleiner et al., 2007; Jung et al., 2009). Die MnSOD, welche $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 dismutiert, spielt eine wichtige Rolle bei der Protektion der Zelle vor oxidativem Stress (Negoro et al., 2001; Holley et al., 2011) und wahrscheinlich bei der Entwicklung der Peripartalen Kardiomyopathie (Hilfiker-Kleiner et al., 2007).

Zum anderen könnte die Ursache des in STAT3-KO signifikant erhöht gemessenen $\cdot\text{O}_2^-$ in einer Verarmung an NADH, NADPH und FADH_2 liegen und somit einer verminderten Bereitstellung von Redoxäquivalenten. Das vermehrt gemessene $\cdot\text{O}_2^-$ in STAT3-KO wäre also nur relativ zu sehen im Sinne einer vergleichbaren Produktion wie bei WT-Tieren, aber mit vermindertem Abbau. Dafür spricht die erniedrigte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme im Verhältnis zum zytosolischen Ca^{2+} . In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zu diesem Projekt haben wir beobachtet, dass es in STAT3-KO Mäusen nach 24-stündiger Isoprenalininfusion zu einer verringerten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme im Verhältnis zu den zytosolischen Ca^{2+} - Transienten kam (patch-clamp Experimente von Dr. Michael Kohlhaas, nicht gezeigt). Dadurch kommt es zur verminderten Stimulation des Zitratzyklus und einer mangelhaften Regeneration von NADH, NADPH und FADH_2 .

Bedeutsam ist der Einfluss der MnSOD wahrscheinlich auch für die Zellprotektion bei Ischämie/Reperfusion. Hier kommt es auch zu einer vermehrten Produktion von ROS, welche in kleiner Menge produziert zur Zellprotektion durch Inhibierung des mitochondrial permeability transition pore (mPTP) bei ischämischer Präkonditionierung beitragen (Baines et al., 1997; Das et al., 1999), in größeren Mengen jedoch zur Apoptose durch Öffnung des mPTP führen. Tatsächlich kommt es nach Ischämie/Reperfusion zur vermehrten Induktion von Apoptose in STAT3-KO Myozyten (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). Der mPTP öffnet sich schneller bei hohen Ca^{2+} - und Radikalkonzentrationen (Assaly et al., 2012). Die vermehrte Superoxidproduktion könnte ein Grund sein, weshalb sich bei STAT3-KO diese Pore

schneller öffnet und es deshalb schneller zur Induktion von Apoptose kommt als in WT-Zellen.

Neben der verminderten Induktion antioxidativer Enzyme in STAT3-KO hat das vermehrte Vorliegen von ROS auch einen Einfluss auf andere zelluläre Proteine, welche indirekt zur Auffüllung von Redoxäquivalenten beitragen. So fanden wir in Versuchen mit isolierten Mitochondrien von STAT3-defizienten Mäusen nach 24-stündiger β -AR Stimulation mittels Isoprenalin im Vergleich zum WT eine tendenziell verminderte Aktivität der mitochondrialen Aconitase ($p=0,087$; Experimente an isolierten STAT3-KO Mitochondrien von Dr. rer. nat. Alexander Nickel, nicht gezeigt). Die Suszeptibilität dieses Enzyms des Zitratzyklus für ROS wurde bereits früher beschrieben (Gardner et al., 1995; Bulteau et al., 2003). Auch die α -Ketoglutaratdehydrogenase und die Succinatdehydrogenase des Zitratzyklus sind als redoxsensibel beschrieben worden (Nulton-Persson & Szweda, 2001; Shi et al., 2011). Bei Herabsetzung der Aktivität und bei vermehrter ROS-Exposition möglicherweise frühzeitigem Abbau dieser für den Zitratzyklus wichtigen Enzyme, welche die Redoxäquivalente NADH, NADPH und $FADH_2$ regenerieren, könnte es in einer Abwärtsspirale zu einer immer weiter verminderten Regeneration von Reduktionsäquivalenten kommen und somit zur sukzessiven Oxidation und Destruktion von Zellbestandteilen.

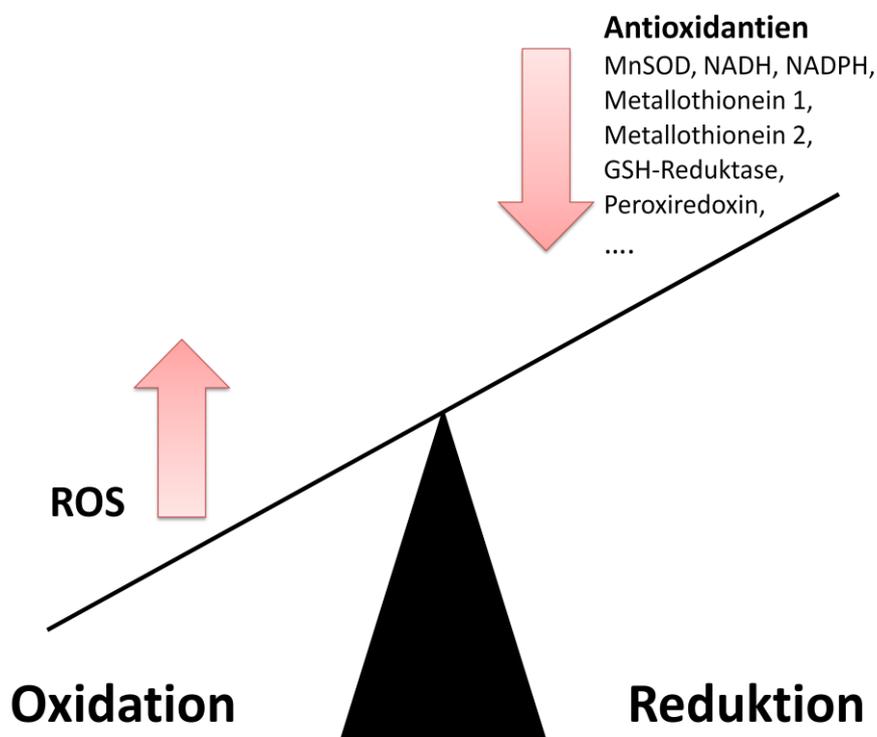


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Imbalance bei STAT3-Defizienz im Redoxsystem der Myozyten.

Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Herabregulation des JAK-STAT-Signaltransduktionswegs (Podewski et al., 2003), auch bei der PPCM konnte man niedrigere Proteinkonzentrationen von STAT3 nachweisen (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Die Beeinträchtigung des zellulären Metabolismus durch eine erhöhte ROS-Produktion wurde bereits mehrfach bei Experimenten an insuffizientem und gealtertem Myokard beschrieben (Singh et al., 1995; Choudhary & Dudley, 2002; Cooper et al., 2013). Dies könnte auch durch die Oxidation von STAT3 an seinen SH-Gruppen bei vermehrtem oxidativen Stress hervorgerufen werden, eine besondere Prädisposition von Sulfhydrylgruppen für Redoxmodifikationen ist bekannt (Kourie, 1998). Diese Veränderung der Sulfhydrylgruppen betrifft dann die Struktur und die Funktion des regulatorischen Proteins und führt schlussendlich zum Funktionsverlust von STAT3, ähnlich einer Deletion, und vergleichbar mit den Bedingungen in unseren Versuchen mit STAT3-KO und einer infolge dessen weiter ansteigenden ROS-Produktion. Dies könnte auch die STAT3-Defizienz im gealterten Herzen erklären, in dem Sinne, dass in einem Herzen, welches längerfristig einer Radikalproduktion ausgesetzt ist und in dem die antioxidativen Mechanismen dadurch selbst in Mitleidenschaft gezogen worden sind, mehr ROS in den Zellen vorliegen und infolge dessen in einer Abwärtsspirale immer mehr zelleigene Strukturen und Proteine oxidiert werden, die dann wiederum nicht mehr antioxidativ tätig sind und sich die Radikalproduktion somit immer weiter verschärft.

Denkbar wäre also, dass durch das signifikant vermehrte Vorliegen von ROS nach β -adrenerger Stimulation es intrazellulär zu einer Beeinflussung des am C-Terminus serinphosphorylierten STAT3 kommen könnte. Die erhöhte Transkriptionsaktivität im Nukleus, die man nach Serinphosphorylierung beobachtet hat, könnte somit vermindert sein. Auch könnte diese Serinphosphorylierungsstelle von STAT3, die darüber hinaus die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien beeinflussen soll (Reich, 2009), durch die Redoxmodifikation in dieser Funktion negativ beeinträchtigt werden. Passend hierzu zeigte sich in neueren Studien die Wichtigkeit der Serinphosphorylierung für die mitochondriale Einflussnahme von STAT3 auf die Komplexe der Atmungskette (Zhang et al., 2013). Auch gibt es Hinweise, dass STAT3 an bestimmten Cysteinresten redoxsensibel ist, welche darüber hinaus seine Aktivierung steuern sollen (Zgheib et al., 2012).

Zusammenfassend könnte es in STAT3-KO in Zeiten höherer β -AR Aktivierung durch die verminderte Produktion der Redoxäquivalente NADH, NADPH und FADH₂ und

Herabregulation antioxidativer Proteine zu einer verstärkten Oxidation empfindlicher Strukturen der Myozyten kommen. Dies könnte die Produktion von ROS weiter erhöhen, da nicht mehr genügend Redoxäquivalente suffizient nachgebildet werden können und den dadurch entstehenden Schaden weiter vergrößern. Dies könnte zu einer Störung der mitochondrialen Energetik und über einen längeren Zeitraum zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen.

5.3 Der Einfluss von STAT3 auf die Redoxäquivalente NAD(P)H und FADH₂

Bekannt ist, dass es unter vermehrter Muskelarbeit zu einer sehr schnellen Oxidation von NADH kommt, was den vermehrten ATP-Verbrauch widerspiegelt. Auch, dass NADH allmählich wieder regeneriert wird, sofern die Erhöhung der Arbeitslast mit einer Zunahme der Amplitude und Frequenz der Ca²⁺-Transienten einhergeht (Brandes & Bers, 1997; Cortassa et al., 2006; Maack et al., 2006).

In der Versuchsgruppe mit dem Akutprotokoll (STAT3-KO vs. WT) gab es keine Unterschiede hinsichtlich dem Verhalten des Redoxstatus der Myozyten. Beide Gruppen starteten das Messprotokoll mit einem ähnlich stark reduzierten bzw. oxidierten Verhältnis der Redoxäquivalente (WT NAD(P)H ca. 66% reduziert, FAD⁺ ca. 37% oxidiert; STAT3-KO NAD(P)H ca. 65% reduziert, FAD⁺ ca. 38% oxidiert). Weiterhin kam es kurz nach Arbeitslasterhöhung zu einer transienten Oxidation der Redoxäquivalente in beiden Gruppen, auch gut sichtbar in der Darstellung des Verhältnisses von NAD(P)H zu FAD⁺. Die Oxidation des Redoxstatus zeigt eine akut erhöhte zelluläre metabolische Aktivität an (Skala & Ramanujam, 2010) im Hinblick auf einen erhöhten Verbrauch der Redoxäquivalente. Die hierdurch angezeigte Abgabe von Elektronen an die Atmungskette hält bei gleichzeitiger ATP-Produktion an der ATPase das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) aufrecht, um ein Versiegen der Treibkraft der ATP Produktion zu verhindern. Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ ist also immens wichtig zur Aufrechterhaltung der ATP-Produktion an der Atmungskette und dissipiert bei Einleitung der Apoptose. Und so blieb auch das während des Protokolls gemessene $\Delta\Psi_m$ während unserer Messungen selbst bei maximaler Arbeitsbelastung in beiden Gruppen nahezu konstant. Im weiteren Verlauf der Messung der NAD(P)H und FAD⁺ Autofluoreszenz kam es unter der anhaltenden 5Hz Stimulation zur gleich stark ausgeprägten Regeneration von NAD(P)H und FADH₂ in beiden Gruppen. Dies änderte sich jedoch grundlegend nach der 24-stündigen Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem β -AR Agonisten Isoprenalin. Hier zeigten sich zu Beginn der Messung der WT und STAT3-KO Myozyten ein nahezu gleich stark ausgeprägter, recht oxidierter Redoxzustand der Zellen (WT NAD(P)H zu Beginn zu ca. 38% reduziert; STAT3-KO zu ca. 35%). Den STAT3-KO Myozyten war es jedoch interessanterweise im Verlauf des Protokolls nicht möglich, die Redoxäquivalente NAD(P)H und FADH₂ adäquat nachzubilden, ganz im Gegensatz zu den WT Myozyten, deren Redoxstatus sich im Verlauf signifikant im Verhältnis zu den STAT3-KO Myozyten erholte. Dabei erholten sich die gemessenen Redoxäquivalente

im WT bis zum Ende des Protokolls auf das gleiche Niveau, welches auch am Ende des Protokolls in der Gruppe der nicht vorbehandelten Tieren gemessen wurde (NAD(P)H: WT nach 24h Isopumpe ca. 54% reduziert; WT der ersten Versuchsgruppe ohne Isoprenalinvorbehandlung ca. 54% reduziert). Weiterhin blieb auch in dieser Versuchsgruppe bei STAT3-KO und WT Myozyten das mitochondriale Membranpotential während der gesamten Messung nahezu konstant.

