

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
reaktiver Sauerstoffspezies bei der Peripartalen
Kardiomyopathie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von Jennifer Maryam Eatemadi

geboren am 04 März 1991 in Iserlohn

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies bei der Peripartalen Kardiomyopathie.....	1
1.2 STAT3 and its role in the regulation of mitochondrial reactive oxygen species in the postpartum heart.....	3
2 Einleitung	5
2.1 Physiologische Veränderungen des Herz-Kreislauf-Systems in der Schwangerschaft....	5
2.2 Definition der Peripartalen Kardiomyopathie	6
2.3 Epidemiologie und Ätiologie der Peripartalen Kardiomyopathie	6
2.3.1 Epidemiologie	6
2.3.2 Ätiologie.....	7
2.4 Mitochondriale Energetik in Herzmuskelzellen	8
2.5 Die mitochondriale Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Elimination	10
2.6 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz - Auswirkungen des veränderten Na ⁺ /Ca ²⁺ -Haushalts auf die mitochondriale Energetik und ROS-Emission bei der Herzinsuffizienz	14
2.7 Die Bedeutung des myokardialen Proteins STAT3 in der Pathogenese der PPCM.....	17

2.7.1	STAT3 – Struktur und Funktion	17
2.7.2	Generierung des STAT3-Knockout Phänotyps	19
2.7.3	Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale Funktion	19
2.7.4	Die Bedeutung von STAT3 in der Pathogenese der Peripartalen Kardiomyopathie 22	
2.8	Fragestellung der Arbeit	23
3	Materialien und Methoden	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Versuchstiere	24
3.1.2	Substanzen zur Herstellung der Lösung zur Isolation von Mitochondrien aus Kardiomyozyten von Mäusen	25
3.1.3	Für die polarographische Atmungsmessung benötigte Substanzen	26
3.1.4	Substanzen zur Herstellung der Lösung zur Isolierung von Kardiomyozyten aus Mäusen 27	
3.1.5	Für die Zellverkürzungs-und Fluoreszenzmessungen verwendete Substanzen	29
3.1.6	Farbstoff zur Myozytenfärbung	30
3.1.7	Beschichtung der Deckgläschen.....	30
3.1.8	An den Versuchstieren angewandte Substanzen	31
3.1.9	Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere	31
3.1.10	Präparations- und Isolationsinstrumentarium.....	32
3.1.11	Anlage zur Messung der Zellverkürzung und der Fluoreszenzen.....	32
3.1.12	Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	34
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Mitochondrienisolation aus Mauserzen	35
3.2.2	Polarographische Atmungsmessung an der Clark-Elektrode.....	36
3.2.3	Polarographische Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien.....	38
3.2.4	Messung von Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$)	39

3.2.5	Fluorometrische Messung von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	40
3.2.6	Myozytenisolation.....	41
3.2.7	Aufbau der Messanlage für die Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente....	43
3.2.8	Messprotokoll der Fluoreszenz- und Myozytenverkürzungsexperimente	46
3.3	Auswertung und Statistik der Messergebnisse	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Experimente an isolierten Mitochondrien aus unbehandelten WT und STAT3-KO Mäusen	49
4.1.1	Respiratorische Messung an isolierten Mitochondrien	49
4.1.2	Messung der mitochondrialen Superoxid-Emission	51
4.1.3	Fluorometrische Messung der mitochondrialen Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)-Emission.....	53
4.2	Experimente an isolierten Mitochondrien aus WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.....	56
4.2.1	Respiratorische Messung an isolierten Mitochondrien	56
4.2.2	Messung der mitochondrialen Superoxid-Emission	59
4.2.3	Fluorometrische Messung der mitochondrialen Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)-Emission.....	60
4.3	Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente an unbehandelten STAT3-KO und WT Mäusemyozyten	62
4.3.1	Zellverkürzungsmessungen.....	62
4.3.2	Messung des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD.....	64
4.3.3	Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion.....	65
4.4	Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente an STAT3-KO und WT Mäusemyozyten nach Behandlung mit Bromocriptin	66
4.4.1	Zellverkürzungsmessungen.....	66
4.4.2	Messung des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) ⁺ und FADH ₂ /FAD.....	67
4.4.3	Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion.....	69

5	Diskussion	72
5.1	Auswirkungen des STAT-3-Knockouts auf die mitochondriale Energetik und ATP-Produktion bei postpartalen Mäusen	72
5.2	Auswirkungen des STAT3-Knockouts auf die mitochondriale ROS-Emission	75
5.3	Auswirkungen der Bromocriptin-Behandlung auf die mitochondriale Energetik bei postpartalen STAT3-Knockout Mäusen.....	81
5.4	Auswirkungen der Bromocriptin-Behandlung auf die mitochondriale ROS-Emission bei postpartalen STAT3-Knockout Mäusen.....	83
5.5	Fazit	84
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Publikationen/ Danksagung.....	102
7.1	Vorträge	102
7.2	Danksagung	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Die oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Atmungskette.	9
Abbildung 2: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der mitochondrialen Energetik, elektromechanischen Kopplung und ROS Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der funktionalen Domänen von STAT3.	18
Abbildung 5: Reaktionsgleichung an der Platinkathode und der Silberanode.....	36
Abbildung 6: Aufbau der Clark-Elektrode.....	37
Abbildung 7: Versuchsaufbau für die Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien	38
Abbildung 8: Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage.....	42
Abbildung 9: Auflichtfluoreszenzmikroskop und zuführende Gefäße zur Zugabe der verschiedenen Lösungen	44
Abbildung 10: Exemplarisches Beispiel einer respiratorischen Messung mittels Clark Elektrode.	49
Abbildung 11: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen ohne Behandlung mit Bromocriptin.	50
Abbildung 12: Respiratorischer Kontrollindex von postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen aus dem Verhältnis (A) State 3/State 2-Respiration und (B) State 3/State 4-Respiration.....	51
Abbildung 13: Superoxid-Produktion in $\text{pmol} \cdot \text{O}_2^-/\text{min}$ in postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen mithilfe der ESR-Spektroskopie.....	52
Abbildung 14: Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in $(\text{pmol} \cdot \text{O}_2^-/\text{min})/(\text{nmol O}_2/\text{mg Protein})$ in postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen.....	53
Abbildung 15: H_2O_2 -Gehalt in $\text{pmol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ in WT und STAT3-KO Mäusen.	54
Abbildung 16: H_2O_2 -Emission im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in $(\text{pmol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}/\text{min})/(\text{nmol O}_2/\text{mg Protein})$ in WT und STAT3-KO Mäusen.....	55

Abbildung 17: Reaktionsgleichung zur Darstellung der Dismutation von Superoxid $\cdot\text{O}_2^-$ und Wasserstoff H^+ zu Wasserstoffperoxid H_2O_2 und Sauerstoff O_2 durch die mitochondriale Mn-SOD.....	55
Abbildung 18: Verhältnis von H_2O_2 zu $\cdot\text{O}_2^-$ als Marker für die Mn-SOD-Aktivität in Mitochondrien von WT und STAT3-KO Mäusen.	56
Abbildung 19: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.....	57
Abbildung 20: Respiratorischer Kontrollindex von postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.	58
Abbildung 21: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.....	59
Abbildung 22: Superoxid-Produktion in $\text{pmol} \cdot\text{O}_2^-/\text{min}$ (A) und Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in $(\text{pmol} \cdot\text{O}_2^- /\text{min})/(\text{nmol} \text{O}_2/\text{mg Protein})$ (B) in postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.	60
Abbildung 23: H_2O_2 -Gehalt in $\text{pmol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ (A) und H_2O_2 -Emission im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in $(\text{pmol} \text{H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}/\text{min})/(\text{nmol} \text{O}_2/\text{mgProtein})$ (B) in WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin..	61
Abbildung 24: Parameter der Zellverkürzung von WT und STAT3-KO	63
Abbildung 25: Redoxstatus von $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$, FADH_2/FAD in WT und STAT3-KO.....	64
Abbildung 26: Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus in WT und STAT3-KO.....	65
Abbildung 27: Mitochondriale Superoxid-Produktion gemessen mit dem Farbstoff MitoSOX-Red in isolierten Kardiomyozyten von WT und STAT3-KO Mäusen.....	66
Abbildung 28: Parameter der Zellverkürzung von WT + B und STAT3-KO + B.....	67
Abbildung 29: Redoxstatus von $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$, FADH_2/FAD in WT + B und STAT3-KO + B.	68
Abbildung 30: Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus in WT+B und STAT3-KO+B	69
Abbildung 31: Mitochondriale Superoxid-Produktion in isolierten Kardiomyozyten von WT+B und STAT3-KO+B Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin.	70

Abbildung 32: Mitochondriale Superoxid-Produktion in isolierten Kardiomyozyten von A WT und WT+B und B STAT3-KO und STAT3-KO+B. 71

Abbildung 33: Schematische Darstellung des potentiellen Pathomechanismus der PPCM. 85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PPCM-Fälle in verschiedenen Ländern.	7
Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Filter und Spiegel an der Ion-Optix-Messanlage.....	33
Tabelle 3: Verwendete Autofluoreszenz- bzw. Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung des Redoxstatus und der Superoxid-Emission der Myozyte.	45

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AfCS	Alliance for Cellular Signaling
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
CD	Cathepsin D
CN	Zyanid
Cre	Rekombinase, Typ I Topoisomerase eines P1 Bacteriophagens
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DCLP	Dichroic long pass
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

FADH ₂	reduzierte Form von FAD
FCCP	Carbonylzyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetales Kalbsserum
GAS-Element	γ-Interferon-Aktivierungssequenz
gp130	Glykoprotein 130
GSH	Glutathion
h	Stunde
HPR	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz [1/s]
HZV	Herzzeitvolumen
IL-6	Interleukin 6
JAK	Januskinase
K ⁺	Kalium
λ	Wellenlänge
mNCE	mitochondrialer Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
MCU	Mitochondrialer Kalzium Uniporter
MG	Molekulargewicht
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minuten
mol	Molar
mmol	Millimolar
µmol	Mikromolar

MMP3	Matrix Metalloproteinase-3
nmol	Nanomolar
Mn-SOD	Manganhaltige Superoxid Dismutase
MnTBAP	Mn-(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
n	Anzahl der Experimente (bzw. Anzahl der Zellen)
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-H ⁺ H ⁺
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-H ⁺ H ⁺
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NNT	Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
NT ₁	Normaltyrode 1
NT ₂	Normaltyrode 2
·O ₂ ⁻	Superoxidanionen-Radikal
OxLDL	Oxidiertes low density lipoprotein
p	p-Wert, Signifikanzwert
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT	Photomultiplier
PPCM	Peripartale Kardiomyopathie

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Relaxationszeit
s, ms	Sekunden, Millisekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA	SR-Ca ²⁺ -ATPase
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT	Signalübermittler und Aktivator der Transkription
STAT3-KO	STAT-3 Knockout
Stattic	STAT three inhibitory compound
U/min	Umdrehungen pro Minute
UCP	Uncoupling proteins
vs.	versus
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
16-kDa-PRL	16 kDa Prolaktin, Spaltprodukt des 23kDa großen Prolaktins

1 Zusammenfassung

1.1 Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies bei der Peripartalen Kardiomyopathie

Die Peripartale Kardiomyopathie (PPCM) entwickelt sich vorwiegend im letzten Monat der Schwangerschaft, während des Geburtsvorgangs oder den ersten Wochen nach der Entbindung bei zumeist herzgesunden Frauen und manifestiert sich insbesondere durch eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion. Die Expression des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) ist im Myokard von Patientinnen mit PPCM erniedrigt. Als Transkriptionsfaktor ist STAT3 in zahlreiche protektive Signalkaskaden über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg involviert. Dabei konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass es bei der chronischen Herzinsuffizienz im Rahmen der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zu einer Herunterregulierung dieses Signaltransduktionswegs kam. Darüber hinaus reguliert STAT3 die Transkription der mitochondrialen manganhaltigen Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) und spielt somit eine zentrale Rolle in der antioxidativen Abwehr gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche maßgeblich am Progress der Herzinsuffizienz beteiligt sind. Superoxidanionen-Radikale fallen durch unvollständige Reduktion von O₂ an der mitochondrialen Atmungskette an und werden durch die Mn-SOD zu H₂O₂ dismutiert. H₂O₂ wird in der Folge durch NADPH-abhängige Enzymsysteme zu H₂O entgiftet. Oxidativer Stress stellt in der Pathogenese der PPCM einen bedeutenden Faktor dar, da er die Sekretion des proteolytischen Enzyms Cathepsin D triggert. Cathepsin D wandelt das im Zuge der Schwangerschaft ausgeschüttete Stillhormon Prolaktin in das maladaptive 16-kDa Prolaktin (16-kDa-PRL) Spaltprodukt um. Dieses 16-kDa-PRL soll durch seine nachweislich angiostatische und proapoptotische Wirkung in Endothelzellen kausal am Progress der PPCM beteiligt sein, da es die myokardiale Mikrozirkulation kritisch beeinträchtigt. Die Behandlung mit Bromocriptin, welche die Prolaktinsekretion durch Agonismus am Dopamin-D₂-Rezeptor inhibiert, konnte das Entstehen der PPCM in einem Tiermodell vollständig verhindern. Auch in ersten klinischen Studien konnte man bei Patientinnen, die zusätzlich zur leitliniengerechten Herzinsuffizienz-Therapie Bromocriptin erhalten haben, eine deutlich verbesserte Herzfunktion und höhere Überlebensraten erzielen.

Das Ziel dieser Arbeit war es die mitochondriale Energetik, die ROS-Emission und insbesondere die Aktivität der Mn-SOD an isolierten Mitochondrien von Mäusen mit einem Kardiomyozyten-

spezifischen STAT3-Knockout zu analysieren, wobei wir eine unbehandelte und eine mit Bromocriptin behandelte Versuchsgruppe miteinander verglichen. Darüber hinaus untersuchten wir die Kontraktilität, den Redoxstatus anhand der Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD und die Superoxid-Emission mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs MitoSOX-Red bei elektrischer Feldstimulation an intakten Kardiomyozyten aus diesen beiden Versuchsgruppen, um potentielle Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung (EC) zu identifizieren. Für unsere Experimente wurden Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von STAT3 mit Wildtyp-Mäusen, jeweils nach 2 Schwangerschaften, jeweils mit und ohne Bromocriptin-Therapie, verglichen. Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikant reduzierte mitochondriale Atmung bei deutlich höheren Superoxid-Konzentrationen in den isolierten Mitochondrien der STAT3-KO Mäuse. Die H_2O_2 -Emission war hingegen reduziert, sodass wir daraus eine verminderte Aktivität der Mn-SOD, die sich aus dem $H_2O_2/\cdot O_2$ -Verhältnis ergibt, schlussfolgern. Auf zellulärer Ebene konnten wir keinen Unterschied in den Zellverkürzungskinetiken, dem Redoxstatus von NAD(P)H/FAD und der Superoxid-Emission, selbst nicht nach Arbeitslasterrhöhung (durch Hinzugabe von Isoprenalin und Erhöhung der elektrischen Feldstimulation von 0,5 Hz auf 5 Hz), feststellen. Die Behandlung mit Bromocriptin konnte bei den STAT3-KO Mäusen eine deutliche Verbesserung bzw. Wiederherstellung der mitochondrialen Atmungskapazität erzielen. Wir schlussfolgern aus unseren Ergebnissen, dass die verminderte Aktivität der Mn-SOD im Zuge des STAT3-Verlusts bei der PPCM die Akkumulation von Superoxidanionen-Radikalen in den Mitochondrien begünstigt und dadurch die Entstehung des 16-kDa-PRL und die damit assoziierten maladaptiven Prozesse weiterhin gefördert werden. Doch auch unabhängig davon könnten ROS die Kardiomyopathie durch Begünstigung von Apoptose durch Öffnung des *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP), Beteiligung am Remodeling und direkten Schäden an der Elektronentransportkette (ETC) den Krankheitsprogress unterhalten. Das Ansprechen auf Bromocriptin suggeriert, dass das 16-kDa-PRL in der Tat kausal mit der Entstehung der PPCM im Zusammenhang steht und bestätigt die bisherigen Hypothesen hierzu. Neben dem Einsatz von Bromocriptin könnten allerdings auch ROS reduzierende Substanzen von Nutzen sein.

1.2 STAT3 and its role in the regulation of mitochondrial reactive oxygen species in the postpartum heart

Peripartum cardiomyopathy is characterized as an idiopathic cardiomyopathy presenting with heart failure due to left-ventricular systolic dysfunction in previously healthy women and mainly emerges towards the end of pregnancy, during delivery or within the first month after delivery. Myocardial protein levels of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) are reduced in patients with PPCM. STAT3 mediates its protective actions via the myocardial JAK/STAT signal transduction pathway and plays a crucial role in protecting the heart from oxidative stress by upregulating the antioxidative enzyme manganese superoxide dismutase (MnSOD). In previous studies on failing hearts, dilated cardiomyopathy (DCM) was associated with the downregulation of STAT3 and the JAK/STAT signal transduction pathway, which may be a maladaptive process in light of the cardio-protective role of this pathway. Superoxide is produced at the respiratory chain due to incomplete reduction of oxygen and gets dismutated to hydrogen peroxide (H_2O_2) by the MnSOD. H_2O_2 subsequently gets detoxified to H_2O by NADPH-dependent enzymes. An increased production of reactive oxygen species (ROS) is considered as an important upstream event, since it leads to the cleavage of Prolactin, the nursing hormone from the pituitary gland, into its maladaptive 16-kDa form, mediated by the proteolytic enzyme Cathepsin D. This 16-kDa Prolactin (16-kDa-PRL) induces apoptosis and inhibits proliferation in endothelial cells, thereby impairing myocardial microvasculature. Treatment with the dopamine D_2 agonist Bromocriptine reduces prolactin secretion and therefore also the formation of the 16-kDa-PRL. In mice with a myocardial specific deletion of STAT3 treatment with Bromocriptine fully prevented the onset of PPCM and also improved cardiac function in human patients. We performed a detailed and functional analysis of the mitochondrial function, including respiration and the formation of superoxide and H_2O_2 , to test whether the loss of STAT3 affects mitochondrial energetics and ROS emission. Furthermore, we analyzed contractility, redox-states of NAD(P)H/FAD and superoxide-emission in intact cardiomyocytes isolated from mice with a cardiomyocyte-restricted deletion of STAT3 while being stimulated in an electric field, to check whether the STAT3 knockout in postpartum mice affects electromechanical coupling. Our results show a significantly decreased respiration in postpartum STAT3-KO mice compared to their WT littermates. In addition, mitochondrial formation of superoxide was higher in STAT3-KO mice, while H_2O_2 emission was reduced. Thus the ratio of H_2O_2 per $\cdot\text{O}_2^-$ was significantly decreased, indicating reduced MnSOD activity. Contractility, redox-state and superoxide emission in intact cardiomyocytes were comparable in postpartum

STAT3-KO and WT, even after increased workload, which was performed by simultaneous increase of electric field stimulation (5 Hz) and the use of isoproterenol. Moreover our results indicate that treatment with Bromocriptine restores mitochondrial respiration in STAT3-KO mice, while in WT mice, Bromocriptine treatment did not affect respiration. In conclusion, postpartum mice with a cardiomyocyte-restricted deletion of STAT3 have a decreased activity of the antioxidative enzyme MnSOD, which predisposes to increased $\cdot\text{O}_2^-$ formation. Increased oxidative stress further enhances the cleavage of Prolactin into its maladaptive 16-kDa-PRL, which finally contributes to the development of PPCM. On the other hand, ROS are known to be involved in the progress of heart failure by promoting apoptosis via the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), adverse myocardial remodeling and even direct ETC damage. Targeting mitochondrial ROS or STAT3-controlled signaling pathways may therefore be useful in the treatment of patients with PPCM in addition to the protective actions of Bromocriptine. Since Bromocriptine clearly improved the condition of postpartum STAT3-KO mice, we support the notion in line with previous findings that the 16-kDa-PRL plays a causative role in the development of PPCM.

2 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen in der Schwangerschaft sind auch heute noch trotz fortschrittlicher Medizin eine besondere Herausforderung für Ärzte. Aktuell treten bei etwa 0,2 – 4% aller Schwangerschaften in den Industrienationen kardiovaskuläre Ereignisse auf und stellen für Mutter und Kind eine potentiell lebensbedrohliche Situation dar (Weiss et al., 1998). Schwierigkeiten im Umgang mit dieser besonderen Situation ergeben sich schon allein daraus, dass die physiologischen Veränderungen des weiblichen Körpers während der Schwangerschaft mögliche Symptome eines neu auftretenden Herzleidens maskieren könnten bzw. sie nicht als solches wahrnehmen lassen. Demzufolge ist es unabdingbar, über diese im Zuge der Schwangerschaft auftretenden Veränderungen aufgeklärt zu sein, um überhaupt erst die Diagnose einer kardiovaskulären Erkrankung stellen zu können. Während der Schwangerschaft stellen hypertensive Komplikationen, wie z.B. die Präeklampsie oder das HELLP-Syndrom, mit etwa 6 – 8% die häufigste Manifestation kardiovaskulärer Ereignisse dar (Peters et al., 2004). Kardiomyopathien hingegen, und insbesondere die Peripartale Kardiomyopathie, treten wesentlich seltener auf, sind dafür aber häufiger mit ernststen Komplikationen assoziiert (Pearson et al., 2000). Darüber hinaus sind die therapeutischen Optionen in der Schwangerschaft, vorwiegend wegen der potentiellen teratogenen Effekte, eingeschränkt, was eine zusätzliche Herausforderung darstellt. Unter diesen Aspekten und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich generell durch die Zunahme kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie Diabetes, Adipositas und Hypertonie aber auch wegen des steigenden Alters der Frau bei Erstgravidität, eine steigende Tendenz in der Prävalenz der Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems bei Schwangeren abzeichnet, ist es besonders wichtig die Pathogenese der Peripartalen Kardiomyopathie besser aufzuklären.

2.1 Physiologische Veränderungen des Herz-Kreislauf-Systems in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft durchläuft der weibliche Körper einige Veränderungen, um den Bedürfnissen des mütterlichen und kindlichen Organismus gerecht zu werden. Bereits im ersten Trimenon führen insbesondere das Progesteron, aber auch weitere Hormone, wie z.B. Relaxin, ein vom Corpus luteum gebildetes Peptidhormon, zur Senkung des Gefäßtonus und damit zur Reduktion des peripheren Gefäßwiderstands auf bis zu 35 - 40% bei (Sanghavi et al., 2014). Das Herzzeitvolumen (HZV) von Schwangeren steigt im 1. Trimenon kontinuierlich bis ins 2. Trimenon um bis zu 45% an, wobei diese Steigerung anfangs noch vorwiegend durch ein

erhöhtes Schlagvolumen und im späteren Verlauf durch die gesteigerte Herzfrequenz erreicht wird (Hunter et al., 1992). Während der Schwangerschaft kommt es außerdem zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks von etwa 5 – 10 mmHg, wobei die Herzfrequenz kompensatorisch einen progredienten Anstieg von etwa 20 – 25% erfährt und im 3. Trimenon ihr Maximum erreicht (Mahendru et al., 2014). Ebenfalls kompensatorisch wird schon relativ früh in der Schwangerschaft (ab der 6. – 8. SSW) das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, welches eine Zunahme des Plasmavolumens durch Wasser- und Salzretention zur Folge hat, um den Blutdruck aufrechtzuerhalten. Weiterhin findet ein kardiales Remodeling statt, sodass linksventrikuläre Wanddicke und –masse um bis zu 28% bzw. 52% zunehmen, begleitet von einer geringfügigen 4-Kammer-Dilatation (Hunter et al., 1992). Die kardiale Hypertrophie der schwangeren Frau ist allerdings, ähnlich wie bei Athleten, reversibel und keineswegs pathologisch (Chung et al., 2014). Diese schwangerschaftsinduzierte kardiale Hypertrophie ist bei Säugetieren nach etwa 7 – 14 Tagen postpartal wieder reversibel (Umar et al., 2012) und kann bei Menschen abhängig von der Laktation und der Anzahl der Parität bis zu einem Jahr anhalten (Clapp et al., 1997). Während der Wehentätigkeit bzw. der Entbindung kommt es dann sogar aufgrund der erhöhten Herzfrequenz, der uterinen Kontraktionen und der zirkulierenden Katecholamine zu einem maximalen Anstieg des HZV um 60 – 80% (Sanghavi et al., 2014).

2.2 Definition der Peripartalen Kardiomyopathie

Laut der European Society of Cardiology (ESC) wird die Peripartale Kardiomyopathie (PPCM) als eine potentiell lebensbedrohliche idiopathische Kardiomyopathie, welche sich mit einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion entweder im letzten Monat der Schwangerschaft, während der Geburt oder in den ersten Monaten nach Entbindung, bei zuvor herzgesunden Patientinnen manifestiert, definiert (Sliwa et al., 2010). Der linke Ventrikel muss nicht immer dilatiert sein, doch eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) von < 45% ohne erkennbare Ursache stellt das Hauptdiagnosekriterium dar (Sliwa et al., 2010). Somit ist die Peripartale Kardiomyopathie eine Ausschlussdiagnose.

2.3 Epidemiologie und Ätiologie der Peripartalen Kardiomyopathie

2.3.1 Epidemiologie

Bisher gibt es keine genauen Angaben zur Inzidenz und Prävalenz der PPCM, da derzeit nur wenige populationsbezogene Studien existieren. Bei näherer Betrachtung der Fallzahlen und der daraus geschätzten Inzidenzen (Tabelle 1) kristallisiert sich jedoch eine Differenz zwischen

bestimmten Regionen der Welt heraus, der ein ethnischer und sozioökonomischer Hintergrund zugrunde liegen könnte. Um dies näher zu erforschen sind weitere Untersuchungen und Studien notwendig. Die Fallzahlen aus Deutschland stammen aus dem Register für PPCM aus der Medizinischen Hochschule Hannover (Tabelle 1).

Land	PPCM-Fälle pro Schwangerschaften
USA	1 : 2500-4000
Südafrika	1 : 100 bis 1 : 1000
Haiti	1 : 300
Deutschland	1 : 1500-2000

Tabelle 1: PPCM-Fälle in verschiedenen Ländern. (Hilfiker-Kleiner & Bauersachs, 2016)

2.3.2 Ätiologie

Neben allgemeinen Risikofaktoren für die PPCM, wie z.B. die generellen schon zuvor erwähnten kardiovaskulären Risikofaktoren, gehören ebenso das Alter der Mutter, Multiparität und Mehrlingsschwangerschaften dazu (Hilfiker- Kleiner & Bauersachs, 2016).

Bisher ist die der PPCM zugrunde liegende Pathophysiologie noch nicht hinreichend geklärt, das vermehrte Auftreten des proteolytischen Enzyms Cathepsin D (CD) scheint allerdings in sehr engem kausalen Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung zu stehen (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Darüber hinaus weisen Patientinnen mit PPCM eine Herabregulation des myokardialen Proteins *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) auf, welches über den JAK/STAT-Signalweg in protektive Signalkaskaden involviert ist und u.a. die Transkription der mitochondrialen Superoxiddismutase (Mn-SOD), welche für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien zuständig ist, reguliert. In einem transgenen Tiermodell mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des Proteins STAT3 wurde gezeigt, dass oxidativer Stress bei postpartalen Mäusen, die Spaltung des Stillhormons Prolaktin (PRL) durch die Protease Cathepsin D zur Folge hat und dass das dadurch entstehende 16-kDa Prolaktin (16-kDa-PRL) angiostatisch und proapoptotisch wirkt, wodurch die kardiale

Mikrozirkulation und damit die Funktion der Kardiomyozyten beeinträchtigt werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Weiterhin konnte diese Annahme dadurch unterstützt werden, dass die Senkung der Prolaktin-Ausschüttung durch den Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonisten Bromocriptin das Auftreten der PPCM im Tiermodell verhindern konnte (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Aktuell wird die Wirksamkeit von Bromocriptin in einer randomisierten Studie in Deutschland bei 60 Patientinnen mit einer nach ESC-Kriterien diagnostizierten PPCM geprüft (<https://clinicaltrials.gov/>, NCT00998556).

Weitere zur Pathogenese der PPCM beitragende Faktoren könnten sowohl inflammatorischer (Sliwa & Böhm, 2014; Sliwa et al., 2006), als auch autoimmuner (Lamparter et al., 2007) und ebenso genetischer Genese (Morales et al., 2010; Van Spaendonck-Zwarts et al., 2010) sein.

2.4 Mitochondriale Energetik in Herzmuskelzellen

Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zelle, da sie große Mengen energiereicher Phosphate über die oxidative Phosphorylierung von ADP, welche unmittelbar mit der Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran in Verbindung steht, produzieren und diese der Zelle zur Verfügung stellen. Insbesondere im Herzen verbraucht die sog. elektromechanische Kopplung, d.h. der Weg des elektrischen Impulses in Form eines Aktionspotentials bis hin zur Kontraktion der Myozyte, große Mengen an ATP, wobei schon allein ein einzelner Herzschlag etwa 2% des zellulären ATP-Pools verbraucht (Nickel et al., 2013). Um die ATP-Synthese an der F₁F₀-ATPase der Atmungskette und damit den ATP-Pool, der sich in den Herzmuskelzellen innerhalb einer Minute komplett erneuert (Balaban, 2002; Mootha et al., 1997), aufrechtzuerhalten, müssen fortwährend Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH₂ über den Citratzyklus in der mitochondrialen Matrix nachgebildet werden. Dieser bezieht seine Substrate überwiegend aus dem Fettsäuremetabolismus (ca. 70%) und zu einem geringeren Anteil der Glykolyse (Nickel et al., 2013). Die von den Reduktionsäquivalenten stammenden Elektronen werden jeweils auf Coenzym Q übertragen, im Falle von NADH über Komplex I der Atmungskette, der NADH-Dehydrogenase, und im Falle von FADH₂ über Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase, welche gleichzeitig ein Enzym des Citratzyklus darstellt, also nicht wie alle anderen Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran, sondern in der Matrix lokalisiert ist und dort die Reaktion von Succinat zu Fumarat katalysiert. Über Coenzym Q werden die Elektronen im nächsten Schritt durch den Komplex III, der Cytochrom-c-Reduktase, auf Cytochrom c übertragen, um dann von dort aus über mehrere kleine Zwischenschritte durch Komplex IV, der Cytochrom-c-Oxidase, Sauerstoff

unter Bildung von Wasser zu reduzieren. Gleichzeitig werden bei diesem sequentiellen Ablauf von Redoxreaktionen über Komplex I, III und IV Protonen über die innere Mitochondrienmembran aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert, wodurch ein Protonengradient (ΔpH) entsteht, der zusammen mit dem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) die treibende Kraft für die ATP-Synthese an der F_1F_0 -ATPase, über welche der Protonenfluss schließlich zurück in die Matrix stattfindet, darstellt. Der Vorgang der oxidativen Phosphorylierung wird vor allem über ADP und Ca^{2+} reguliert (Maack et al., 2007), da bei hohem ATP-Verbrauch während erhöhter Arbeitslast des Herzens, ADP die F_1F_0 -ATPase stimuliert ATP nachzubilden, sodass der Elektronentransport an der Atmungskette beschleunigt abläuft und die Reduktionsäquivalente im oxidierten Zustand vorliegen. Ca^{2+} wird bei erhöhter Arbeitslast durch größere Amplituden und Frequenzen von Ca^{2+} -Transienten vermehrt über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) von den Herzmuskelzellen aufgenommen und akkumuliert in der Matrix, wo es wiederum Schlüssel-Enzyme des Citratzyklus aktiviert, sodass die Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 wieder regeneriert werden (Nickel et al., 2013). So wird auch unter erhöhter Arbeitslast ein balancierter Redoxstatus von NADH/NAD^+ bzw. FADH_2/FAD gewährleistet, um die Herzmuskelzelle mit ausreichend Energie in Form von ATP zu versorgen.

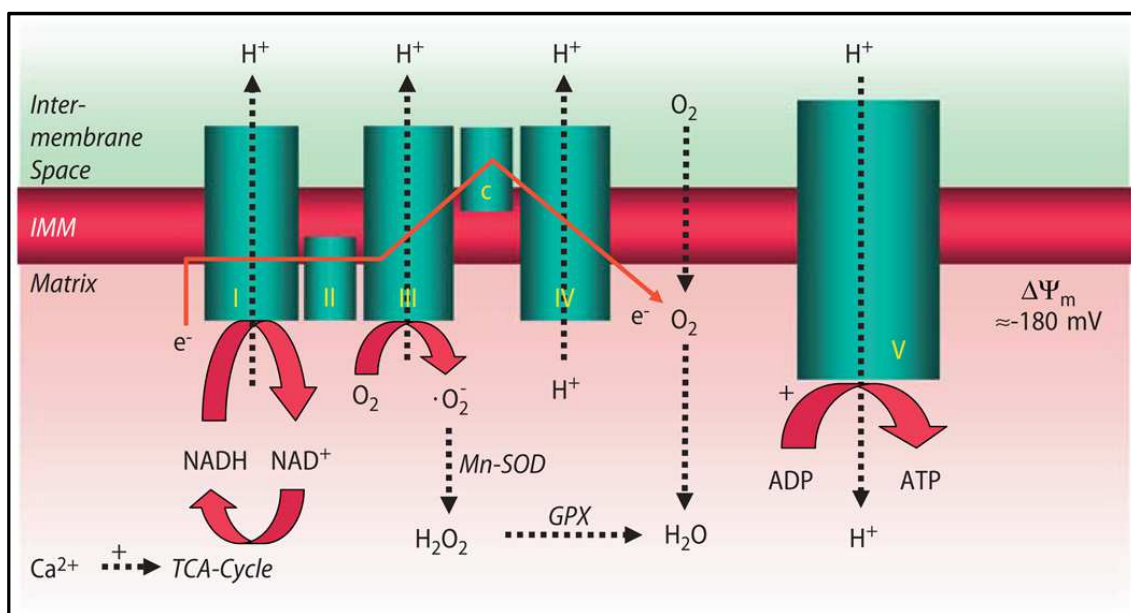


Abbildung 1 : Die oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Atmungskette. I-V, Komplexe der Atmungskette; c, Cytochrom c; GPX, Glutathion-Peroxidase; Mn-SOD, Manganhaltige Superoxid-Dismutase. Nähere Erläuterung im Text (Abschnitt 2.4). Nach Maack & O'Rourke, 2007

2.5 Die mitochondriale Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und ihre Elimination

Da scheinbar ein Zusammenhang zwischen erhöhter ROS-Produktion und der Sekretion des für die Pathogenese der PPCM verantwortlichen Proteins Cathepsin D besteht (Hilfiker-Kleiner et al., 2007) und ROS generell über verschiedene Mechanismen an der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz beteiligt sind, ist das Verständnis über ihre Entstehung und Elimination von großer Bedeutung. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff und sind hochreaktive chemische Agentien, die andere Moleküle oxidieren und somit deren Eigenschaften und Funktionen beeinträchtigen. Zu ihnen werden sowohl die Superoxidanionen-Radikale ($\cdot\text{O}_2^-$) und die Hydroxyl-Radikale ($\cdot\text{OH}$), als auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches durch Übertragung eines Elektrons (e^-) in das hochreaktive Hydroxyl-Radikal überführt wird, gezählt.

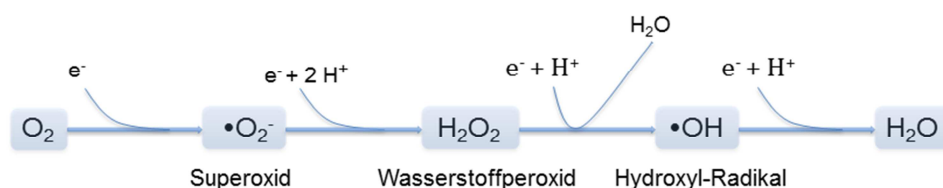


Abbildung 2: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Neben den Mitochondrien, die über 90% zur gesamten zellulären ROS-Emission beitragen (Adam-Vizi, 2005; Aon et al., 2010; Balaban et al., 2005; Nickel et al., 2013) und somit die Hauptquelle für ROS darstellen, gibt es noch zahlreiche weitere Quellen, wobei hier vor allem die NADPH-Oxidasen (NOX2 und NOX4) (Zhang et al., 2012) und auch die entkoppelten NO-Synthasen (NOSs) (Dixon et al., 2003) als Vertreter der zytosolischen ROS Produzenten vorrangig zu nennen sind.

In den Mitochondrien entstehen ROS als Nebenprodukt der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung vornehmlich an Komplex I und III der Atmungskette (Murphy et al., 2009; Turrens et al., 1985). Dabei gilt grundsätzlich, je höher das Redoxpotential an diesen Komplexen ist, desto höher fällt die Netto-ROS-Produktion aus (Chen et al., 2003; Kushnareva et al., 2002). Dies ist z.B. im sog. State 4 der Atmung von Mitochondrien der Fall, wenn viel Substrat und

Sauerstoff, jedoch kein ADP und P_i für die oxidative Phosphorylierung vorliegen, sodass die Komponenten der Elektronentransportkette (ETC) maximal reduziert sind. Daraus lässt sich herleiten, dass in entkoppelten Mitochondrien, welche trotz Protonenrückfluss in die Matrix durch „Uncoupling Proteine“ (UCPs) oder andere Lecks der inneren Mitochondrienmembran kein ATP synthetisieren, gleichzeitig sowohl der Protonengradient als auch das Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) dissipieren und somit die ROS-Produktion reduziert werden kann (Brand et al., 2004; Casteilla et al., 2001). Initial wurde die basale Rate der ROS-Produktion auf ~2% des gesamten Sauerstoffverbrauchs geschätzt (Chance et al., 1979), doch in neueren Studien mit vergleichsweise physiologischeren Messbedingungen wurde diese auf ~0,2% korrigiert (Staniek et al., 2000). Diese Werte beziehen sich allerdings auf die in vitro Situation der ROS-Produktion in Mitochondrien und können nicht auf die in vivo Situation übertragen werden, da bisher noch keine Methoden existieren, die eine ausreichende Validität garantieren (Murphy, 2009).