Die verminderte Adaptation an β -AR Stimulation bei STAT3-KO könnte erstens verursacht sein durch das vermehrte Vorkommen von ROS in STAT3-KO und somit dem gesteigerten Verbrauch von Redoxäquivalenten, sowie der Oxidation und Funktionseinschränkung wichtiger Zitratzyklusenzyme in STAT3-KO Myozyten. Zweitens, durch die in STAT3-KO Myozyten vor kurzem beobachtete verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme (patch-clamp Experimente von Dr. Michael Kohlhaas, nicht gezeigt) und somit verminderte Stimulation der Zitratzyklusenzyme. Infolge dessen könnte es zu einer verminderten Herstellung von Redoxäquivalenten kommen, welche wiederum in die Atmungskette zur Bildung von ATP eingeschleust werden müssten und dann dort fehlen. Dies würde sich auch mit der Beobachtung decken, dass die mitochondriale Akkumulation von Ca^{2+} den Zeitverlauf der NADH-Regeneration widerspiegelt (Kohlhaas & Maack, 2010). Drittens könnte das vermindert gemessene NAD(P)H Ausdruck einer vermehrten Utilisation von NADH zur Herstellung von NADPH über die mitochondriale Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) sein, welches dann bei der vermehrten Superoxidproduktion darauf verwendet wird, den Enzymen, die H_2O_2 dismutieren, die Redoxäquivalente bereitzustellen.

5.4 Der Einfluss von STAT3 auf den Kalziumhaushalt

Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Erniedrigung des systolischen $[Ca^{2+}]_c$, einer diastolisch erhöhten $[Ca^{2+}]_c$, einem verlängerten Abfall des Ca^{2+} -Transienten während des Aktionspotentials, sowie einer verminderten Ca^{2+} -Amplitude bei höherer Frequenz (Pieske et al., 1995). Um nun herauszufinden, ob sich bei STAT3-defizienten Tieren im Rahmen chronisch β -adrenerger Stimulation oder postpartal Defekte der elektromechanischen Kopplung ausbilden, wurde $[Ca^{2+}]_c$ während der Zellverkürzung in STAT3-KO und WT Myozyten bestimmt. β -adrenerge Stimulation führt erwartungsgemäß zu einem Anstieg des zytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} Konzentrationen (Maack et al., 2006). Dieses in die Mitochondrien aufgenommene Ca^{2+} wirkt auf einige Schlüsselenzyme des Zitratzyklus stimulierend (Balaban, 2009), welche Reduktionsäquivalente für die Atmungskette in Form von NADH und $FADH_2$ bereitstellt. Ca^{2+} ist somit eine wichtige Schnittstelle bei wechselndem Energiebedarf und erhöhter Radikalproduktion bei β -adrenerger Stimulation. Untersucht wurde auch die Korrelation zwischen gemessenem zytosolischen Ca^{2+} und eventuellen Unterschieden (STAT3-KO vs. WT) in der Zellverkürzungskinetik. Es zeigte sich in der ersten Versuchsgruppe während der Arbeitslast von 0,5Hz, 0,5Hz mit Iso sowie nach Arbeitslasterniedrigung auf 0,5Hz in STAT3-KO ein signifikant niedrigeres diastolisches $[Ca^{2+}]_c$ im Vergleich zum WT. Auch das systolisch gemessene $[Ca^{2+}]_c$ zeigte sich in STAT3-KO im Vergleich zum WT unter 0,5Hz sowie 0,5Hz mit Iso Bedingungen vermindert, aber nicht mehr nach Erhöhung der Arbeitslast auf 5 Hz und nach anschließender Reduktion der Arbeitslast auf 0,5Hz. Die Amplituden der Transienten von $[Ca^{2+}]_c$ zeigten sich nicht signifikant unterschiedlich. Warum STAT3-KO Myozyten nativ eine niedrigere systolische und diastolische $[Ca^{2+}]_c$ als die WT Myozyten vorweisen, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Nach 24-stündiger β -AR Stimulation bot sich jedoch ein verändertes Bild. Hier war weder das diastolisch noch das systolisch gemessenen $[Ca^{2+}]_c$ signifikant unterschiedlich zwischen WT und STAT3-KO. Nur bei der Bestimmung der Ca^{2+} -Amplituden wurde isoliert in der 5Hz-Sequenz eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Amplitude bei STAT3 im Vergleich zu WT gemessen.

Weiterhin zeigte sich in den Myozytenmessungen nach 24-stündiger Isoprenalininfusion bezogen auf eventuell vorliegende herzinsuffizienztypische Veränderungen lediglich eine Erhöhung der Ca^{2+} -Transienten, wie man sie unter β -adrenerger Stimulation erwarten würde (Lymeropoulos et al., 2013). Auch konnte in den Untersuchungen der

Zellverkürzungskinetiken zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (bis auf eine verlängerte Zeit bis zur 90-prozentigen Relaxation in der ersten Versuchsgruppe unter 0,5Hz Stimulation und Iso) festgestellt werden. Womöglich kommt es in der Frühphase nach β -AR Stimulation bei STAT3-KO noch zu keiner gravierenden Änderungen der $[Ca^{2+}]_c$ wie man sie bei einer chronischen Herzinsuffizienz vorfindet. In Übereinstimmung mit diesen Daten war auch in den in vivo Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Hilfiker-Kleiner zu beobachten, dass sich die Herzinsuffizienz bei den STAT3-KO Tieren noch nicht in den ersten Tagen, sondern erst im Laufe von 2 Wochen ausbildete.