Wenn Elektronen also an den Komplexen I und III entweichen und unkoordiniert mit Sauerstoff reagieren, entstehen zunächst einmal Superoxidanionen-Radikale ($\cdot O_2^-$), welche durch die mitochondriale manganhaltige Superoxiddismutase (Mn-SOD) zu H_2O_2 dismutiert werden. H_2O_2 wird in der Folge durch die Enzyme Glutathionperoxidase (GPX) und Peroxiredoxin (PRX), die wiederum mithilfe von NADPH durch Glutathion (GSH) und Thioredoxin (TRX) regeneriert werden, weiter zu Wasser umgesetzt. NADPH wird von Enzymen des Citratzyklus (Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Decarboxylase) und der Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT), welche die Reaktion $NADH + NADP^+ \leftrightarrow NADPH + NAD^+$ katalysiert, regeneriert. Hierbei wird deutlich, dass Ca^{2+} durch Aktivierung dieser Schlüsselenzyme des Citratzyklus nicht nur für die Bereitstellung von NADH/FADH₂, sondern auch für die Regeneration antioxidativer Kapazitäten über die Bereitstellung von NADPH, von großer Bedeutung ist (Nickel et al., 2013). Die Bedeutung der mitochondrialen Superoxid-Entstehung konnte in einem transgenen Tiermodell mit Mäusen, bei denen ein Mn-SOD Knockout stattgefunden hatte und deren Lebensdauer erheblich auf 10 Tage reduziert worden ist, verdeutlicht werden (Li et al., 1995). Ein oxidiertes Zustand der ETC bei gesteigerter Respiration der Mitochondrien bei überschüssigem ADP und NADH reduziert zunächst einmal die Entstehung von $\cdot O_2^-$, gleichzeitig werden jedoch die antioxidativen Kapazitäten der Mitochondrien durch oxidiertes NADPH limitiert, was letztendlich in einem Anstieg von H_2O_2 resultiert. Gerade diese Thematik beschreiben Aon et al. mit der These, dass sich Mitochondrien im Rahmen der Evolution dazu entwickelt haben, durch einen ausgeglichenen Redoxstatus maximale Energie auszuschöpfen,

während sie die ROS-Emission minimal halten (Aon et al., 2010). Demzufolge, sollten also beide Extreme, die maximale Oxidation bzw. Reduktion der ETC, vermieden werden (Gauthier et al., 2013).

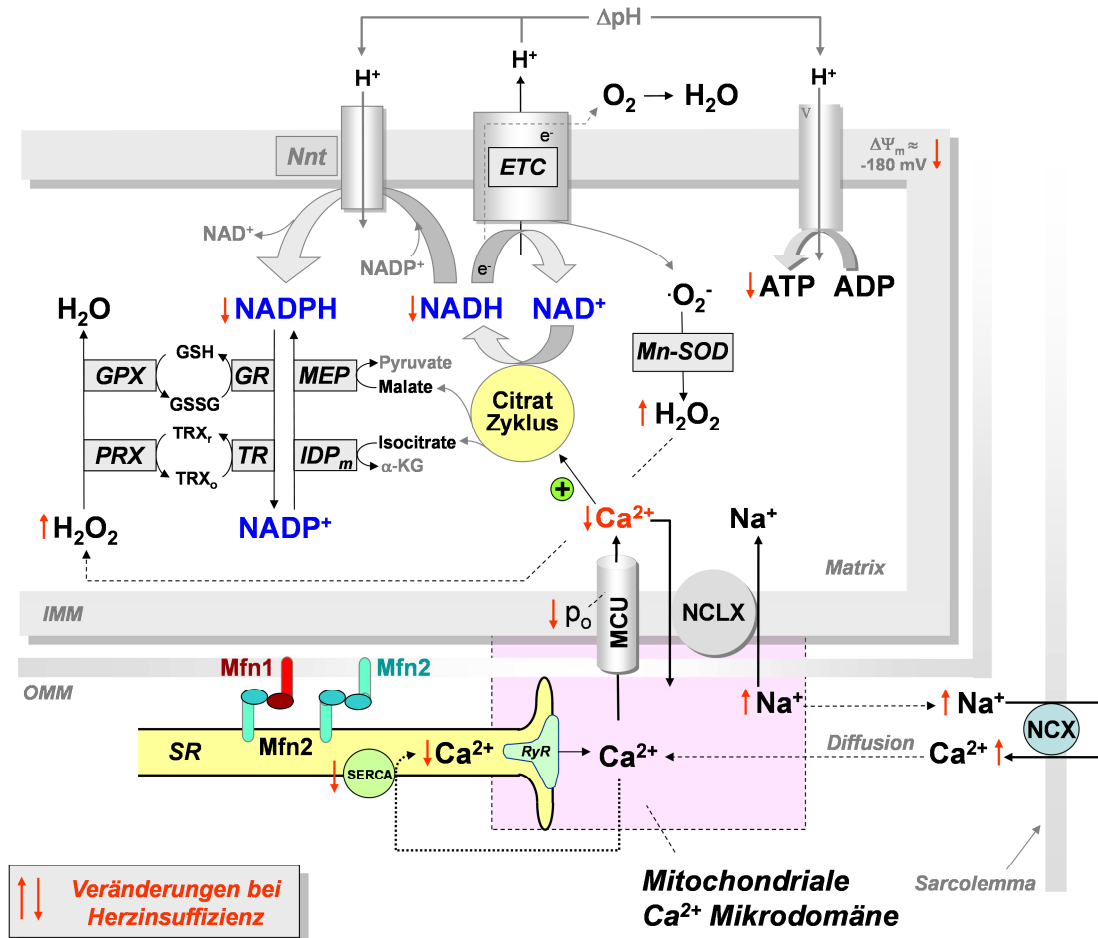


Abbildung 3: Schematische Darstellung der mitochondrialen Energetik, elektromechanischen Kopplung und ROS-Produktion bzw. Elimination in Kardiomyozyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Der Citratzyklus ist über die Regeneration von oxidiertem NAD^+ zu NADH , welches seine Elektronen an die Atmungskette abgibt, an der ATP-Produktion beteiligt. Gleichzeitig gewährleistet er die Regeneration der antioxidativen Kapazität, da NADH weiterhin für die Reduktion von NADP^+ durch die Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT) gebraucht wird. Eine regelrechte Na^+ - Ca^{2+} -Homöostase ist essentiell für die mitochondriale Energetik, da u.a. Schlüsselenzyme des Citratzyklus über Ca^{2+} stimuliert werden. Nähere Erläuterungen siehe Text. $\Delta\Psi_m$, Mitochondriales Membranpotential; Mn-SOD, Mn^{2+} -abhängige Superoxid Dismutase; PRX, Peroxiredoxin; GPX, Glutathion-Peroxidase; $\text{TRX}_{r/o}$, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; TR, Thioredoxin-Reduktase; GR, Glutathion-Reduktase; IDP_m , mitochondriale NADP^+ -abhängige Isocitrat Dehydrogenase, MEP, Malat-Decarboxylase; α -KG, α -Ketoglutarat; MCU, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; NCLX, Na^+ / Ca^{2+} Austauscher; ETC, Elektronen-Transportkette. Modifiziert nach Nickel, Kohlhaas, & Maack, 2014.

2.6 Pathophysiologische Veränderungen bei Herzinsuffizienz - Auswirkungen des veränderten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts auf die mitochondriale Energetik und ROS-Emission bei der Herzinsuffizienz

Die im Rahmen der Herzinsuffizienz auftretenden Kompensationsmechanismen zur Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens, zu denen einerseits die Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit nachfolgender Katecholaminausschüttung und zum anderen die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gehören, sind besonders im Anfangsstadium der Erkrankung unabdingbar, um eine ausreichende Organperfusion zu gewährleisten. Langfristig führt die neuroendokrine Aktivierung jedoch zu maladaptiven Umbauprozessen. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Störung des Na^+ - und Ca^{2+} -Haushalts, was sich auch negativ auf den mitochondrialen Ca^{2+} -Haushalt auswirkt. Die hierdurch reduzierte Aktivierung des Citratzyklus impliziert einen Mangel an NADH, FADH₂ und NADPH, was ein energetische Defizit und oxidativen Stress verursachen kann (Bers, 2006; Maack et al., 2007). Da sich Patientinnen mit PPCM vornehmlich mit einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion präsentieren, spielen auch hierbei die zur Herzinsuffizienz beitragenden pathophysiologischen Mechanismen auf zellulärer Ebene für das Verständnis der Erkrankung eine entscheidende Rolle.

In den Mitochondrien erfolgt die Ca^{2+} -Aufnahme überwiegend über den sog. *mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter* (MCU) in der inneren Mitochondrienmembran (Kirichok et al., 2004). Die Existenz einer Ca^{2+} -Mikrodomäne zwischen Mitochondrien und dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) liegt darin begründet, dass der MCU eine relativ niedrige Ca^{2+} -Affinität von etwa 10 – 30 $\mu\text{mol/l}$ aufweist und diese erst durch eine lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration überwunden werden kann (Chikando et al., 2011; O'Rourke, 2011; Kohlhaas et al., 2013). Der Export von Ca^{2+} aus den Mitochondrien erfolgt über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCLX), sodass hier eine starke Abhängigkeit vom intrazellulären Na^+ -Haushalt besteht.

Wie bereits beschrieben, spielt die Regulation des Ca^{2+} -Haushalts im Hinblick auf die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch den Citratzyklus eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Energetik und Entstehung von ROS. In der Pathogenese der Herzinsuffizienz kommt es in den Kardiomyozyten u.a. durch eine reduzierte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase im SR (SERCA) und den Verlust von Ca^{2+} über ein “ Ca^{2+} -Leck“ über die Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) am SR zu einer reduzierten Ca^{2+} -Beladung des SRs und dadurch zu einer herabgesetzten Amplitude und Geschwindigkeit zytosolischer Ca^{2+} -Transienten (Bers, 2006). Gleichzeitig ist die intrazelluläre Na^+ -Konzentration bei Herzinsuffizienz, als Resultat eines erhöhten Na^+ -

Einstroms, einer verminderten Na^+/K^+ -ATPase (NKA)- und/oder einer gesteigerten Na^+/H^+ -Austauscher (NHE)-Aktivität, erhöht (Despa & Bers, 2013; Despa et al., 2002; Pieske et al., 2002). Ebenso ist die Expression des sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) erhöht (Studer et al., 1994), der unter physiologischen Bedingungen im sog. "Vorwärtsmodus" für die diastolische Elimination des über die L-Typ-Kalzium-Kanäle in die Zelle eingetretenem Ca^{2+} nach einem Zellkontraktionszyklus, verantwortlich ist (1 Ca^{2+} nach extrazellulär im Austausch gegen 3 Na^+ nach intrazellulär). Bei der Herzinsuffizienz und der damit einhergehenden erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration arbeitet der NCX allerdings zeitweise im sog. "Rückwärtsmodus", sodass noch während des Aktionspotenzials hierüber Ca^{2+} aufgenommen und der Export in der Diastole reduziert werden (Armoundas et al., 2003). Dieser trans-sarkolemmale Ca^{2+} -Einstrom könnte zumindest teilweise die verringerte Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR bei Herzinsuffizienz kompensieren (Bers, 2006). Dennoch bleibt eine effektive mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme durch diesen Kompensationsmechanismus aus, was sich einerseits dadurch erklären lässt, dass die Kinetik des NCX-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms wesentlich langsamer ist, als die einer Freilassung von Ca^{2+} über die RyRs aus dem SR (Kohlhaas et al., 2010), und andererseits dadurch, dass die erhöhte Na^+ -Konzentration eine Aktivierung des mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zur Folge hat (Bay et al., 2013). Des Weiteren führt die aus dem Rückwärtsmodus des NCX resultierende erhöhte intrazelluläre diastolische Ca^{2+} -Beladung zu einer erhöhten diastolischen Wandspannung des Myokards, welche die ungünstige energetische Lage im Myokard zusätzlich aggraviert.

Zusammenfassend lässt sich aus den beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen bei der chronischen Herzinsuffizienz schließen, dass die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme durch den gestörten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt in insuffizienten Kardiomyozyten stark beeinträchtigt wird und, dass sie sich durch die reduzierte Bereitstellung von NADH und NADPH über den Citratzyklus einerseits negativ auf den energetischen Zustand der Kardiomyozyten auswirkt (Neubauer, 2007) und andererseits durch die reduzierte Bereitstellung antioxidativer Kapazitäten zu einer erhöhten H_2O_2 -Emission und somit vermehrtem oxidativem Stress führt. Nach Anwendung des MCU-Inhibitors Ru360, welcher die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme verhindert, konnte diese gesteigerte H_2O_2 -Emission bei ausbleibender NADPH-Regeneration deutlich dargestellt werden (Kohlhaas et al., 2010). Ein kausaler Zusammenhang zwischen systolischer Funktionsstörung und ROS kann außerdem über die modifizierte elektromechanische Kopplung (EC) hergestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass die SERCA durch ROS inhibiert (Flesch et al., 1999) und die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR durch Phosphorylierung erhöht wird, beides

Prozesse, durch die die Ca^{2+} -Akkumulation im SR erschwert und der Rückwärtsmodus des sarkolemmalen NCX begünstigt werden. Des Weiteren gilt auch die NKA, die den Haupteliminationsweg für Na^+ aus der Zelle heraus darstellt, als redoxsensibel (Shattock et al., 1993), und führt so zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration, wodurch sie ebenfalls zum Remodeling der elektromechanischen Kopplung beiträgt. Weiterhin ist bekannt, dass ROS posttranslational über redoxsensitive Aktivierung von Proteinkinasen Proteine der Sarkomere modifizieren (Steinberg, 2014) und somit die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} herabsetzen (Canton et al., 2006; Heusch et al., 2010) und auch am kardialen Remodeling bei progredienter Herzinsuffizienz maßgeblich beteiligt sind, indem sie Signalkaskaden, die mit kardialer Hypertrophie, Apoptose und Nekrose in Zusammenhang stehen, induzieren (Ago et al., 2008; Baines et al., 2004), wodurch die ohnehin durch ROS erzeugten Arrhythmien (Akar et al., 2005) begünstigt werden können.

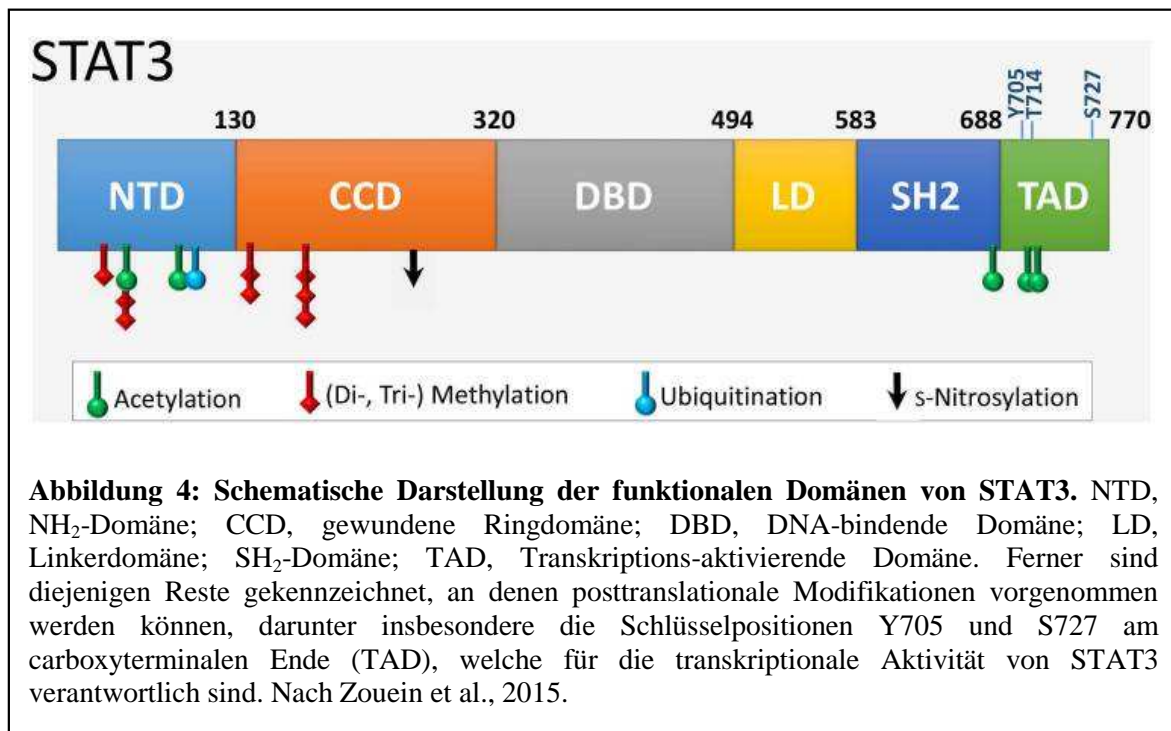
Bisher konnten antioxidative Substanzen, wie Vitamin E, das kardiovaskuläre Outcome bei Patienten mit kardiovaskulärem Risiko nicht verbessern (The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000). Dies könnte zum einen daran liegen, dass dabei auf zellulärer Ebene kein spezielles Target angesteuert wird und zum Anderen, dass ROS teilweise auch adaptive Funktionen übernehmen können, wie z.B. im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung. Hierbei induzieren ROS, die bei kurzen Phasen von Ischämie und Reperfusion entstehen, protektive Mechanismen, die das Myokard bei einer längeren Ischämie und Reperfusion vor Zelltod schützen können (Pain et al., 2000). Hierbei induzieren geringe Mengen von ROS intrazelluläre Signalkaskaden, die wiederum in der Aktivierung ATP-abhängiger K^+ -Kanäle resultieren und somit die Öffnung des mitochondrial permeability transition pore (mPTP) verhindern (Heusch et al., 2008). Der mPTP ist ein in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierter spannungsabhängiger Kanal, der in Anwesenheit von hohen Konzentrationen von ROS und/oder Ca^{2+} öffnet, wodurch Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt wird und damit zu Apoptose oder Nekrose der Kardiomyozyten führt (Boengler et al., 2010). In diesem Kontext sind Ansätze, die gezielt auf die mitochondriale ROS-Entstehung gerichtet sind, indem das antioxidative Pharmakon spezifisch durch einen lipophilen Carrier im mitochondrialen Kompartiment akkumuliert, wie es z.B. bei MitoQ (Adlam et al., 2005) oder MitoSNO (Chouchani et al., 2013) aber auch bei den sog. Szeto-Schiller Peptiden (Szeto, 2014) der Fall ist, sehr vielversprechend.