Die gemessenen Unterschiede, also das signifikant erniedrigte $[Ca^{2+}]_c$ in STAT3-KO in der ersten Versuchsgruppe (bei allen Messpunkten bis auf die 5 Hz-Sequenz, welches sich dann aber in der zweiten Versuchsgruppe nach 24-stündiger β -AR Stimulation im gleichen Niveau der WT Myozyten bewegt, also nach β -AR Stimulation relativ gesehen mehr erhöht war im Vergleich zum Vorwert und dem WT), könnte auf eine eventuell niedrigere basale $[Ca^{2+}]_c$ in STAT3-KO hinweisen. Auch könnte es einen Hinweis darauf geben, dass bei β -AR Stimulation das $[Ca^{2+}]_c$ in STAT3-KO stärker ansteigt als in WT.

In kleinen Säugetieren befindet sich die Ca^{2+} -Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums schon bei niedrigen Frequenzen nahe dem Maximalwert und steigt nicht weiter an, selbst wenn die $[Na^+]_i$ und die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ bei höheren Stimulationsfrequenzen ansteigen (Pieske & Houser, 2003). Die verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme, wie sie in STAT3-KO nach 24-stündiger β -AR Stimulation vorliegt (Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, nicht gezeigt), könnte ein möglicher Erklärungsansatz hierfür sein. In Situationen mit erhöhtem metabolischen Stress, was meist mit einem erhöhten $[Ca^{2+}]_c$ assoziiert ist, können Mitochondrien Ca^{2+} schnell aufnehmen und dadurch hohe $[Ca^{2+}]_c$ abpuffern (Nicholls & Budd, 2000). Durch die verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme in STAT3-KO könnte durch diesen fehlenden oder verminderten Puffermechanismus während β -AR Stimulation das relativ zum WT stärker angestiegene $[Ca^{2+}]_c$ in STAT3-KO nach 24-stündiger β -AR Stimulation erklärt werden.

5.5 Der Einfluss von STAT3 auf den Natriumhaushalt

Kleine Veränderungen im Na^+ -Haushalt der Zelle haben großen Einfluss auf das intrazelluläre Ca^{2+} sowie die Kontraktilität, hauptsächlich bedingt durch die Beeinflussung des NCX schon bei leicht erhöhten $[\text{Na}^+]_i$ (Pieske & Houser, 2003). Bei chronischer Herzinsuffizienz ist die zytosolische Na^+ -Konzentration durch einen vergrößerten späten Na^+ -Einstrom erhöht, was einen vermehrten Influx von Ca^{2+} über den NCX und gleichzeitigen Auswärtstransport von Na^+ während der Systole zur Folge hat (Despa et al., 2002). Um zu untersuchen, ob in den noch nativen STAT3-defizienten Myozyten herzinsuffizienzähnliche Veränderungen im Na^+ -Haushalt sichtbar sind, wurde mittels SBFI die $[\text{Na}^+]_i$ in STAT3-KO und WT Myozyten im Rahmen unseres Messprotokolls bestimmt.

Dabei bewegten sich die Werte für die basale $[\text{Na}^+]_i$ in beiden Versuchsgruppen zu Beginn der Messung annähernd um den gleichen Wert (16mmol/l), den man auch in Versuchen an ruhenden Mäusemyozyten mittels SBFI-Messungen gefunden hat (Yao et al., 1998). Auch unter Arbeitslastwechsel und β -AR Stimulation kam es in dieser Zeit zu keiner signifikant unterschiedlichen Veränderung von $[\text{Na}^+]_i$ in beiden Gruppen. In der Gruppe der für 24h mit Isoprenalin vorbehandelten Tieren starteten beide Gruppen mit einem ebenfalls vergleichbaren $[\text{Na}^+]_i$ (auch etwa 16mmol/l). Jedoch stieg während der Messung mit 5Hz und β -AR Stimulation bei den WT Myozyten $[\text{Na}^+]_i$ signifikant im Vergleich zu STAT3-KO an (WT ca. 20mM; STAT3-KO ca. 16mM). Unter erhöhter Stimulationsfrequenz kommt es physiologischerweise zu einer Erhöhung des $[\text{Na}^+]_i$, wobei in vivo eine erhöhte Herzfrequenz das Resultat einer adrenergen Stimulation ist und einher geht mit einer Na^+ -Ausschleusung aus der Zelle über den Na^+/K^+ -Austauscher (Despa & Bers, 2013). Dass in STAT3-KO unter 5Hz $[\text{Na}^+]_i$ nicht ansteigt könnte darauf hindeuten, dass in STAT3-KO womöglich dem NCX mehr Gewicht zukommt um Ca^{2+} in die Zelle zu schleusen und somit mehr Na^+ aus der Zelle bringt oder durch andere Mechanismen Na^+ aus der Zelle gelangt.

5.6 Ausblick

Wir schlussfolgern nun, dass in STAT3-defizienten Mäusen eine verringerte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme eine reduzierte Stimulation des Zitratzyklus nach sich ziehen könnte, was eine mangelhafte Regeneration von NADH und FADH_2 hervorruft. Da der Redoxstatus von NAD(P)H die ROS-Entgiftung entscheidend beeinflusst, könnte dies die vermehrte mitochondriale ROS-Produktion in STAT3-defizienten Myozyten nach chronischer β -AR Stimulation erklären. Als weiteres Indiz für vermehrten oxidativen Stress in STAT3-defizienten Herzen nach chronischer β -AR Stimulation beobachteten wir eine tendenziell verringerte Aktivität des ROS-sensiblen Zitratzyklus Enzyms Aconitase in STAT3-defizienten Herzen. Dies könnte neben anderen Defekten im Zitratzyklus weiter zu mangelhafter Regeneration von NADH beitragen und oxidativen Stress weiter verschärfen. Weiterhin zeigte sich, dass die STAT3-Defizienz keinen relevanten Einfluss auf ADP-induzierte Atmung in isolierten Mitochondrien, aber auch in intakten Kardiomyozyten hat. Bei chronischer Herzinsuffizienz könnte somit die Herabregulation von STAT3 zum Progress der Erkrankung durch erhöhten oxidativen Stress führen.