2.7 Die Bedeutung des myokardialen Proteins STAT3 in der Pathogenese der PPCM

2.7.1 STAT3 – Struktur und Funktion

Der signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gehört zur Familie der im Herzen vorkommenden STAT-Proteine, welche sowohl in Kardiomyozyten, als auch in Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen vertreten sind (Xuan et al., 2001). Im Hinblick auf die PPCM scheint STAT3 eine zentrale Rolle zu spielen, da dessen Expression im linksventrikulären Myokard bei Patientinnen mit PPCM reduziert war und es in einem transgenen Tiermodell bei weiblichen Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des STAT3-Gens postpartal zu einer akut auftretenden Herzinsuffizienz mit deutlich erhöhter Mortalität im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren kam (Hilfiker-Kleiner et al., 2007).

Insgesamt existieren 7 STAT-Proteine, welche trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind, die über den Januskinase (JAK)-STAT-Signaltransduktionsweg vermittelt werden (Darnell, 1997). Ihre Grundstruktur beinhaltet eine aminoternale Domäne (NH₂), welche in die Di- bzw. Tetramerisation des STAT3-Proteins involviert ist, eine gewundene Ringstruktur, die bei Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist, eine DNA-bindende Domäne (DBD), eine sog. Linkerdomäne, die zur DNA-Bindung und Aktivierung der Transkription beiträgt, ferner die SH₂ (Src-Homology-2)-Domäne, über die das Andocken an Rezeptoren ermöglicht wird und zuletzt das carboxyterminale Ende, worüber die Transkription aktiviert wird (Lim et al., 2006). Die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs erfolgt überwiegend durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, darunter insbesondere Interleukin-6 (IL-6), aber auch durch Hormone. Sie alle mediierten ihre Signale über einen gemeinsamen Rezeptor, dem Glykoprotein-130 (gp130) (Heinrich et al., 1998). Durch das Binden eines Liganden an gp130 kommt es zur Rezeptordimerisierung, und rezeptorassoziierte JAK-Proteine werden aktiviert, die daraufhin den Rezeptor phosphorylieren, sodass die zytosolischen STAT3-Proteine mit ihrer SH₂-Domäne an diese intrazelluläre Bindedomäne des Rezeptors andocken können (Boengler et al., 2008), wo sie schließlich an einem spezifischen Tyrosinrest (Tyr705) phosphoryliert werden. Diese durch Januskinasen erfolgte Phosphorylierung führt zur Homo- bzw. Heterodimerisation der STAT3-Proteine und anschließender Dissoziation vom Rezeptor, woraufhin sie in den Zellkern translozieren können, um dort mit der DBD an die spezifische Palindromsequenz (γ -Interferon-Aktivierungssequenz, GAS-Sequenz) der DNA zu binden.



Im Herzen reguliert STAT3 als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Genen, welche in protektive Signalkaskaden involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass durch das konstitutionell aktivierte STAT3 in Kardiomyozyten die Expression der Mn-SOD und deren Aktivität deutlich gesteigert werden konnte, wodurch das Ausmaß der Schädigung des Myokards nach experimentell herbeigeführter Ischämie und Reperfusion und daraus resultierendem oxidativen Stress wesentlich abgeschwächt wurde (Negoro et al., 2001). Dementsprechend war im umgekehrten Fall bei einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von STAT3 die Anfälligkeit gegenüber einem durch Ischämie/Reperfusion verursachten Schaden deutlich erhöht, was sich durch eine größere Infarktzone und eine erhöhte Apoptoserate äußerte, die schließlich zur kardialen Dysfunktion führten (Hilfiker-Kleiner, 2004). Daraus geht hervor, dass STAT3 als Transkriptionsfaktor besonders im Hinblick auf oxidativen Stress in Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle zukommt.

Zudem wurde beobachtet, dass eine kardiale Deletion von STAT3 die Entwicklung der transgenen Mäuse in den ersten 3 Monaten bis auf morphologische Veränderungen, zu denen eine beginnende interstitielle Fibrose und eine verminderte Vaskularisierung gehörten, zunächst nicht wesentlich beeinträchtigte, dass sich jedoch mit steigendem Alter eine progrediente Herzinsuffizienz mit Dilatation der Ventrikel und kardialer Dysfunktion entwickelte. In einem Alter von 12 Monaten manifestierte sich schließlich bei allen STAT3-KO Mäusen eine

Herzinsuffizienz (Hilfiker-Kleiner, 2004). In Übereinstimmung mit diesem Befund war die Expression des JAK/STAT3-Signaltransduktionswegs im linksventrikulären Myokard bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Zuge einer dilatativen Kardiomyopathie, also auch in vivo, herunterreguliert (Podewski, 2003) und ebenso verursachte die chronische in vivo Applikation des β -adrenergen Rezeptor-Agonisten Isoprenalin eine Herzinsuffizienz in STAT3-KO Mäusen (Stapel, 2016).

Mäuse mit einer systemischen Deletion von STAT3 hingegen waren im transgenen Tiermodell nicht lebensfähig (Takeda et al., 1997), was die Bedeutung von STAT3 in der Embryogenese und generell als vielfältiges Signaltransduktionsmolekül im gesamten Organismus unterstreicht. Weiterhin ist STAT3 über die Heraufregulierung antiapoptotischer Proteine, wie von u.a. HSP70, Bcl-xL, Cyclin D1 direkt an zytoprotektiven Prozessen beteiligt, woraus allerdings auch der potentiell protoonkogene Charakter von STAT3 hervorgeht, da dessen Überexpression mit verstärkter maligner Transformation von Zellen assoziiert ist (Turkson et al., 2016). Darüber hinaus wird bei einer STAT3-Überexpression zum einen die Tumorangio-genese über eine gesteigerte Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) gefördert (Osugi et al., 2002) und zum anderen die kardiale Hypertrophie (Booz et al., 1998).

2.7.2 Generierung des STAT3-Knockout Phänotyps

Die Entwicklung des Phänotyps der STAT3-Knockout Mäuse wurde durch das Cre/loxP-System, mit dessen Hilfe spezifische DNA-Abschnitte entfernt bzw. rekombiniert werden können, realisiert. Damit ist die gezielte Modifizierung einer spezifischen Gewebeart möglich. Um den erwünschten Abschnitt der DNA zu erkennen, wird er mit der sog. "loxP"-Stelle gekennzeichnet, was im Allgemeinen als „floxed“ bezeichnet wird und anschließend durch das "Cre", ein Enzym aus der Klasse der Rekombinasen, entfernt (Stricklett et al., 1999). Durch die Verpaarung von geflochten STAT3-Mäusen mit α -Myosin heavy chain (α MHC)-Promoter/Cre Rekombinase-Mäusen konnten Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von STAT3 gezüchtet werden (Hilfiker-Kleiner, 2004).

2.7.3 Der Einfluss von STAT3 auf die mitochondriale Funktion

Das myokardiale Protein STAT3 ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt und scheint in der Pathogenese kardialer Erkrankungen eine entscheidende, dennoch bisher unzureichend aufgeklärte Rolle zu spielen. Erst vor kurzem wurde die Lokalisation von STAT3 in kardialen

Mitochondrien und dessen Interaktion mit Bestandteilen der ETC beobachtet (Myers et al., 2009; Wegrzyn et al., 2009). Dabei konnte STAT3 sowohl im mitochondrialen, als auch im zytosolischen Kompartiment nachgewiesen werden. Mittels Western Blot konnte zudem gezeigt werden, dass der mitochondriale Anteil von STAT3 etwa 1/10 der vorhandenen Menge des Proteins im Zytosol beträgt. Bei der funktionellen Analyse der mitochondrialen Funktion stellte sich eine deutlich reduzierte ADP-induzierte Respiration in isolierten Mitochondrien von STAT3-defizienten Kardiomyozyten heraus, wobei der Defekt insbesondere auf Komplex I, aber auch zu einem geringeren Anteil auf Komplex II beruhen soll. Interessanterweise konnte die Funktion der ETC wiederhergestellt werden, nachdem die Zellen mit einem STAT3-Gen exprimierenden Retrovirus transfiziert worden waren, sodass davon auszugehen ist, dass die Verschlechterung der mitochondrialen Respiration tatsächlich auf die fehlende Expression von STAT3 zurückzuführen sein könnte. Die Verringerung der respiratorischen Kapazität der Mitochondrien in diesem Ausmaß würde mit einer erheblichen Abnahme der oxidativen Phosphorylierung und Energiegewinnung einhergehen. Gegen eine Protein-Protein-Interaktion, wie es Wegrzyn et al. postulieren, spricht allerdings die stöchiometrische Analyse von Phillips et al. (Phillips et al., 2010), aus der hervorgeht, dass STAT3 in einer so geringen Konzentration in der Zelle vorkommt (Verhältnis von Komplex I/II zu STAT3 wurde auf 1:10000 berechnet), dass eine relevante, die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigende Interaktion zwischen STAT3 und den Komplexen I und II der Atmungskette höchst unwahrscheinlich erscheint. Auch in eigenen Untersuchungen, konnte kein Hinweis auf eine reduzierte Atmung in kardialen Mitochondrien von STAT3-defizienten Mäusen gesehen werden (Stapel et al., 2016).

Die transkriptionelle Aktivität von STAT3 ist abhängig von dessen posttranslationaler Modifizierung, von der bisher die Phosphorylierung an Tyr705, welche zur Dimerisierung des Proteins und anschließender Translokation zum Zellkern führt, und an Ser727 bekannt sind (Levy et al., 2002). Durch herbeigeführte Mutationen an diesen beiden Positionen, wurde gezeigt, dass die Veränderungen an der ETC durch STAT3 nicht von dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor rühren (Wegrzyn et al., 2009) und ebenso bestätigte sich dies auch durch die fehlende Expression des Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), welches ein Protein darstellt, das im Zuge eines negativen Feedbackmechanismus für die Inaktivierung des JAK/STAT-Signalwegs verantwortlich ist (Lim et al., 2006).

In weiteren Untersuchungen wurden die gleichen Beobachtungen hinsichtlich der reduzierten Respiration in STAT3-defizienten Mäusen gemacht (Boengler et al., 2010; Elschami et al., 2013), wobei die herabgesetzte mitochondriale Funktion in beiden Untersuchungen vor allem auf

Defekte an Komplex I der ETC zurückzuführen waren. Hinzu kommt die Beobachtung, dass STAT3 an der Regulierung des mPTP beteiligt zu sein scheint, da das Fehlen von STAT3 die Schwelle für die Ca^{2+} -induzierte Öffnung des Kanals herabsetzt, wodurch der kardioprotektive Charakter von STAT3 hervorgehoben wird (Boengler et al., 2010). Des Weiteren wurde vor kurzem bei der ultrastrukturellen Analyse von Mitochondrien in STAT3-defizienten Kardiomyozyten erstmals mittels hochauflösender Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt, dass das Fehlen von STAT3 einerseits die mitochondriale Integrität und Morphologie beeinträchtigt und andererseits zu einem signifikanten Anstieg von Autophagosomen geführt hat, was möglicherweise einen Mechanismus darstellt, die Zelle vor den kritischen Folgen der geschädigten Mitochondrien, wie z.B. der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der darauffolgenden Apoptose (Elschami et al., 2013), zu bewahren.

Das oberste Ziel im Rahmen eines Myokardinfarkts ist die unverzügliche Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes, um die Reperfusion des minderperfundierten Areals schnellstmöglich wiederherzustellen. Dennoch kommt es paradoxerweise bei wiedereinsetzendem Blutfluss auch zu einer Schädigung des Myokards, dem sog. Ischämie/Reperfusionsschaden (Yellon et al., 2007), welcher seit langer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen ist. In diesem Zusammenhang entwickelten sich die Konzepte der ischämischen Prä- und Postkonditionierung, die darauf abzielen, den Schaden, der durch die Reperfusion nach Ischämie am Herzmuskelgewebe entsteht, abzumildern. Bei der ischämischen Präkonditionierung soll das Gewebe durch mehrere kurze ischämische Phasen auf den Infarkt vorbereitet werden, wobei die ischämische Postkonditionierung auf demselben Prinzip beruht und aus multiplen, kurzen Unterbrechungen der Reperfusion nach dem Infarkt besteht. Die in diesem Rahmen beteiligten und aktivierten Signaltransduktionswege sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es ist jedoch bekannt, dass der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg bei Ischämie und vor allem bei Reperfusion, beides Zustände, die der Zelle Stress verursachen, aktiviert wird (Goodman et al., 2008). Dabei zeigte sich in einigen Studien, dass STAT3 durch seinen Beitrag zur Reduktion der Infarktgröße bei ischämischer Prä- und Postkonditionierung in die Kardioprotektion involviert ist (Hilfiker-Kleiner, 2004; Lecour et al., 2005; Skyschally et al., 2009). Weiterhin wurde zuletzt beobachtet, dass die Reduktion der Infarktgröße durch ischämische Postkonditionierung mit einer gesteigerten Phosphorylierung von Tyr705 am STAT3-Protein in einem Myokardbiopsat einherging (Heusch et al., 2011). In vitro Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus postkonditionierten Schweineherzen zeigten außerdem, dass die ADP-induzierte Respiration an Komplex I der ETC womöglich durch die gesteigerte Tyr705-Phosphorylierung besser war als in

der Vergleichsgruppe mit ununterbrochener Reperfusion, ein Effekt, der durch Inhibierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs aufgehoben wurde (Heusch et al., 2011). Außerdem konnte in Proben des postkonditionierten Myokards eine höhere mitochondriale Ca^{2+} -Retention gemessen werden, was für den schon zuvor erwähnten Effekt von STAT3 auf den mPTP, also dessen Inhibierung, spricht (Heusch et al., 2011).

2.7.4 Die Bedeutung von STAT3 in der Pathogenese der Peripartalen Kardiomyopathie

Weibliche Mäuse mit einem kardiomyozyten-spezifischen Knockout von STAT3 (STAT3-KO) entwickeln unmittelbar nach der Schwangerschaft eine Peripartale Kardiomyopathie. Diese äußerte sich in einem transgenen Tiermodell bei allen postpartalen Mäusen mit einer Deletion von STAT3 durch eine akut auftretende linksventrikuläre Herzinsuffizienz mit echokardiographisch dargestellter Dilatation und reduzierter systolischer Funktion des linken Ventrikels, wobei 2/3 der untersuchten Mäuse bereits nach der zweiten Schwangerschaft verstorben waren (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Histologisch und immunhistochemisch konnte im LV der STAT3-KO Mäuse eine deutliche Fibrosierung und eine Reduktion der Vaskularisierung, die zudem mit einer Abnahme der Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) einherging, nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, spielt STAT3 als Transkriptionsfaktor des antioxidativen, mitochondrialen Enzyms Mn-SOD eine besonders wichtige Rolle im Hinblick auf die Elimination reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die physiologischen Veränderungen während der Schwangerschaft stellen für den weiblichen Organismus eine belastende Situation dar, die auf zellulärer Ebene zu vermehrt oxidativem Stress führt (Toescu et al., 2002) und somit die deutlich gesteigerte Expression der Mn-SOD in den nicht-transgenen postpartalen Mäusen erklärt. Im Gegensatz dazu bleibt diese Heraufregulierung in den STAT3-KO Mäusen, gemessen am mRNA-Level und der absoluten Proteinmenge der Mn-SOD, aus (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Gleichzeitig wurde eine verstärkte ROS-Emission im LV mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs nachgewiesen (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Es wird angenommen, dass einerseits die verminderte Mn-SOD-Expression und andererseits die im Zuge der Schwangerschaft ohnehin gesteigerte ROS-Produktion zur Freisetzung des proteolytischen Enzyms Cathepsin D (CD) aus den Lysosomen ins Zytosol der Kardiomyozyten führen (Corbacho et al., 2002; Roberg et al., 1998), wo dieses das protektive 23-kDa große Schwangerschaftshormon Prolaktin (PRL), welches während der Laktationsperiode in großen Mengen aus dem Hypophysenvorderlappen in den Kreislauf ausgeschüttet wird (Lkhider et al., 2004), in das maladaptive, angiostatische 16-kDa-Prolaktin spaltet. CD wurde nicht nur vermehrt in STAT3-KO Mäusen, sondern auch im Serum von

Patientinnen mit PPCM nachgewiesen, wobei in letzteren auch vermehrt oxidiertes low density lipoprotein (oxLDL) als Marker für verstärkten oxidativen Stress aufgezeigt werden konnte (Weinbrenner et al., 2003). Das 16-kDa-PRL hat verheerende Folgen für die kardiale Mikrozirkulation, da es u.a. über Aktivierung von Caspase-3 und NF- κ B zur Apoptose in Endothelzellen führt (Hilfiker-Kleiner et al., 2012) und damit den Metabolismus der Kardiomyozyten massiv beeinträchtigen kann.

Interessanterweise konnte der PPCM-Phänotyp der STAT3-KO Mäuse teilweise durch das Mn-SOD-Mimetikum Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) (MnTBAP) verhindert werden. MnTBAP reduziert sowohl die ROS-Entstehung, als auch die Ausschüttung von CD. Im Gegensatz dazu verhindert der Dopamin-D₂-Agonist Bromocriptin, der die PRL-Ausschüttung inhibiert, bereits das Auftreten der PPCM und die damit assoziierte postpartale Mortalität im transgenen Tiermodell (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Vorläufige klinische Daten zur Anwendung von Bromocriptin zusätzlich zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz bei Patientinnen mit PPCM scheinen vielversprechend zu sein (Halkein et al., 2013; Sliwa et al., 2010). Ergebnisse der ersten deutschen, randomisierten Studie zur Wirksamkeit von Bromocriptin bleiben jedoch noch abzuwarten.

2.8 Fragestellung der Arbeit

In Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von STAT3 führt die fehlende Heraufregulation der Mn-SOD zu einer verstärkten ROS-Produktion in der postpartalen Phase und könnte maßgeblich an der Pathogenese der Peripartalen Kardiomyopathie beteiligt sein. Die Behandlung mit einem Mn-SOD-Mimetikum (Mn-TBAP) kann die Kardiomyopathie teilweise verbessern, doch wesentlich eindrücklicher ist die Tatsache, dass der PPCM Phänotyp nach Behandlung mit dem Dopamin-D₂-Rezeptoragonisten Bromocriptin vollständig unterbunden wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, wie sich einerseits das Fehlen des myokardialen Proteins STAT3 und der Mn-SOD und andererseits die Behandlung mit Bromocriptin auf die mitochondriale Energetik und den Redoxstatus in Kardiomyozyten bei postpartalen Mäusen mit einem STAT3-Knockout auswirkt. Weiterhin wurden sowohl die behandelten, als auch die unbehandelten postpartalen STAT3-KO Mäuse hinsichtlich Veränderungen der elektromechanischen Kopplung untersucht, da diese durch die verstärkte ROS-Produktion beeinträchtigt werden und somit wesentlich zur Pathogenese der Peripartalen Kardiomyopathie beitragen könnte.

Hierzu wurden Experimente an isolierten Mitochondrien und Kardiomyozyten von Mäusen mit einem STAT3-Knockout und Wildtyp-Geschwistertieren nach zwei Graviditäten, jeweils mit und ohne Behandlung mit Bromocriptin, durchgeführt. Die Behandlung wurde eine Woche vor bis zu zwei Wochen nach dem Wurf der trächtigen Maus bei jeweils beiden Schwangerschaften mit jeweils 2,5 mg/d durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem Alter von etwa 3 Monaten und bei den behandelten Tieren unmittelbar im Anschluss an die Bromocriptin-Behandlung. Zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion wurde der Sauerstoffverbrauch mittels polarographischer Atmungsmessung ermittelt. Um die ROS-Produktion näher zu analysieren wurde die Superoxid- bzw. Wasserstoffperoxidmenge in isolierten Mitochondrien mit der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie bzw. dem fluoreszierenden Farbstoff AmplexRed quantifiziert. Da die bisherigen Arbeiten zur Peripartalen Kardiomyopathie nur auf Expressionsdaten der Mn-SOD basieren, konnte anhand des Quotienten $\text{H}_2\text{O}_2/\cdot\text{O}_2^-$ auch erstmals eine Abschätzung der Aktivität des Enzyms durchgeführt werden. An isolierten Kardiomyozyten konnten lichtmikroskopisch einerseits durch Feldstimulation die Sarkomerverkürzung und andererseits durch (Auto-) Fluoreszenzmessungen die Parameter NAD(P)H, FAD und Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) gemessen werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für unsere Experimente wurden alle Versuchstiere von unserer Kooperationspartnerin Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule aus Hannover (MHH) bezogen. Untersucht wurden insgesamt zwei verschiedene Versuchsgruppen. Die erste Gruppe setzte sich aus den sogenannten STAT3-KO Mäusen und aus den Wildtypen-Kontrollen (WT) ohne die Kardiomyozyten-spezifische Deletion von STAT3 zusammen. Die zweite Gruppe setzte sich aus den obengenannten STAT3-KO und WT Mäusen zusammen, welche hingegen mit dem Dopamin-D₂-Agonisten Bromocriptin jeweils sieben Tage vor bis zu zwei Wochen nach jeweils zwei Schwangerschaften behandelt worden sind. Die Versuchstiere, also sowohl die transgenen, als auch die Wildtyp-Kontrolltiere, befanden sich jeweils in beiden Versuchsgruppen in einem Alter von 3 Monaten, als sie für die Experimente herangezogen wurden. Eine Kardiomyozyten-spezifische Deletion von STAT3, wurde durch das

Cre/loxP-System und den nur in den Kardiomyozyten vorhandenen Promoter α -Myosin heavy chain (α MHC) erreicht (α MHC-Cretg^{-/-};STAT3flox/flox: STAT3-KO).

3.1.2 Substanzen zur Herstellung der Lösung zur Isolation von Mitochondrien aus Kardiomyozyten von Mäusen

Isolutionslösung (IS)		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
Sucrose	75 mM	Merck
HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	1 mM	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert wurde mittels TrisBase oder TrisHCl auf 7,4 titriert.

Mitochondriensuspensionslösung (MSS)		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
Sucrose	75 mM	Merck
HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich

BSA/Proteinase-Lösung (pro Maus)		
Substanz	Menge	Hersteller
Isolutionslösung	1 ml	-
BSA	4 mg/ml	Sigma-Aldrich
Proteinase	1,6 mg/ml	Sigma-Aldrich

3.1.3 Für die polarographische Atmungsmessung benötigte Substanzen

Atmungspuffer		
Substanz	Konzentration	Hersteller
KCL	137 mM	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	2 mM	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,5 mM	Merck
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	0,5 mM	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert wurde mittels 1M KOH (Sigma-Aldrich) auf 7,2 titriert.

Weitere für die Atmungsmessung verwendete Substanzen		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Pyruvat	500 mM	Sigma-Aldrich
Malat	500 mM	Sigma-Aldrich
ADP	200 mM	Sigma-Aldrich
Oligomycin	1,2 µM	Sigma-Aldrich
Reagenz A	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Reagenz B	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA

3.1.4 Substanzen zur Herstellung der Lösung zur Isolierung von Kardiomyozyten aus Mäusen

Isolationstyrode (Perfusionspuffer)			
Substanz	Menge (auf 100 ml Aqua dest.)	Finale Konzentration (mM/l)	Hersteller
NaCl	66 g	1130	Carl Roth GmbH
KCl	3,5 g	47	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	0,82 g	6	Merck
Na ₂ HPO ₄	0,85 g	6	Merck
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g	12	Sigma-Aldrich
Phenolrot	0,12 g	0,3	Sigma-Aldrich
NaHCO ₃	10,1 g	120	VWR
KHCO ₃	10,1 g	100	Sigma-Aldrich
HEPES	2,36 g	100	Sigma-Aldrich
BDM (2,3- Butandion-Monoxim)	-	10	Sigma-Aldrich
Taurin (NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H)	9,28 g	30	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glukose	2,5 g	5,5	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	-	1	Sigma-Aldrich

Stopp-Puffer 1

Substanz	Menge	Hersteller
Perfusionspuffer	9 ml	-
FCS (Fetales Kalbserum)	1 ml	Invitrogen
CaCl ₂ (10 mM)	12,5 µl	Sigma-Aldrich

Stopp-Puffer 2

Substanz	Menge	Hersteller
Perfusionspuffer	28,5 ml	-
FCS	1,5 ml	Invitrogen
CaCl ₂ 10 mM	37,5 µl	Sigma-Aldrich

Liberaselösung

Substanz	Menge	Hersteller
Perfusionspuffer	20 ml	-
Trypsin	40 µl	Sigma-Aldrich
CaCl ₂ (10 mM)	25,2 µl	Sigma-Aldrich
Liberase	1,44 mg	Roche

3.1.5 Für die Zellverkürzungs- und Fluoreszenzmessungen verwendete Substanzen

Messtyrode (Normaltyrode, NT)		
Substanz	MG	Hersteller
NaCl	58	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	75	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MgCl ₂	203	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	110	Sigma-Aldrich
L-(+)-Ascorbinsäure	176	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glukose	180	Sigma-Aldrich
Na-HEPES	260	Sigma-Aldrich
Der pH-Wert wurde mittels NaOH (Sigma-Aldrich) oder HCl (Sigma-Aldrich) auf 7,4 titriert.		
Bei der Verwendung des Farbstoffes MitoSOX wurden keine Ascorbinsäure und kein Pyruvat verwendet.		

Weitere für die Zellverkürzungs- und Fluoreszenzmessungen verwendete Substanzen

Substanz	Herstellung	Finale Konzentration	Hersteller
Isoprenalin	15 µl in 50 ml NT	30 nM	Sigma-Aldrich
CN, Cyanid	10 mg in 50 ml NT	4 mM	Fluka
FCCP, Carbonyl Cyanid 4-(trifluoromethoxy)phen	5 µl in 50 ml NT	5 µM	Sigma-Aldrich

ylhydrazon			
H ₂ O ₂ (30%)	50 µl in 50 ml NT	10 mM	Merck
Antimycin A	100 mg AntiA + 3,76 ml 95% Ethanol 150 µl in 50 ml NT	150 µM	Sigma- Aldrich
FCS	-	-	Invitrogen
Medium 199, GlutaMAX	-	-	Invitrogen
Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat	-	-	Invitrogen

3.1.6 Farbstoff zur Myozytenfärbung

Farbstoff	MG	Hersteller
MitoSOX-Red	760	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Beschichtung der Deckgläschen

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

3.1.8 An den Versuchstieren angewandte Substanzen

Substanz	Hersteller
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Rimadyl® Injektionslösung (1ml enthält 50 mg Carprofen und 10 mg Benzylalkohol)	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa, 5000 I. E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Softasept N Hautdesinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rompun® 2% Injektionslösung (1 ml enthält 20 mg Xylazin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Ketavet® 50 Injektionslösung (1 ml enthält 57,67 mg Ketaminhydrochlorid)	Zoetis GmbH, Berlin

3.1.9 Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere

Für die Narkose der Versuchstiere wurden die von Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten bezogenen Gerätschaften verwendet:

- Vaporizer Key Fill Isoflurane
- Fluovac Gas Evacuation System
- Oxygen Flowmeter (Fluss 0,5 ml/min mit 5% Isofluran)
- Keyfill Adapter
- Tube Adapter to Fluosorber

3.1.10 Präparations- und Isolationsinstrumentarium

Instrument/Gerät	Hersteller
Aortic Cannula 1 mm Ø Langendorff-Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

3.1.11 Anlage zur Messung der Zellverkürzung und der Fluoreszenzen

Die Anlage zur Messung der Zellverkürzung und der Fluoreszenzen setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen, welche, das Mikroskop ausgenommen, über die Firma IonOptix, Dublin, Irland bezogen wurden:

- Acquisition Computer, Dell
- CFA Option D: Dual Emission option for CFA300
- CFA300 Cell framing adapter
- FSI700 Fluorescence system interface
- MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable fided 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 Düsseldorf
- 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, Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck, Deutschland bzw. Bellows Falls, USA
- Anregungslampe Xenon Short Arc Lamp 75XE, Ushio Inc. Tokyo

Spiegelbezeichnung	Spiegel (nm)	Transmission (nm)	Farbstoff	Ort
T660LPXR	-	>660	Durchlicht	Mikroskop
89017bsF/TR (Bezeichnung: 120298)	340/490	435/ >505	NADH/FAD/DCF	Mikroskop (Filter 2)
400DCLP	<400	>400	SBFI/MitoSOX	Mikroskop (Filter 3)
650 DCXR	<650	>650	Durchlicht	Vor der Kamera
490DCLP	<490	>490	NADH/FAD	PMT Spiegel
Reiner Spiegel	alles	-	NADH/FAD	PMT Spiegel
D435/35x	-	435 ± 17,5	NADH	Vor dem PMT
D525/30x	-	525 ± 15	FAD	Vor dem PMT
D340/12x	-	340 ± 6	NADH/Indo	Filterradposition 1
S490/20x	-	490 ± 10	FAD	Filterradposition 2
D380 ± 15	-	380 ± 15	SBFI/MitoSOX	Filterradposition 6

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Filter und Spiegel an der Ion-Optix-Messanlage

3.1.12 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material/Gerät	Hersteller
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Discofix C Dreiwegehahn Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät Isotone Kochsalzlösung 0,9% Original Perfusor Spritze 50 ml Wasser (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA
Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
Nadel BSS Microlance 3 Spritze 1ml BD Plastipak	Becton Dickinson, N. J., US
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäße, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen Ø 100 x 20mm Zellkulturschalen Ø 60 x 15mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
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 Zentrifuge Galaxy 16DH	VWR, Darmstadt
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, NJ, USA
Wärmeschrank Heraeus Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Clark-Elektrode	Hansatech Instruments Ltd., England, Norfolk

Fluoreszenzplattenreader	Tecan Infinite M200 Pro, Crailsheim
Potter-Gefäße	Hartenstein, Würzburg
Eppendorfggefäße	Eppendorf AG, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Mitochondrienisolation aus Mausherzen

Die Mitochondrienisolation erfolgte nach der Methode von Mela und Seitz (Mela et al., 1979). Alle Materialien, die zur Isolation benötigt wurden und ebenso das gewonnene Gewebematerial aus der Maus mussten auf Eis kühl gelagert werden.

Zu Beginn wurde die Maus mit 0,3 ml Rompun/Ketavet® (1:2, unverdünnt, Bayer/Pfizer) narkotisiert, um dieser dann, nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes und dementsprechender tiefer Narkose, das Herz zu entnehmen. Nach gründlicher Desinfektion des frei zu präparierenden Gebietes mit Softasept N erfolgte die Thorakotomie. Die Schnittführung erfolgte vom Bauchnabel in Richtung der Axillae der Maus. Während das Sternum mit einer Pinzette fixiert wurde, konnte anschließend das Zwerchfell durchtrennt werden, wodurch das Mediastinum eröffnet und der Blick auf das Herz freigegeben wurde. Mithilfe einer Feinschere wurde das Herz unterhalb des Aortenbogens entfernt und von weiteren zu- und abführenden Pulmonal- sowie Hohlvenengefäßen vorsichtig durchtrennt.

Alle weiteren Schritte der Präparation des Herzens erfolgten in einer mit Isolationslösung befüllten Zellkulturschale. Die Ventrikel wurden vom restlichen Herzgewebe entfernt und vorsichtig zur Entfernung des Blutes in der Isolationslösung geschwenkt. Die sauberen Ventrikel wurden daraufhin in ein Eppendorfggefäß überführt und dort in 500 µl BSA/Proteinase-Lösung zerkleinert. Der Inhalt des Gefäßes wurde dann in einen Homogenisator überführt und für 7 min homogenisiert. Als nächstes wurde erneut 500 µl BSA/Proteinase-Lösung zum Inhalt hinzugegeben und für weitere 7 min homogenisiert. Das so entstandene Homogenat wurde in ein Eppendorfggefäß pipettiert und in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß pipettiert. Dieser wurde erneut zentrifugiert, diesmal jedoch bei 7700 g für 10 min, wobei sich nun Cytosol und Mitochondrien voneinander abgegrenzt haben. Der Überstand, das Cytosol wurde abpipettiert und das Pellet, die Mitochondrien, zunächst mit 400µl MSS resuspendiert und im Anschluss mit 1 ml MSS aufgefüllt. Daraufhin erfolgte ein weiteres Mal

bei 7700 g für 5 min eine Zentrifugation, wobei dieser Vorgang zur Aufreinigung der Mitochondrien diene.

Diese Aufreinigung wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet mit 100 µl MSS resuspendiert und konnte nun für die Proteinbestimmung, welche nach Lowry et al. mittels Bio-Rad Dc Protein Assay erfolgte (Lowry et al., 1951), herangezogen werden.

3.2.2 Polarographische Atmungsmessung an der Clark-Elektrode

Grundlagen der Clark-Elektrode

Die Clark-Elektrode dient zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in einer Lösung und wurde 1953 von Leland Clark entwickelt (Clark et al., 1953). Die Elektrode besteht meistens aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, welche über eine Elektrolytlösung in Verbindung stehen. Durch Anlegung einer Polarisationsspannung von zumeist 0,4 – 0,8 Volt wird an der Kathode Sauerstoff reduziert, wobei die Kathode Elektronen an den Sauerstoff abgibt und so Hydroxid-Ionen (OH⁻) entstehen. Gleichzeitig werden an der Anode Silberionen oxidiert, wobei freie Elektronen entstehen (Abb. 5).



Abbildung 5: Reaktionsgleichung an der Platinkathode und der Silberanode (modifiziert nach Renger & Hanssum, 2009). Die an der Anode entstehenden Elektronen ergeben einen Strom, der mittels Nanoampèremeters gemessen wird.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass sowohl die Sauerstoff-Diffusion über die Membran der Messkammer zur Kathode, als auch die Löslichkeit in der Lösung temperaturabhängige Prozesse sind. Bei unseren Experimenten wurde als Elektrolyt KCL-Lösung (1M) verwendet. Der durch die Atmungsmessung anfallende Sauerstoff in der Messkammer diffundiert entlang seines Konzentrationsgradienten durch eine semipermeable Membran zur Kathode (Abb. 6). Durch die an der Kathode und Anode entstehenden freien Elektronen wird ein Strom erzeugt, der dem Partialdruck (pO₂) des Sauerstoffs bzw. der Anzahl der reduzierten Sauerstoffmoleküle direkt proportional ist und mittels eines Nanoampèremeters gemessen werden kann (Bugger, 2006).

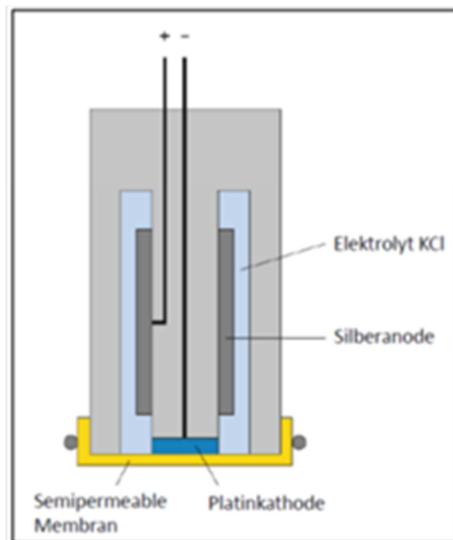


Abbildung 6: Aufbau der Clark-Elektrode (modifiziert nach Renger & Hanssum, 2009). Die an der Platinkathode und Silberanode entstehenden freien Elektronen, sowie die Sauerstoffmoleküle, diffundieren durch eine semipermeable Membran und erzeugen einen messbaren Strom.

Mithilfe des zu diesem System gehörigen Computerprogramms Oxygraph Plus war es nach Abschluss der Atmungsmessung möglich, den gemessenen Strom in die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer umzurechnen. So konnte der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien bestimmt werden. Abb. 7 gibt eine Übersicht über den gesamten Versuchsaufbau.