Es gilt nun in Zukunft weiter zu ergründen, welche genauen Mechanismen zur vermehrten Bildung von ROS bei STAT3-Defizienz führen, um mit neuen Medikamenten an diesen Mechanismen angreifen zu können. In vielen zell- und tierexperimentellen Studien zeigte sich die Inhibition einer mitochondrialen ROS-Produktion mit Antioxidantien als erfolgsversprechend, Studien am Menschen blieben bisher jedoch enttäuschend (Hennekens et al., 1996; Yusuf et al. 2000; Lonn et al., 2002; Rodrigo et al., 2013). Vielleicht ist eine differenziertere Herangehensweise an die unterschiedlichen Quellen von ROS und deren selektive medikamentöse Beeinflussung der Schlüssel zum Erfolg. So benötigt der Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung zum Beispiel während der präkonditionierenden Phase sogar die Freisetzung geringer Mengen ROS durch die Mitochondrien (Vanden et al., 1998; Pain et al., 2000) und es gibt auch ROS-generierende Enzyme, die protektive Funktionen in den Zellen wahrnehmen können, so zum Beispiel die NADPH-Oxidase 4 (Zhang et al., 2010). Vieles deutet darauf hin, dass sich Mitochondrien evolutionär dahingehend entwickelt haben, dass sie die ROS-Produktion auf ein Minimum begrenzen, wenn sie in einem intermediären Redoxzustand, also weder in einem zu stark oxidierten, noch zu stark reduzierten Zustand arbeiten (Aon et al., 2010).

Eine weitere Therapiemöglichkeit der PPCM könnte neben Bromocriptin, aber auch der Herzinsuffizienz an sich, das vielversprechende Peptid SS-31 sein, ein Mitglied der Szeto-Schiller (SS) Peptide, welche selektiv an die innere mitochondriale Membran binden. Das Phospholipid Cardiolipin wird insbesondere in der inneren mitochondrialen Membran exprimiert und spielt eine große Rolle bei der Anordnung der Komponenten der Atmungskette. Cardiolipin ist anfällig für oxidativen Stress, bei Peroxidation von Cardiolipin verliert Cytochrom C seine elektronenübertragende Funktion und fungiert als Peroxidase, was wiederum zu vermehrter ROS-Produktion beiträgt (Szeto, 2014).

Das Peptid SS-31 bindet selektiv an das mitochondriale Phospholipid Cardiolipin und verhindert dadurch, dass Cytochrom C in eine Peroxidase konvertiert wird und erhält so die Elektronentransportfunktion aufrecht. Damit beschützt SS-31 die Struktur der mitochondrialen Cristae, fördert die oxidative Phosphorylierung und verhindert eine erhöhte ROS-Produktion (Szeto, 2014). Also wirkt SS-31 nicht als Radikalfänger, sondern verhindert die vermehrte Bildung von ROS durch die Mitochondrien und könnte als neue Therapiemöglichkeit eventuell den Progress einer Herzinsuffizienz in Zukunft abmildern.

SS-31 befindet sich derzeit unter dem Namen Bendavia in der klinischen Phase II Erprobung bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt, weitere Studien am Menschen nach aussichtsreichen Tierstudien sind auch zur medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz in Planung (Szeto, 2014).

5.7 Zusammenfassung

Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit chronischer Stimulation kardialer β -AR, zu einer Herabregulation des STAT3-Signalweges sowie zu oxidativem Stress. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass eine Herabregulation des STAT3-Signalweges während chronischer β -adrenerger Stimulation zu vermehrter mitochondrialer ROS-Produktion beitragen könnte. Diese beinhalten eine verringerte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme sowie eine unzureichende Regeneration von reduziertem NADH und NADPH während β -adrenerger Stimulation, was die Entgiftung von ROS beeinträchtigt. Da eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion kausal zum Progress der Herzinsuffizienz beiträgt, könnte dies ein möglicher Ansatzpunkt für protektive pharmakologische Strategien sein.

6. Literaturverzeichnis

- 1.) Aaronson DS, Horvath CM (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655
- 2.) AfCS-Protokoll (2002) Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1. <http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi?pid=PP00000125>, zuletzt abgerufen am 24.02.2013
- 3.) Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B (2010) Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta* 1797:865–877
- 4.) Aracena-Parks P, Goonasekera SA, Gilman CP, Dirksen RT, Hidalgo C, Hamilton SL (2006) Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type 1. *J Biol Chem* 281:40354-40368
- 5.) Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M (2004) Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61:115-122
- 6.) Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 111:194-197.
- 7.) Aroundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B (2003) Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circ Res* 93:46-53
- 8.) Assaly R, de Tassigny A, Paradis S, Jacquin S, Berdeaux A, Morin D (2012) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 675:6-14
- 9.) Baines CP, Goto M, Downey JM (1997) Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 29:207-216
- 10.) Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495
- 11.) Balaban RS (2009) Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *J Mol Cell Cardiol* 46:832-841
- 12.) Barry SP, Townsend PA, McCormick J, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A (2009) STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 385:324-329

- 13.) Barry WH (2000) Na(+)-Ca(2+) exchange in failing myocardium: friend or foe? *Circ Res* 87:529-531
- 14.) Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1994) Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476:279-293
- 15.) Beckles DL, Mascareno E, Siddiqui MA (2006) Inhibition of Jak2 phosphorylation attenuates pressure overload cardiac hypertrophy. *Vascul Pharmacol* 45:350-357
- 16.) Becker LC, Ambrosio G (1987) Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 30:23-44
- 17.) Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
- 18.) Bers DM (2006) Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 21:380-387
- 19.) Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23-49
- 20.) Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85:1046-1055
- 21.) Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854
- 22.) Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R (2008) The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther* 120:172-185
- 23.) Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R (2010) Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 105:771-785
- 24.) Booz GW, Day JN, Baker KM (2002) Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34:1443-1453
- 25.) Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006) PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 69:178-185
- 26.) Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45:466-472
- 27.) Brandes R, Bers DM (1997) Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res* 80:82-87

- 28.) Braunwald E, Kloner RA (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 76:1713-1719
- 29.) Bulteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI (2003) Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42:14846-14855
- 30.) Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012) Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res* 111:1091-1106
- 31.) Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:79-99
- 32.) Chandel NS (2010) Mitochondrial complex III: an essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respir Physiol Neurobiol* 174:175-181
- 33.) Chandrasekar B, Mitchell DH, Colston JT, Freeman GL (1999) Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 99:427-433
- 34.) Choudhary G, Dudley SC, Jr. (2002) Heart failure, oxidative stress, and ion channel modulation. *Congest Heart Fail* 8:148-155
- 35.) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311:819-823
- 36.) Cooper LL, Li W, Lu Y, Centracchio J, Terentyeva R, Koren G, Terentyev D (2013) Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca²⁺ handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol* 591:5895-5911
- 37.) Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L (2011) Postconditioning: From the Bench to Bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16(2):117-130
- 38.) Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421
- 39.) Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635
- 40.) Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS (1999) Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 196:59-67
- 41.) Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637
- 42.) Denton RM (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1787:1309-1316