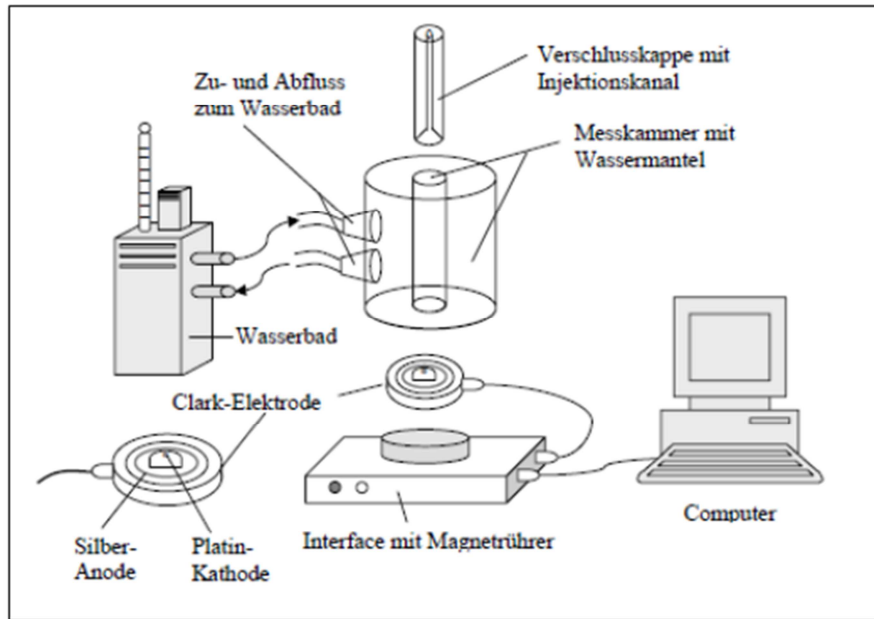


Abbildung 7: Versuchsaufbau für die Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien (aus Liebig, M., 2004)

3.2.3 Polarographische Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien

Die Messkammer wurde vor der respiratorischen Messung zunächst gründlich mit Wasser gespült und damit aufgefüllt. Mithilfe eines Wasserbads (siehe Abb. 7) wurde sie auf 37 °C eingestellt. Das Volumen jeder Messung, welches aus Mitochondrien und Atmungspuffer bestand, betrug 2 ml. Ein Magnetrührer sorgte für die stetige Durchmischung der Lösung in der Kammer. Zu Beginn der Messung wurde Atmungspuffer vorgelegt und abgewartet bis ein stabiles Signal entstand. Daraufhin wurden 400 µg Mitochondrien hinzugegeben und erneut gewartet, bis sich der Sauerstoffverbrauch stabilisiert hatte und sich der sogenannte State 1 eingestellt hatte. In diesem Zustand wird die Respiration bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff durch das Vorhandensein von ADP und Substrat limitiert. Als nächstes wurden 20 µl Pyruvat und Malat (5 mM), welche bekannt sind als Substrate der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, dem Komplex I der Atmungskette, mithilfe einer Hamilton-Spritze in die Messkammer injiziert und etwa 3 min abgewartet, bis sich ein State 2 etabliert hatte. Im State 2 wird die Atmung bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff und ADP nur durch das Vorhandensein von Substraten limitiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl ADP in jeweils 4 unterschiedlichen Konzentrationen (finale Konzentrationen): 30 µM, 100 µM, 300 µM und 1000 µM. Deren Zugabe erfolgte jeweils mit etwa 2 min Abstand zueinander, wodurch sich

der Sauerstoffverbrauch nach aufgebrauchtem ADP zunächst immer erst stabilisiert hatte, bevor die nächsthöhere Konzentration in die Messkammer zugeführt wurde. Nach Hinzufügen der maximalen ADP-Konzentration etablierte sich ein stabiler State 3, der Zustand, in dem die Elektronentransportkette und die ATP-Produktion an der F_1F_0 -ATPase am Ende der Atmungskette am stärksten stimuliert wurden. Am Ende des Messprotokolls wurden 10 μl Oligomycin, ein Hemmstoff der F_1F_0 -ATPase in die Messkammer hinzugefügt. Durch Hemmung der F_1F_0 -ATPase wurde der State 4, ein Zustand, in dem die Respiration in Abwesenheit von ADP gemessen wird, herbeigeführt. Dieser herbeigeführte State 4 ist kein physiologischer Zustand und dient ausschließlich zur Beurteilung der mitochondrialen Integrität, da die Restatmung, auch als „Leak-Atmung“ bezeichnet, Aufschluss über die regelrechte Funktion der inneren Mitochondrienmembran gibt, über die bei geschädigten Mitochondrien ein Protonenfluss stattfindet und eine sog. Leak-Atmung verursacht. Bei intakten Mitochondrien nimmt der Sauerstoffverbrauch im State 4 Werte in Größenordnung der State 2-Atmung an. Des Weiteren wurde der respiratorische Kontrollindex (RCR) bestimmt, der aus dem Verhältnis von State 3- und State 4- bzw. State 2 Atmung gebildet wird und ein weiteres Maß für die Kopplung und regelrechte Funktion von Mitochondrien darstellt. Dementsprechend deutet ein kleiner RCR auf geschädigte Mitochondrien hin. Die Erstbeschreibung der sogenannten States der Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien erfolgte 1955 durch die Autoren Chance und Williams (Chance et al, 1955).

Die Auswertung der mitochondrialen Atmungsmessung erfolgte mit dem Computerprogramm Oxygraph Plus, Version 1.02, demselben Programm, welches die Messung aufzeichnete, und Microsoft Excel 2010. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 6.01.

3.2.4 Messung von Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$)

Die Messung von Superoxidanionen-Radikalen erfolgte mithilfe der Elektronenspinresonanz Spektroskopie mit einem Bruker Spektrometer (ESP300e). Dabei diente die Substanz CMH (1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin), ein zyklisches Hydroxylamin, in einer Konzentration von 300 μM als Spin-Trap-Reagenz, welches in Anwesenheit von Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) oxidiert wird, wodurch ein detektierbares CM-Radikal entsteht. CMH wurde in 1 ml Wasser (20 min. mit N_2 entgast) und 1 μl DF, bzw. 5 μl DETC verdünnt. Vor jeder Messung wurden 12 μg Mitochondrien bei 37 °C mit Pyruvat bzw. Malat (5 mM) in 30 μl Atmungspuffer vorinkubiert. Für die jeweiligen Bedingungen (Pyruvat/Malat + Atmungspuffer, 100 μM ADP, 1

mM ADP, DNP, Antimycin A) mussten die jeweilige auf Eis gekühlte Substanz und jeweils 10 μl CMH unmittelbar vor der Messung hinzugefügt werden. Die Lösung wurde in eine 50 μl Quarz-Kapillare überführt, mit Silikonpaste verschlossen und in den Resonator positioniert. DNP ist als lipophile Substanz dazu in der Lage die Protonen über die innere Mitochondrienmembran wieder zurück in den Matrixraum zu transportieren und hebt somit das elektrochemische Potential der Atmungskette auf. Diese Substanz wird daher als Entkoppler bezeichnet, da der noch funktionierende Elektronentransport ohne die oxidativen Phosphorylierung, also ohne ATP-Produktion, stattfindet. Das Spektrometer wurde zu Beginn der Messung kalibriert, und zwar wurden die Parameter Time auf 20,48 Sekunden, Time constant auf 10,24 Sekunden, sowie die Phasenverschiebung auf 90° eingestellt. Die durch das Spektrometer dargestellten Linien bzw. die über diesen Linien ausgerechneten Integrale spiegeln in ihrer Intensität die Konzentration der Superoxidationen-Radikale wider. Die Aufzeichnung der Messung erfolgte mit dem Programm LilaX. Jede Messung für die jeweilige Bedingung dauerte 8 min. Bei der Auswertung, die mit dem Programm Medeia erfolgte, wurde das ESR-Signal des CM-Radikals anhand der Peak-to-Peak-Intensität und der Breite des jeweiligen Spektrums analysiert und zur Tempol-Referenz (100 μM) ins Verhältnis gesetzt. Die Werte wurden in Microsoft Excel 2010 erst gesammelt, dann wurde der Mittelwert ermittelt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 6.01.

3.2.5 Fluorometrische Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Um die H_2O_2 -Produktion der Mitochondrien zu quantifizieren, wurde der spezifische fluoreszierende Farbstoff Amplex®UltraRed (AUR) verwendet. Bei der Reaktion zwischen AUR und Wasserstoffperoxid, welche durch HPR (Horseradish Peroxidase) katalysiert wurde, entstand das fluoreszierende Resorufin in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit einer Exzitations-/Emissionswellenlänge von 535/590 nm. Die dabei verwendeten Konzentrationen betragen für AUR 50 μM , für HRP 0,5 U/ml und für SOD, welche die Konversion von $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 katalysiert, 100 U/ml. Die Messungen wurden bei 37°C in 96-well-Platten durchgeführt und dauerten 2 h mit einem Messintervall von jeweils 2 min. Es wurde für jede Bedingung (1 mM ADP, 5 μM FCCP, 15 μM Antimycin A, jeweils in Anwesenheit von 5 mM Pyruvat/Malat, wobei alle aufgeführten Substanzen in Atmungspuffer gelöst wurden) eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Anhand einer im Voraus durch definierte H_2O_2 -Werte erhaltenen Standardkurve, konnte so die H_2O_2 -Produktion quantifiziert werden. Anschließend wurde der Hintergrund für jede Bedingung, außer für die Antimycin A-Bedingung, für die ein eigener Hintergrund gemessen und abgezogen wurde, bestimmt und herausgerechnet. Die Auswertung erfolgte in

Microsoft Excel 2010, wobei durch die Fluoreszenz des Farbstoffs (angegeben in relative fluorescence units, RFU) die H₂O₂-Produktion pro Minute und pro Mikrogramm mitochondrialem Protein bestimmt werden konnte.

3.2.6 Myozytenisolation

Für die Myozytenisolation aus der Maus wurde das AfCS-Protokoll angewandt (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02). Pro Isolation wurden zunächst 250 ml des Perfusionspuffers hergestellt. Mittels pH-Meter und 1 M NaOH bzw. 1 M HCL konnte der pH-Wert auf 7,46 eingestellt werden. Weitere für die Isolation notwendigen Lösungen waren die Stopp- bzw. Liberase-Puffer (s. Abschnitt 3.1.4). Zunächst wurde der Maus 0,5 ml Heparin in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl, sowie 0,1 ml Rimadyl® in einer 1:15 Verdünnung mit 0,9% NaCl subkutan injiziert und für ca. 5 - 10 min einwirken gelassen. Rimadyl® bzw. der Wirkstoff Carprofen gehört zu der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika und wird in der Veterinärmedizin als Schmerzmittel eingesetzt. Während der Einwirkzeit konnte die Langendorff-Perfusionsanlage vorbereitet werden, indem man diese mit 250 ml Aqua dest. vorgespült hatte. Ein Schenkel der Anlage wurde mit Perfusionspuffer gefüllt, der zweite Schenkel mit Liberasepuffer (Abb.4). Nach der Einwirkzeit des Schmerzmittels wurde die Maus mit Isofluran (1,5 - 2 Vol% Isofluran und 0,5 l O₂/min) über einen Schlauch des Narkosesystems, der an die Schnauze der Maus gehalten wurde, betäubt. Sobald die Eigenreflexe der Maus erloschen waren, konnte, wie zuvor beschrieben (s. Abschnitt 3.2.1) das Herz durch eine Thorakotomie entnommen werden. Nach erfolgreicher Präparation und Entfernung des umliegenden Gewebes (Thymusreste und Lunge) konnte das Herz unter dem Auflichtmikroskop über die Aorta kanüliert, mit einem chirurgischen 5 - 0 Polyesterfaden fixiert und anschließend an die Perfusionsanlage angeschlossen werden, wo es dann 4 min lang mit Perfusionspuffer (2 ml/min) bei 37 °C gespült wurde. Im Anschluss wurde es mit dem Liberase-Puffer (2 ml/min) für 6 - 10 min gespült, bis ein ausreichender Verdau gewährleistet war. Als nächstes wurde das Herz unter den Vorhöfen abgetrennt und in eine 60-mm-Schale, welche mit 5 ml Perfusionspuffer befüllt war, gegeben. Es wurden vier Einschnitte gemacht und somit die Herzkammern eröffnet. Daraufhin wurde das Herz erneut in eine weitere 60-mm-Schale, welche zusätzlich zu den 5 ml Perfusionspuffer noch 5 ml Stopp-Puffer 1 enthielt, überführt, um es dort für ca. 5 min vorsichtig zu schwenken. Aus dieser Lösung wurde dann ein Tropfen heraus pipettiert, um unter dem Durchlichtmikroskop zu begutachten, ob die Myozytenisolation erfolgreich und ausreichend gewesen ist.

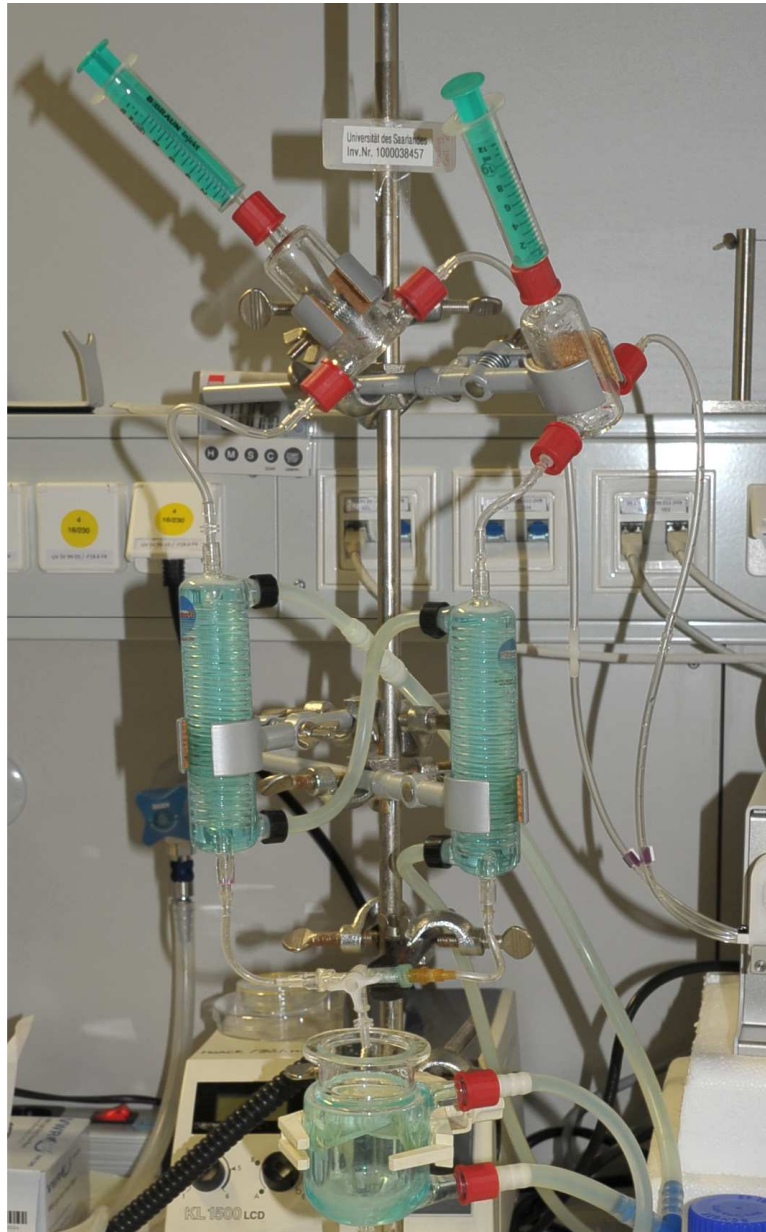


Abbildung 8: Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage

Das typische Bild, welches sich unter optimalen Bedingungen unter dem Durchlichtmikroskop zeigen sollte, sind stabförmige, quergestreifte Myozyten. Das restliche Herz wurde dann im nächsten Schritt entfernt und die übrige Myozytenlösung in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt, wo es für ca. 5 - 10 min sedimentieren gelassen wurde. Der Überstand wurde entnommen, in ein separates 15 ml Falcon Röhrchen überführt und eine Minute lang bei 800 U/min zentrifugiert. Zum ersten Pellet wurden 5 ml Stopp-Puffer 2 hinzugegeben und die

Lösung durch saches Schwenken resuspendiert. Zum zweiten Pellet, welches nach der Zentrifugation entstand, wurden ebenso 5 ml Stopp-Puffer 2 hinzugegeben und resuspendiert. Beide Pellets konnten nun in einem 100-mm-Schälchen zusammengeführt und der Kalziumaufbau der Myozyten, der wie im Folgenden beschrieben wird, begonnen werden:

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

Zwischen jedem dieser Schritte mussten 4 min gewartet und die Schale vorsichtig geschwenkt werden. Nach dem Kalziumaufbau wurde die Lösung in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 5 - 10 min sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde dann entnommen und bei 800 U/min zentrifugiert. Beide Pellets wurden daraufhin vereint. Zuletzt wurden 25 ml eines zuvor auf 37 °C gewärmten Mediums (Medium 199 mit 5% FCS, 1% Penicillin Streptomycin und 1% Hepes) zu den vereinten Pellets hinzugegeben. Die Myozyten wurden dann in dem beschriebenen Medium im Wärmeschrank bei 37 °C und 5% CO₂ Atmosphäre aufbewahrt, bis die Messung erfolgte. Für die nachträgliche Genotypisierung der Mäuse wurden jeweils ein Stück des Schwanzes und des Ohres post mortem abgeschnitten und bei -80 °C eingefroren.

3.2.7 Aufbau der Messanlage für die Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente

Mittels eines Auflichtfluoreszenzmikroskops der Firma Nikon sowie einer Anlage der Firma IonOptix, deren Zusammensetzung und Funktion im Folgenden näher erläutert wird, konnten sämtliche Experimente, wie z.B. die Myozytenzellverkürzung, mit den zuvor isolierten Myozyten durchgeführt und ebenso auf dem PC mit dem Programm IonWizard derselben Firma, dargestellt werden. Eine Übersicht über den Messplatz gibt Abb. 9.



Abbildung 9: Aufsichtfluoreszenzmikroskop und zuführende Gefäße zur Zugabe der verschiedenen Lösungen

Bevor die Experimente an der Myozytenverkürzungsanlage starteten, wurden die Myozyten für jeden Messvorgang mit dem Medium auf ein Deckgläschen, das im Voraus (mit einem Mindestabstand von 15 min) mit jeweils 4 μ l Laminin mittig benetzt worden war, übertragen. Um eine ausreichende Fixierung der Myozyten auf dem Deckgläschen zu gewährleisten, sollten weitere 5 min abgewartet werden. Währenddessen konnte das Deckgläschen schon einmal in die Versuchskammer eingelegt werden. Das Bild, welches sich unter dem Mikroskop darstellte, wurde durch eine spezielle Kamera, die Myocam-s, auf den Computerbildschirm in das speziell für diese Anwendung konzipierte Programm IonWizard projiziert. Dadurch war es möglich

diejenige Myozyte, die vorher am Mikroskop eingestellt worden war, während des gesamten Messprotokolls in Hinsicht auf die Sarkomerlänge, Verkürzungskinetik und Fluoreszenz zu analysieren, wobei die Fluoreszenz durch einen Photomultiplier (PMT) aufgezeichnet wurde.

Die Anregungslampe (Xenon Short Arc Lamp -75EX) am Auflichtfluoreszenzmikroskop ist durch Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge dazu in der Lage Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen, welche dann wiederum Licht einer anderen Wellenlänge emittieren, das durch spezielle Filter absorbiert werden kann. Abhängig vom jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die Myozyten inkubiert worden waren, mussten bestimmte Voreinstellungen an den Filtern des Mikroskops ausgeführt werden, sodass nur das erwünschte Spektrum an Licht aufgefangen wurde. Bei den NADP(H)/FAD-Messungen war eine Färbung der Myozyten nicht erforderlich, da diese Stoffe selbst fluoreszieren (autofluoreszent). Die folgende Tabelle (Tabelle 2) zeigt die verwendeten Autofluoreszenz- bzw. den Fluoreszenzfarbstoff mit ihren jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen:

Farbstoff	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450
FAD	FAD	485	525
MitoSOX-Red	$\cdot\text{O}_2^-$	385 - 405	579

Tabelle 3: Verwendete Autofluoreszenz- bzw. Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung des Redoxstatus und der Superoxid-Emission der Myozyte. λ_{exc} , Anregungswellenlänge; λ_{em} , Emissionswellenlänge

Für die Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H/FAD wurde das Licht der Anregungslampe durch zwei Filter (D340/12x und S490/20x), welche sich durch einen eingebauten Filterwechsler je nach Substrat (NAD(P)H/FAD) automatisch abwechselten, über einen dichroitischen Spiegel (89017bs F/TR) zur Messkammer und den darin enthaltenen Myozyten geleitet, um ebene Substrate zur Lichtemission anzuregen. Dieses daraufhin emittierte Licht gelang über einen weiteren Spiegel (650DCXR), welcher Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda > 650$ nm passieren ließ, zu den Photomultiplier Röhren (PMT). Das Durchlicht des Mikroskops hingegen passierte diesen Spiegel und gelang somit zur Myocam-s, durch welche die abgebildete Myozyte auf den Computer in das Programm IonWizard übertragen wurde. Auf diese Art und Weise konnte die Sarkomerlänge und -verkürzung aufgezeichnet und nach dem Experiment zur Auswertung herangezogen werden. Der nächste Spiegel (490 DCLP) im Strahlengang leitete das Licht mit der Wellenlänge $\lambda < 490$ nm zu dem PMT 1, wo die Fluoreszenz von NAD(P)H gemessen

wurde, während es Licht mit größerer Wellenlänge zum PMT 2, wo die Fluoreszenz von FAD gemessen wurde, zuführte. Vor PMT 1 war zusätzlich der Filter D435/35 zur Signaleinschränkung vorgeschaltet, vor PMT 2 der Filter 525/30.

Die Anwendung des Farbstoffs MitoSOX-Red diente zur Detektion von Superoxidanionen-Radikalen in Myozyten. Dieser Farbstoff reichert sich bekanntermaßen in den Mitochondrien der Myozyten an, wird in Anwesenheit von Superoxidanionen-Radikalen oxidiert und fluoresziert rot (Mukhopadhyay, Rajesh, Yoshihiro, Haskó, & Pacher, 2007). Auch bei diesem Experiment musste zunächst einmal das anregende Licht über einen Filter ($D380\pm 15$) und dem zuvor beschriebenen dichroitischen Spiegel, zur Messkammer geleitet werden. Die Lichtemission des fluoreszierenden Farbstoffs MitoSOX-Red gelang zunächst über den Spiegel (650DCXR) zu zwei weiteren Spiegeln (440 DCLP und 515 DCXR) und letztendlich zum PMT 3, vor dem ein Filter (D605/55) zur Einschränkung des Signals vorgeschaltet war. Das Durchlicht des Mikroskops passierte auch bei diesem Experiment wieder den Spiegel 650 DCXR und wurde somit zur Myocam-s geleitet. Die Photomultiplier, denen das emittierte Licht der fluoreszierenden (Farb-)Stoffe zugeleitet wurde, detektierten und verstärkten das Lichtsignal und wandelten es in eine Spannung um, welche wiederum durch das Fluoreszenz System Interface (IonOptix) aufgenommen und auf dem Computer im zugehörigen Programm IonWizard visualisiert wurde. Weiterhin gehörte zum Aufbau der Messanlage eine spezielle Vorrichtung mit Gefäßen, welche direkt mit der Messkammer in Verbindung stand. Diese Gefäße beinhalteten verschiedene Lösungen, die während des Zuführens zur Messkammer durch eine am Mikroskop angebrachte Heizung auf 37 °C erwärmt wurden. Für jedes Experiment gab es ein unterschiedliches Messprotokoll. Sowohl für die Messung der Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD, als auch für die Messung von Superoxid mittels MitoSOX-Red, musste zuvor eine Normaltyrode (NT₁ und NT₂) angesetzt werden. Beide Lösungen wurden bei Raumtemperatur mittels 1 M NaOH bzw. 1 M HCL auf einen pH-Wert von 7,4 titriert, bevor CaCl₂ hinzugegeben wurde. NT₁ wurde für die Messung der Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD, NT₂ für die Messung von Superoxid herangezogen. Die Normaltyroden unterschieden sich im Wesentlichen nur dadurch, dass in NT₂ keine antioxidativ wirkenden Substanzen, welche das Messergebnis beeinflussen würden, enthalten waren.

3.2.8 Messprotokoll der Fluoreszenz- und Myozytenverkürzungsexperimente

Jeder Messvorgang begann mit einer 0,5 Hz Feldstimulation unter gleichzeitiger Zuleitung der NT₁- bzw. NT₂- Lösung für 120 Sek. und sollte die Arbeitslast der Kardiomyozyte unter

Ruhebedingungen darstellen. Nach Verstreichen der ersten 120 Sek. wurde Isoprenalin mit einer finalen Konzentration von 3×10^{-8} in die NT-Lösung eingewaschen und diente zur β -adrenergen Stimulation der Myozyte, welche sich durch Zunahme der Kontraktionsamplitude präsentierte. Sobald diese Zunahme beobachtet werden konnte, wurde die Feldstimulation für 180 Sek. auf 5 Hz erhöht, um eine physiologische Arbeitslasterhöhung und Stresssituation für die Kardiomyozyte zu simulieren. Nach Ablauf der 180 Sek. wurde die Stimulationsfrequenz wieder auf 0,5 Hz zurückgestellt und um das Isoprenalin auszuwaschen wieder NT für 60 Sek. zur Messkammer zugeführt. Erst dann erfolgte die Kalibrierung der jeweiligen Messung, welche für jedes Experiment unterschiedlich war. So folgte dem Auswaschen von Isoprenalin bei der Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H/FAD das Zuführen von:

- 5 μ M FCCP bis ein stabiles Plateau entstanden ist,
- 4 mM Cyanid bis ein stabiles Plateau entstanden ist,
- 10 mM H_2O_2

FCCP ist ein sogenanntes Ionophor und als solches entkoppelt es die mitochondriale ATP-Synthese vollständig von der Elektronentransportkette (Heytler & Prichard, 1962), sodass alle Redoxäquivalente im oxidierten Zustand vorliegen. Im Gegensatz dazu liegen bei der Anwendung von Cyanid alle Redoxäquivalente im reduzierten Zustand vor, da es durch Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase, dem sog. Komplex IV der Atmungskette, zu einem Elektronenstau vor Komplex IV kommt. H_2O_2 führt zur vollständigen Oxidation der Redoxäquivalente. Sollte es zu einer unterschiedlichen Fluoreszenz von NAD(P)H unter H_2O_2 als unter FCCP kommen, so deutet dies auf eine reduzierte bzw. fehlende Expression der NNT hin.

Bei der Messung der Sauerstoffradikale mit MitoSOX-Red hingegen erfolgte die Kalibrierung mit 150 μ M Antimycin A (gelöst in Ethanol), einem Hemmstoff der Cytochrom-c-Reduktase (Teil des Komplex III der Atmungskette), welcher bekanntermaßen die mitochondriale Superoxid-Produktion anregt (Mukhopadhyay et al., 2007). Bei Anwendung von Antimycin A wäre demnach eine maximale Fluoreszenz des Farbstoffs zu erwarten gewesen.

Mithilfe der Autofluoreszenzmessung von NAD(P)H/FAD war es möglich den sog. Redoxstatus der Myozyte, der sich aus dem Verhältnis der Intensitäten der Fluoreszenz dieser Redoxäquivalente zueinander ergibt, zu erfassen. Darüber hinaus stellt das ratiometrische Verhältnis von NAD(P)H/FAD einen äußerst sensitiven Parameter dar, da es die Elimination von

Bewegungsartefakten der Myozyten auf die Fluoreszenz ermöglicht (Kohlhaas et al., 2010). So ließen sich Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zelle ziehen, wobei eine Verschiebung in Richtung Oxidation auf einen erhöhten Umsatz deutet (Skala & Ramanujam, 2010). In Mitochondrien fungiert das vor allem aus dem Citratzyklus stammende NADH primär als Elektronendonator an Komplex I der Atmungskette und besitzt ein Exzitations- bzw. Emissionsmaximum bei 350 nm bzw. 460 nm. FAD, ein Elektronenakzeptor, bzw. das damit indirekt bestimmte FADH₂, welches ebenfalls aus dem Citratzyklus stammt und seine Elektronen an Komplex II der Atmungskette abgibt, besitzt ein Exzitations- bzw. Emissionsmaximum bei 485 nm bzw. 525 nm. Zum Schluss erfolgte die wie schon beschriebene Kalibrierung mit 5 µM FCCP, 4 mM Cyanid und H₂O₂, um einen vollständig oxidierten bzw. reduzierten Zustand der Myozyte zu erreichen.

Zur quantitativen Bestimmung der Superoxid-Produktion wurde der Farbstoff MitoSOX-Red, welcher sich selektiv in den Mitochondrien anreichert, verwendet. Zunächst einmal wurde etwa 1 ml Zellsuspension aus dem Medium im Wärmeschrank entnommen, in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und für 5 min sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde daraufhin abpipettiert und das Gefäß mit 1 ml NT₂ aufgefüllt. Es wurde 1 µl des Farbstoffs MitoSOX-Red, welcher in dem Lösungsmittel Pluronic angesetzt worden war (20 µl Pluronic auf 50 µg MitoSOX-Red), hinzu pipettiert und anschließend erst für etwa 20 min liegend und daraufhin für etwa 5 min stehend im Wärmeschrank inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Hinzufügen von 1 ml NT₂ waren die Zellen bereit für die Messung.

3.3 Auswertung und Statistik der Messergebnisse

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden zunächst alle Werte in Microsoft Excel 2010 übertragen, gesammelt und sortiert. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 6.01.

Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten t-Test bzw. einer two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni posttest bestimmt. Statistisch signifikant waren hierbei diejenigen Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM = Varianz) der jeweiligen Einzelwerte dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Experimente an isolierten Mitochondrien aus unbehandelten WT und STAT3-KO Mäusen

4.1.1 Respiratorische Messung an isolierten Mitochondrien

Der Sauerstoffverbrauch an den Mitochondrien konnte mithilfe der Clark-Elektrode bestimmt werden. Exemplarisch sei hier eine Messung dargestellt, anhand derer der Ablauf der respiratorischen Messung verdeutlicht werden soll (Abb. 10). Zu sehen ist der Sauerstoffverbrauch in nmol/ml zu den jeweils beschriebenen Bedingungen (s. Abschnitt 3.2.3).

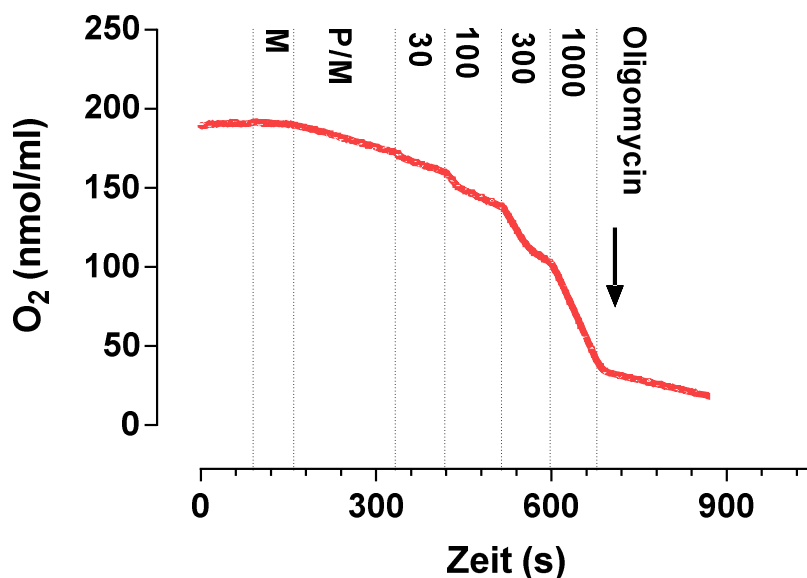


Abbildung 10: Exemplarisches Beispiel einer respiratorischen Messung mittels Clark Elektrode. Basaler Sauerstoffgehalt in nmol/ml ohne Zusatz von Substraten (M) und nach Hinzugabe von Pyruvat und Malat als Substrate für Komplex I der Atmungskette (P/M). Stimulierte Respiration nach Hinzugabe von ADP in aufsteigenden Konzentrationen (in $\mu\text{mol/L}$), wobei der O_2 Verbrauch (=Abnahme) bei $1000 \mu\text{mol/L}$ (= 1 mM) ADP maximal stimuliert wurde. Kontrolle der mitochondrialen Integrität mittels Oligomycin ($1,2 \mu\text{M}$).

Zunächst wurde der Sauerstoffgehalt in der Messkammer ohne Zusatz jeglicher Substrate bzw. Hemmstoffe, der sog. State 1, erfasst (M). Daraufhin folgte die Hinzugabe der Substrate des Komplex I der Atmungskette, Pyruvat (5 mM) und Malat (5 mM), um den sog. State 2 zu etablieren (P/M). Anschließend wurde ADP in aufsteigenden Konzentrationen (30 bis $1000 \mu\text{M}$)

hinzugefügt, um eine geringe, mittlere und maximale Geschwindigkeit des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette zu stimulieren. Abschließend wurde nach jeder Messung Oligomycin, ein Hemmstoff der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase, in die Messkammer hinzugeführt, wodurch der O_2 Verbrauch trotz der Anwesenheit von ADP inhibiert wurde auf Werte wie in der Abwesenheit von ADP. Durch diese Kontrolle konnte der Kopplungszustand der Atmungskette überprüft werden. Abb. 11 stellt die Ergebnisse der respiratorischen Messung an Mitochondrien aus den WT und STAT3-KO Mäusen als Säulendiagramm dar.

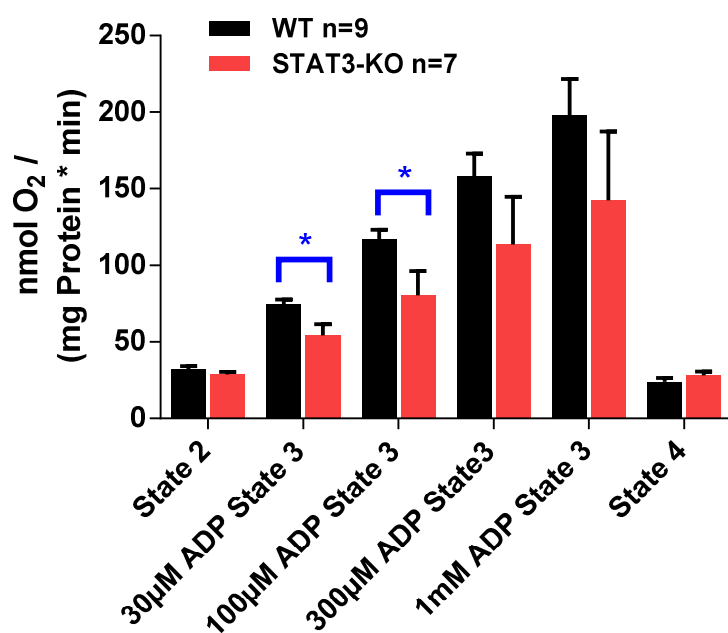


Abbildung 11: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen ohne Behandlung mit Bromocriptin. Signifikante Unterschiede zwischen WT (n=9) und STAT3-KO (n=7) traten bei 30 μ M ADP und 100 μ M ADP auf. * $p < 0,05$ (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Hierbei zeigte sich zunächst unter Hinzugabe von Pyruvat bzw. Malat (State 2) kein Unterschied im Verbrauch von Sauerstoff. Erst nachdem ADP hinzugefügt wurde, stieg in beiden Versuchsgruppen der Sauerstoffverbrauch deutlich auf bis zu ca. **198 nmol O_2 /mg Protein*min** in WT und ca. **142 nmol O_2 /mg Protein*min** in STAT3-KO Mitochondrien (1 mM ADP) an. Während des sog. State 3 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO Mäusen (30 μ M ADP: **74,62** WT vs. **54,31** STAT3-KO. 100 μ M ADP: **117,03** WT vs. **80,37** STAT3-KO; $p < 0,05$), welche allerdings unter den nächsthöheren Konzentrationen von ADP nicht mehr signifikant waren. Nach Anwendung von Oligomycin fiel der Sauerstoffverbrauch

wieder auf die Ausgangswerte, wie er unter State 2 Bedingungen lag, ab. Die dabei noch zu messende Restatmung (State 4) war in beiden Gruppen vergleichbar.

Setzt man den Sauerstoffverbrauch im State 3 zu dem in State 2 bzw. State 4 ins Verhältnis, so erhält man den sog. Respiratorischen Kontrollindex (RCR). Dieser gilt als Maß für die Kopplung von Elektronentransport und der Oxidativen Phosphorylierung und gibt Aufschluss über die Funktionsfähigkeit von Mitochondrien. Dabei zeigte sich unter 100 μM ADP ein signifikanter Unterschied im RCR zwischen WT und STAT3-KO Mäusen (Abb. 12 A: RCR State 2: **4,35** WT vs. **2,29** STAT3-KO. Abb. 12 B: RCR State 4: **8,1** WT vs. **2,76** STAT3-KO; $p < 0,005$). Generell sind die RCR-Raten im Vergleich zum WT bei den STAT3-KO Mäusen niedriger.