- 43.) De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:336-340
- 44.) Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T (2012) Mitochondrial Ca^{2+} uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca^{2+} peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12986-12991
- 45.) Despa S, Bers DM (2013) Na^{+} transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J Mol Cell Cardiol* 61:2-10
- 46.) Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM (2002) Intracellular Na^{+} concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* 105:2543-2548
- 47.) Duncan SA, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1997) STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn* 208:190-198
- 48.) Eng J, Lynch RM, Balaban RS (1989) Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophys J* 55:621-630
- 49.) Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245:C1-14
- 50.) Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 22:1115-1126
- 51.) Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 270:13399-13405
- 52.) Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, Pozzan T (2010) Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol Cell* 38:280-290
- 53.) Gill JS, McKenna WJ, Camm AJ (1995) Free radicals irreversibly decrease Ca^{2+} currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 292:337-340
- 54.) Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115:500-508
- 55.) Goldhaber JJ, Bridge JH (2009) Loss of intracellular and intercellular synchrony of calcium release in systolic heart failure. *Circ Heart Fail* 2:157-159
- 56.) Goldhaber JJ, Liu E (1994) Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *J Physiol* 477 (Pt 1):135-147

- 57.) Grutzner A, Garcia-Manyes S, Kotter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA (2009) Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J* 97:825-834
- 58.) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
- 59.) Gunter TE, Sheu SS (2009) Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1787:1291-1308
- 60.) Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM (2002) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 55:534-543
- 61.) Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR (2004) Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H841-849
- 62.) Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM (2009) The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 104:189-202
- 63.) Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, Liu J, Li P, Chen X, Shanker S, Ferrajoli A, Keating MJ, Estrov Z (2010) STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood* 115:2852-2863
- 64.) Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999) Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99:641-648
- 65.) Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM (2013) Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 108:359
- 66.) Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1145-1149
- 67.) Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A Mitochondrial (2011) STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res* 109:1302-1308
- 68.) Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, Schmiedl A, Ding Z, Podewski E, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC, Drexler H (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 is

- required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 95:187-195
- 69.) Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Drexler H (2005a) Many good reasons to have STAT3 in the heart. *Pharmacol Ther* 107:131-137
- 70.) Hilfiker-Kleiner D, Limbourg A, Drexler H (2005b) STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth. *Trends Cardiovasc Med* 15:152-157
- 71.) Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, Drexler H (2007) A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589-600
- 72.) Hobai IA, O'Rourke B (2000) Enhanced Ca(2+)-activated Na(+)-Ca(2+) exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res* 87:690-698
- 73.) Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005) Guidelines for therapy of chronic heart failure. *Z Kardiol* 94:488-509
- 74.) Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK (2011) Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci* 12:7114-7162
- 75.) Huser J, Blatter LA, Sheu SS (2000) Mitochondrial calcium in heart cells: beat-to-beat oscillations or slow integration of cytosolic transients? *J Bioenerg Biomembr* 32:27-33
- 76.) Ibanez B, Fuster V, Jimenez-Borreguero J, Badimon JJ (2011) Lethal myocardial reperfusion injury: a necessary evil? *Int J Cardiol* 151:3-11
- 77.) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A (1999) Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85:357-363
- 78.) Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY (2000). ABC of heart failure. *Pathophysiology*. *BMJ* 322:167-70
- 79.) Jacobus WE (1985) Respiratory control and the integration of heart high-energy phosphate metabolism by mitochondrial creatine kinase. *Annu Rev Physiol* 47:707-725
- 80.) Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP (2003) Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 549:513-524
- 81.) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ (2004) Glycogen synthase kinase-3beta

- mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113:1535-1549
- 82.) Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH (2009) Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29:7003-7014
- 83.) Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11:1-14
- 84.) Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res* 82:519-522
- 85.) Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427:360-364
- 86.) Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP, McCabe CH, Braunwald E (1995) Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 91:37-45
- 87.) Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, O'Rourke B, Maack C (2010) Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121:1606-1613
- 88.) Kohlhaas M, Maack C (2010) Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation* 122:2273-2280
- 89.) Kohlhaas M, Maack C (2011) Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 21:69-73
- 90.) Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416:15-18
- 91.) Kukreja RC, Weaver AB, Hess ML (1990) Sarcolemmal Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase: inactivation by neutrophil-derived free radicals and oxidants. *Am J Physiol* 259:H1330-1336
- 92.) Kourie J.I. (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275:C1-C24
- 93.) Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen RA, Liao R, Siwik DA, Colucci WS (2010) Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 48:1182-1187

- 94.) Laskey WK (2005) Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 65:361-367
- 95.) Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662
- 96.) Levy DE, Lee CK (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109:1143-1148
- 97.) Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000) Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H769-779
- 98.) Litwin SE, Zhang D, Bridge JH (2000) Dyssynchronous Ca(2+) sparks in myocytes from infarcted hearts. *Circ Res* 87:1040-1047
- 99.) Liu L, McBride KM, Reich NC (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8150-8155
- 100.) Liu T, O'Rourke B (2008) Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circ Res* 103:279-288
- 101.) Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, Bosch J, Dagenais G, Mann JF, Gerstein HC (2002) Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 25:1919-1927
- 102.) Lukowski R, Weber S, Weinmeister P, Feil S, Feil R (2005) Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum* 11:287-290
- 103.) Lymperopoulos A., Rengo G., Koch W. J. (2013) Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113: 739–753
- 104.) Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108:1567-1574
- 105.) Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B (2006) Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* 99:172-182
- 106.) Maack C, O'Rourke B (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* 102:369-392

- 107.) Maier LS, Bers DM, Pieske B (2000) Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32:2249-2258
- 108.) Mantel C, Messina-Graham S, Moh A, Cooper S, Hangoc G, Fu XY, Broxmeyer HE (2012) Mouse hematopoietic cell-targeted STAT3 deletion: stem/progenitor cell defects, mitochondrial dysfunction, ROS overproduction, and a rapid aging-like phenotype. *Blood* 120:2589-2599
- 109.) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365-376
- 110.) McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70:391-425
- 111.) McMurray JJ, Stewart S (2000). Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*;83(5):596-602
- 112.) McMurray JJ, Pfeffer MA (2005) Heart failure. *Lancet* 365:1877-1889
- 113.) Mertens C, Darnell JE, Jr. (2007) SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* 131:612
- 114.) Meyer M, Keweloh B, Güth K, Holmes JW, Pieske B, Lehnart SE, Just H, Hasenfuss G (1998) Frequency-dependence of myocardial energetics in failing human myocardium as quantified by a new method for the measurement of oxygen consumption in muscle strip preparations. *J Mol Cell Cardiol.* 30(8):1459-70
- 115.) Minta A, Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem* 264(32):19449-57
- 116.) Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M, Cahillane G, Wagerle LC (1989) Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase active sites for ATP, K⁺, Na⁺, and strophanthidin in vitro. *Neurochem Res* 14:845-851
- 117.) Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, Pacher P (2007) Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:203-208
- 118.) Murphy E, Steenbergen C (2007) Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* 69:51-67
- 119.) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136
- 120.) Muth C, Gensichen J, Butzlaff M. (2006) DEGAM Leitlinie Nr. 9, Herzinsuffizienz. Omikron Publ, Düsseldorf

- 121.) Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M, Kusuoka H, Hori M, Kuzuya T, Higashino Y, Fujii K, Minamino T (1995) Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction: retrospective clinical evidence of "preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 25:1076-1083
- 122.) Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H, Takeshita A (2002) Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation* 106:362-367
- 123.) Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2001) Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 104:979-981
- 124.) Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R (2009) Heart Failure: the Commonest Reason for Hospitalization in Germany—Medical and Economic Perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 106(16): 269-75
- 125.) Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80:315-360
- 126.) Noble RL (1943) The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usually fatal. *Am J Physiol*. 138:346
- 127.) Nulton-Persson AC, Szweda LI (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276:23357-23361
- 128.) NVL Chronische Herzinsuffizienz (2012), Version 1.5, http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/pdf/nvl_hi_lang.pdf, abgerufen am 05.01.2013
- 129.) O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E (1999) Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res* 84:562-570
- 130.) Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J (2005) STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res* 65:428-435

- 131.) Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F (1995) Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation* 91:291-297
- 132.) Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM (2000) Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 87:460-466
- 133.) Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvil D, Sekler I (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:436-441
- 134.) Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151
- 135.) Phillips D, Reilley MJ, Aponte AM, Wang G, Boja E, Gucek M, Balaban RS (2010) Stoichiometry of STAT3 and mitochondrial proteins: Implications for the regulation of oxidative phosphorylation by protein-protein interactions. *J Biol Chem* 285:23532-23536
- 136.) Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995) Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92:1169-1178
- 137.) Pieske B, Houser SR (2003) [Na⁺]_i handling in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 57:874-886
- 138.) Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Morawietz H, Lichtenberg A, Wollert KC, Drexler H. (2003) Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 107(6):798-802
- 139.) Rasola A, Bernardi P (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50:222-233
- 140.) Reich NC, Liu L (2006) Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6:602-612
- 141.) Reich NC (2009) STAT3 revs up the powerhouse. *Sci Signal* 2:61
- 142.) Reimer KA, Jennings RB (1979) The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 40:633-644
- 143.) Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T (2000) Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 1:37-47

- 144.) Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P (2009) Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787:1342-1351
- 145.) Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R (2013) Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clinical Science* 124:1–15
- 146.) Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA (2003) Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 5:731-740
- 147.) Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM (2011) Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 50:777-793
- 148.) Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, Sofroniew MV (2010) Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One* 5:e9532
- 149.) Sato N, Kawai T, Sugiyama K, Muromoto R, Imoto S, Sekine Y, Ishida M, Akira S, Matsuda T (2005) Physical and functional interactions between STAT3 and ZIP kinase. *Int Immunol* 17:1543-1552
- 150.) Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D (1995) Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9097-9101
- 151.) Schaefer TS, Sanders LK, Park OK, Nathans D (1997) Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta. *Mol Cell Biol* 17:5307-5316
- 152.) Schindler C, Darnell JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-651
- 153.) Schindler C, Plumlee C (2008) Interferons use the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:311-318
- 154.) Scriven DR, Dan P, Moore ED (2000) Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79:2682-2691.
- 155.) Sharma VK, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu SS (2000) Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J Bioenerg Biomembr* 32:97-104
- 156.) Shi Q, Xu H, Yu H, Zhang N, Ye Y, Estevez AG, Deng H, Gibson GE (2011) Inactivation and reactivation of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 286:17640-17648

- 157.) Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147:77-81
- 158.) Sipido KR, Maes M, Van de Werf F (1997) Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na(+)-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca²⁺ current and reverse-mode Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 81:1034-1044
- 159.) Skala M, Ramanujam N (2010) Multiphoton redox ratio imaging for metabolic monitoring in vivo. *Methods Mol Biol* 594:155-162
- 160.) Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, Sack MN (2004) Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc Res* 63:611-616
- 161.) Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation* 112:2143-2148
- 162.) Starkov AA, Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86:1101-1107
- 163.) Statistisches Bundesamt (ed) (2013a) Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) 2011. Fachserie 12 / Reihe 6.2.1. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
- 164.) Statistisches Bundesamt (ed) (2013b) Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD10), Geschlecht, Altersgruppen. https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;jsessionid=90C043D40312C2A432ECA0530BC7A2D2.tomcat_GO_2_1?operation=ergebnistabelleUmfang&levelindex=3&levelid=1360787868833&downloadname=23631-0003
Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Abgerufen am 13.02.2013
- 165.) Statistisches Bundesamt (ed) (2013c) Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland 2011. Fachserie 12 / Reihe 4. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
- 166.) Stephanou A, Latchman DS (2005) Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23:177-182
- 167.) Stewart S, MacIntyre K, Capewell S, McMurray JJ (2003). Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 89(1):49-53

- 168.) Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H (1994) Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 75:443-453
- 169.) Szeto HH (2014) First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol* 171:2029-2050
- 170.) Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79:1089-1125
- 171.) Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804
- 172.) Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS (2000) Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C423-435
- 173.) Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, Andre-Fouet X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008) Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117:1037-1044
- 174.) Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J (2009) The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 54:1747-1762
- 175.) Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2181-2190
- 176.) Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237:408-414
- 177.) Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344
- 178.) Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:18092-18098
- 179.) Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI,

- Fawcett P, Lesnefsky EJ, Larner AC (2009) Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 323:793-797
- 180.) Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-250
- 181.) Xu KY, Zweier JL, Becker LC (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80:76-81
- 182.) Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279:234-237
- 183.) Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9050-9055
- 184.) Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T (1995) Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 91:1520-1524
- 185.) Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Wang T, Ge YG, Wang HS, Li WM, Xu L, Ni ZH, Liu SH, Zhang L, Jia HM, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2007) Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 19:424-430
- 186.) Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, Bridge JH, Barry WH (1998) Effects of overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger on [Ca²⁺]_i transients in murine ventricular myocytes. *Circ Res* 82:657-665
- 187.) Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB (1993) Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 342:276-277
- 188.) Yellon DM, Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357:1121-1135
- 189.) Ying W (2008) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 10:179-206
- 190.) Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in highrisk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:154-160
- 191.) Zgheib C, Kurdi M, Zouein FA, Gunter BW, Stanley BA, Zgheib J, Romero DG, King SB, Paolocci N, Booz GW (2012) Acyloxy nitroso compounds inhibit LIF signaling in endothelial cells and cardiac myocytes: evidence that STAT3 signaling is redox-sensitive. *PLoS One* 7:e43313

- 192.) Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, Anilkumara N, Yu B, Donga X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM (2010) NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:18121–18126
- 193.) Zhang Q, Raje V, Yakovlev VA, Yacoub A, Szczepanek K, Meier J, Derecka M, Chen Q, Hu Y, Sisler J, Hamed H, Lesnefsky EJ, Valerie K, Dent P, Lerner AC (2013) Mitochondrial localized Stat3 promotes breast cancer growth via phosphorylation of serine 727. *J Biol Chem* 288:31280-31288
- 194.) Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE, Jr. (1999) Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 19:7138-7146
- 195.) Zhou H, Newnum AB, Martin JR, Li P, Nelson MT, Moh A, Fu XY, Yokota H, Li J (2011) Osteoblast/osteocyte-specific inactivation of Stat3 decreases load-driven bone formation and accumulates reactive oxygen species. *Bone* 49:404-411

7. Publikationen/ Danksagung

Eigene Vorträge

Saar JA, Kohlhaas M, Hohl M, Stapel B, Hoch M, von Hardenberg A, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2011): STAT3 controls mitochondrial NAD(P)H redox-state and reactive oxygen species production in response to β -adrenergic stimulation. Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2011; V1133

Saar JA, Kohlhaas M, von Hardenberg A, Hohl M, Stapel B, Hilfiker-Kleiner D, Böhm M, Maack C (2010): Stat3 deficiency induces mitochondrial superoxide generation during transitions of workload in intact cardiac myocytes. Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010; V1196

Abstracts

Kohlhaas M, Nickel A, **Saar JA**, Hohl M, Bogeski I, Kappl I, Hoth M, Stapel B, Hoch M, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2011): STAT3 preserves dynamic control of mitochondrial NAD(P)H redox state to prevent ROS-production after chronic β -adrenergic stimulation in vivo. Annual meeting of the Working Groups on "Myocardial Function" and "Cellular Biology of the Heart", Varenna, Italy, April 15-17, 2011

Kohlhaas M, Nickel A, **Saar JA**, Stapel B, Hohl M, Bogeski I, Kappl R, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2011): STAT3 preserves dynamic control of mitochondrial NAD(P)H redox state to prevent ROS-production after beta-adrenergic stimulation. European Heart Journal 32 (Abstract Supplement), 664, 2011

Kohlhaas M, **Saar JA**, Nickel A, Stapel B, Bogeski I, Hoch M, Kappl R, Hoth M, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2011): STAT3 preserves dynamic control of mitochondrial NAD(P)H redox state to prevent ROS-production after chronic β -adrenergic stimulation in vivo. Clin Res Cardiol 100, Suppl 2, Oktober 2011

Kohlhaas M, Stapel B, **Saar JA**, Hoch M, von Hardenberg A, Hohl M, Böhm M, Maack C, Hilfiker-Kleiner D (2011): STAT3 regulates mitochondrial redox-state of NAD(P)H and reactive oxygen species production in response to beta-adrenergic stimulation. Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland; January 26-29, 2011

Kohlhaas M, **Saar JA**, Stapel B, Hoch M, Hohl M, Böhm M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2011): STAT3 regulates mitochondrial superoxide generation in response to β -adrenergic stimulation. *Biophys J* 100(3):462a-462a

Von Hardenberg A, Kohlhaas M, Nickel A, Hohl M, **Saar JA**, Böhm M, Maack C (2010): NAD-Transhydrogenase regulates mitochondrial formation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Eur Heart J (Supplement)*; Abstract 207

Kohlhaas M, **Saar JA**, von Hardenberg A, Hohl M, Hilfiker-Kleiner D, Maack C (2010): Stat3 is not required for mitochondrial respiration in intact cardiac myocytes. Winter Meeting of the HFA of the ESC, Les Diablerets, Switzerland; January 27-30, 2010

Zeitschriftenbeiträge

Saar JA, Maack C (2014) Hypertensive Kardiopathie und diastolische Herzinsuffizienz – Pathophysiologie, Diagnose, Prognose und Therapie, *Kliniker* 43(3): 144-148

Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen, die mich während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertation unterstützt haben, herzlich bedanken.

Allen voran gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, seine hervorragende Betreuung sowie seine außerordentliche Fähigkeit, Begeisterung für wissenschaftliche Arbeit zu wecken, welche die hier vorgelegte Arbeit erst ermöglicht und meinen Blick für wissenschaftliche Arbeit geschärft hat, was meine berufliche Zukunft sehr bereichern wird.

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

Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Ionoptix-Anlage und seine große Hilfsbereitschaft bei Fragen zur Durchführung und Auswertung der Experimente.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Denise Hilfiker-Kleiner möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Versuchstiere danken, ohne welche meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen, namentlich Michelle Gulentz, Albrecht von Hardenberg, Dr. Mathias Hohl, Dr. Alexander Nickel und allen anderen Doktorandinnen und Doktoranden sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der kardiologischen Forschungslaboratorien für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Schließlich möchte ich die Gelegenheit nutzen, meiner Familie und besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe und Loyalität bei dieser und anderen beruflichen sowie privaten Herausforderungen zu danken. Die Arbeit an meiner Promotion sowie mein Studium waren ein außerordentliches Privileg, welches sie mir in dieser Form durch ihre Unterstützung erst möglich gemacht haben.

8. Lebenslauf

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