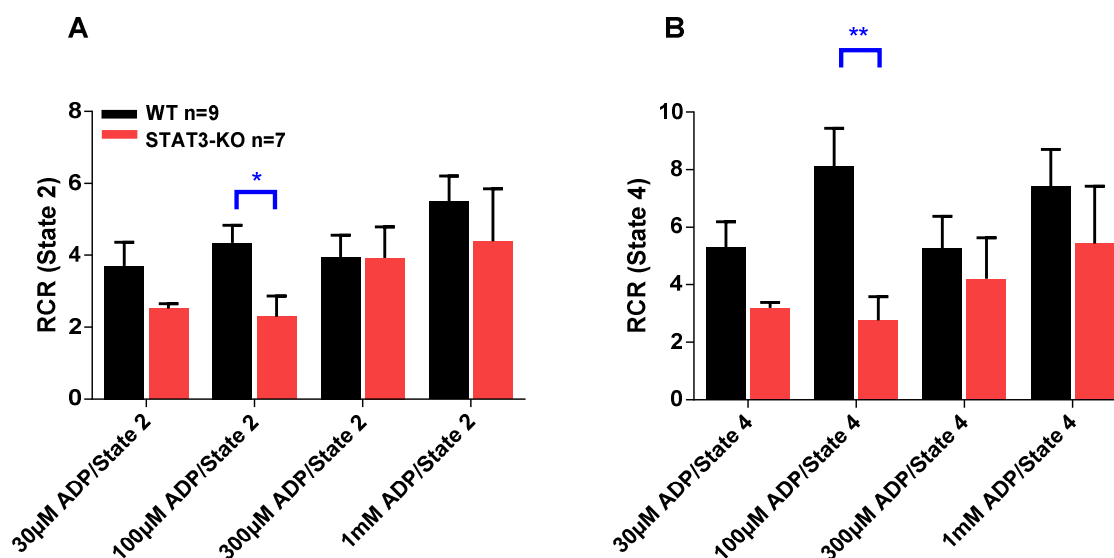


Abbildung 12: Respiratorischer Kontrollindex von postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen aus dem Verhältnis (A) State 3/State 2-Respiration und (B) State 3/State 4-Respiration. Mithilfe des RCR lässt sich der Koppelungszustand der Mitochondrien erfassen. Dabei ist der RCR in den STAT3-KO (n=7) Mäusen tendenziell geringer als in der WT-Kontrolle (n=7) und weist signifikante Unterschiede unter Zugabe von 100 μM ADP auf. * $p < 0,05$ (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

4.1.2 Messung der mitochondrialen Superoxid-Emission

Die Messung von Superoxid erfolgte mit der ESR-Spektroskopie mit der Substanz CMH, durch welche sich Radikale detektieren lassen. In Abb. 13 wird gemessenes Superoxid in $\text{pmol} \cdot \text{O}_2^- / \text{min}$ zu den bereits beschriebenen Bedingungen als Säulendiagramm dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass im State 2 signifikant mehr Superoxid in den STAT3-KO Mitochondrien

als in den WT Mitochondrien gemessen werden konnte (**8,35** STAT3-KO vs. **6,06** WT; $p < 0,05$). Der Unterschied war dann jedoch während des State 3 (100 μ M ADP bzw. 1 mM ADP) und auch nach Gabe von DNP bzw. Antimycin A nicht mehr signifikant. Wie zu erwarten stieg die Superoxidrate in beiden Gruppen gleichermaßen an, nachdem der Entkoppler DNP und der Hemmstoff des Elektronentransports Antimycin A zugesetzt worden waren.

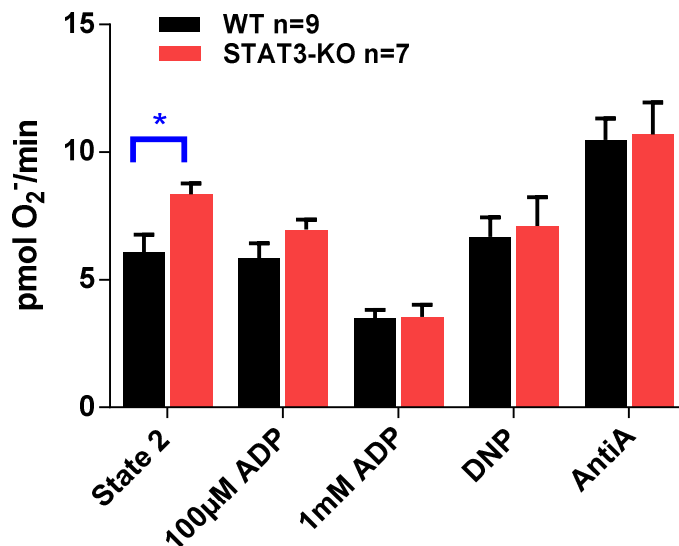


Abbildung 13: Superoxid-Produktion in pmol ·O₂^{·-}/min in postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen mithilfe der ESR-Spektroskopie. Unter basaler Respiration, d.h. nach Hinzugabe von Pyruvat und Malat (State 2) stellte sich ein signifikanter Unterschied in der Superoxid-Emission zwischen WT (n=9) und STAT3-KO (n=7) Mäusen dar.* $p < 0,05$ (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

In Abb. 14 wird zusätzlich die Rate an gemessenem Superoxid zum Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von WT und STAT3-KO Mäusen ins Verhältnis gesetzt. Dies verdeutlichte die Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen. Insbesondere war auch hier die Superoxidrate bezogen auf die Atmung sowohl im State 2, als auch im State 3 signifikant höher in STAT3-KO (State 2: **0,29** STAT3-KO vs. **0,2** WT. 100 μ M ADP: **0,18** STAT3-KO vs. **0,05** WT; $p < 0,05$).

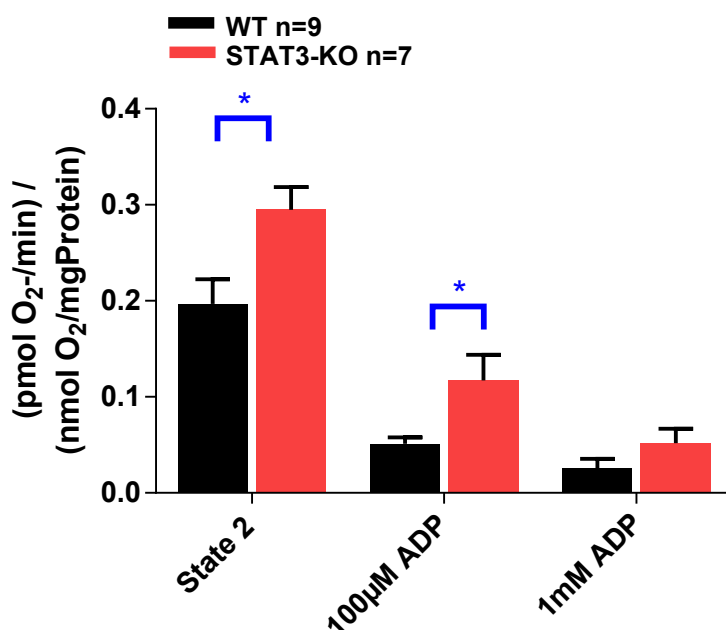


Abbildung 14: Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in (pmol \cdot O₂⁻/min)/(nmol O₂/mg Protein) in postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen. Die STAT3-KO (n=7) Mäuse wiesen im Vergleich zur WT-Kontrolle (n=9) eine sowohl im State 2, als auch im State 3 bei 100 µM ADP signifikant höhere Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch auf. *p < 0,05 (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

4.1.3 Fluorometrische Messung der mitochondrialen Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Emission

Mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Amplex®UltraRed (AUR) konnte die H₂O₂-Emission aus Mitochondrien von WT und STAT3-KO Mäusen quantifiziert werden. Wie Abb. 15 zeigt, zeichneten sich deutliche Unterschiede sowohl im State 2 (**19,55** WT vs. **16,86** STAT3-KO; p < 0,05), als auch im State 3, und hier vor allem bei höheren ADP-Konzentrationen, zwischen den untersuchten Versuchsgruppen ab (300 µM ADP: **16,16** WT vs. **13,52** STAT3-KO. 1 mM ADP: **14,03** WT vs. **10,44** STAT3-KO; p < 0,05). Demzufolge bestand bei den KO-Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen eine Tendenz zu geringerer H₂O₂-Emission. Weiterhin ist zu erkennen, dass die H₂O₂-Emission mit steigenden ADP-Konzentrationen abfällt, was sich dadurch erklären lässt, dass die Entstehung von ROS im oxidierten Zustand der ETC zunächst verringert wird. Wie zu erwarten stieg nach Hinzufügen des mitochondrialen Entkopplers DNP in beiden Gruppen die Menge an H₂O₂ an, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

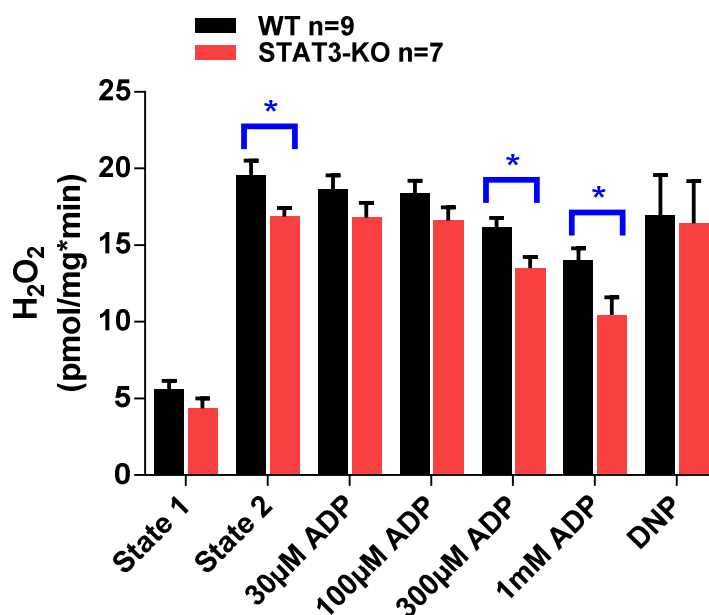


Abbildung 15: H₂O₂-Gehalt in pmol/mg*min in WT und STAT3-KO Mäusen. In den STAT3-KO Mäusen (n=7) wurde im State 2 und im State 3 bei jeweils 300 µM und 1mM ADP signifikant weniger H₂O₂ gemessen als in der WT-Kontrolle (n=9). *p < 0,05 (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

Auch im Rahmen der Quantifizierung von H₂O₂ wurden die Ergebnisse des H₂O₂-Emission in Relation zum Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von WT und STAT3-KO gesetzt, um zu sehen, wie sich der Redoxstatus der ETC auf die Produktion von H₂O₂ auswirkt, wodurch sich die folgenden in Abb. 16 dargestellten Verhältnisse ergaben. Während die absoluten Werte für den in Abb. 15 dargestellten H₂O₂-Gehalt in den Mitochondrien noch in beiden Gruppen im State 2 signifikant unterschiedlich waren, so waren diese Unterschiede relativ zur Atmung der beiden Versuchsgruppen aufgehoben. Ganz im Gegenteil schienen die STAT3-KO Mäuse signifikant mehr H₂O₂ pro nmol O₂/mgProtein zu emittieren als ihre WT-Geschwistertiere (30 µM ADP: **0,36** STAT3-KO vs. **0,25** WT. 100 µM ADP: **0,29** STAT3-KO vs. **0,16** WT; p < 0,05). Diese sich deutlich abzeichnenden Unterschiede blieben bis zur höchsten ADP-Konzentration erhalten, jedoch waren sie bei 300 µM und 1 mM ADP nicht mehr signifikant.

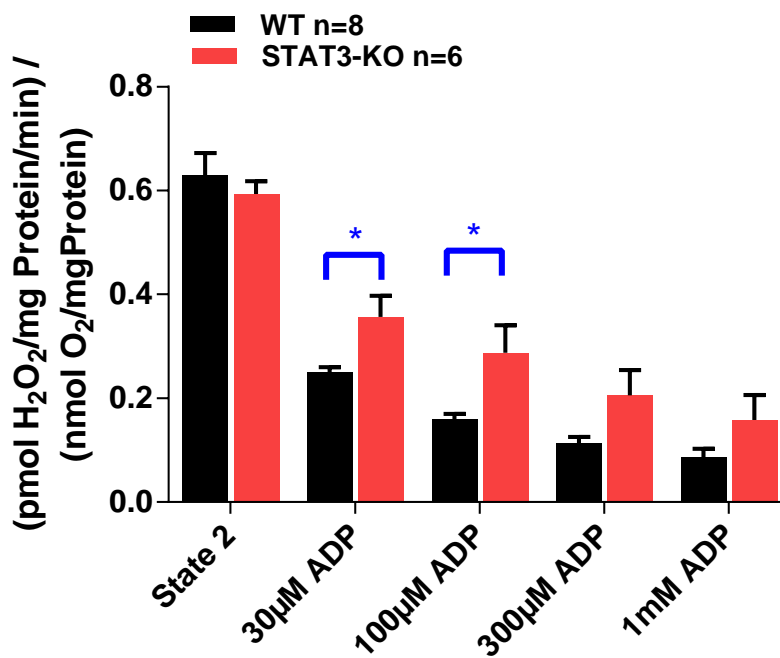


Abbildung 16: H₂O₂-Emission im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in (pmol H₂O₂/mg Protein/min)/(nmol O₂/mg Protein) in WT und STAT3-KO Mäusen. Das Verhältnis der H₂O₂-Emission zum Sauerstoffverbrauch zeigt in STAT3-KO Mäusen (n=6) deutlich höhere Werte im State 3 bei jeweils 30 µM und 100 µM ADP als in der WT-Kontrolle (n=8). *p < 0,05 (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

Zusammenfassend konnte also bei den STAT3-KO Mäusen die Tendenz zu einer höheren absoluten Superoxid-Produktion einerseits, und einer niedrigeren H₂O₂-Generierung andererseits, beobachtet werden. Um diese Beobachtung zu verdeutlichen wurden die Ergebnisse der H₂O₂- und ·O₂⁻-Messungen zueinander ins Verhältnis gesetzt und zwischen beiden Versuchsgruppen miteinander verglichen. Da das in den Mitochondrien anfallende Radikal ·O₂⁻ von sog. Dismutasen, speziell der in Mitochondrien vorkommenden manganhaltigen Superoxidismutase (Mn-SOD) in einer enzymatischen Reaktion zu H₂O₂ umgewandelt wird (Abb. 17), spiegelt der Quotient zwischen H₂O₂/·O₂⁻ die Aktivität der Mn-SOD wider. Gemessen an diesem Verhältnis ist die Aktivität der Mn-SOD in Mitochondrien der STAT3-KO Mäuse signifikant geringer als in denen der WT Mäuse (Abb.18).



Abbildung 17: Reaktionsgleichung zur Darstellung der Dismutation von Superoxid ·O₂⁻ und Wasserstoff H⁺ zu Wasserstoffperoxid H₂O₂ und Sauerstoff O₂ durch die mitochondriale Mn-SOD.

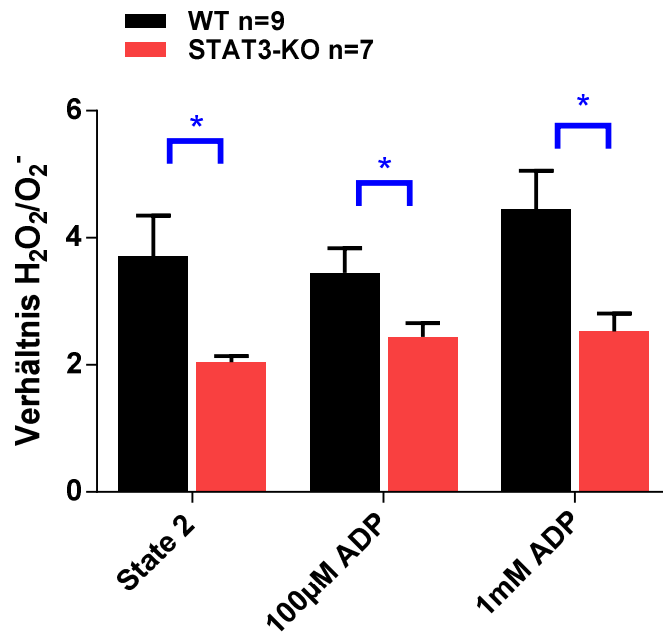


Abbildung 18: Verhältnis von H_2O_2 zu $\cdot\text{O}_2^-$ als Marker für die Mn-SOD-Aktivität in Mitochondrien von WT und STAT3-KO Mäusen. In STAT3-KO Mäusen (n=7) ist die Aktivität der Mn-SOD im Vergleich zur WT-Kontrolle (n=9) deutlich sowohl unter basaler Respiration im State 2, als auch im State 3 bei 100 μM und 1 mM ADP herunterreguliert. * $p < 0,05$ (Ungepaarter t-Test). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

4.2 Experimente an isolierten Mitochondrien aus WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin

4.2.1 Respiratorische Messung an isolierten Mitochondrien

Abb. 19 stellt die Ergebnisse der respiratorischen Messung an Mitochondrien aus den mit Bromocriptin behandelten WT und STAT3-KO Mäusen als Säulendiagramm dar. Wie darauf zu erkennen ist, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten WT und STAT3-KO Mäusen. Der Sauerstoffverbrauch im State 2 war in beiden Versuchsgruppen annähernd vergleichbar (34,64 WT+B vs. 39,32 STAT3-KO+B) und stieg im State 3 unter steigender ADP-Konzentration gleichermaßen an, wobei er unter 1 mM ADP maximal war (233,22 WT+B vs. 280,03 STAT3+B).

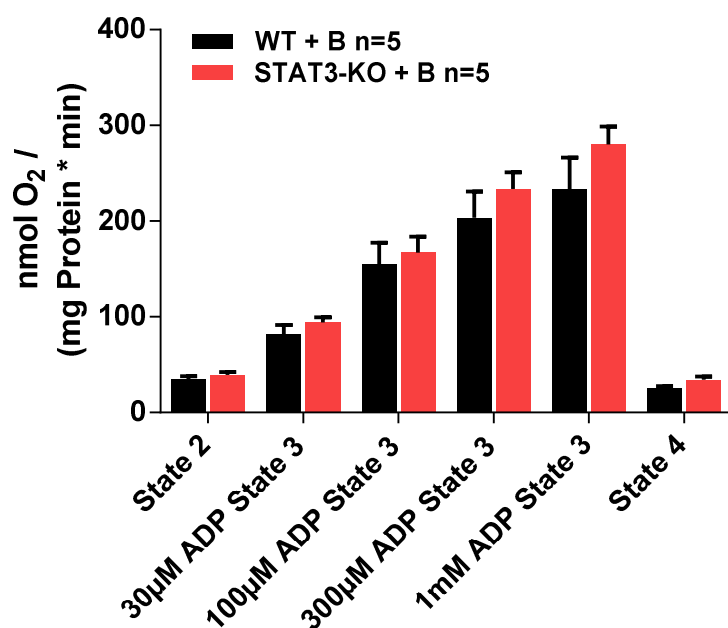


Abbildung 19: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Es stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT (n=5) und STAT3-KO (n=5) Mäusen heraus. Der Sauerstoffverbrauch nach Behandlung mit Bromocriptin war in beiden Gruppen annähernd gleich. Bromocriptin wurde 7 Tage vor bis 14 Tage nach jeweils jeder Entbindung verabreicht. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

Der Respiratorische Kontrollindex der behandelten WT und STAT3-KO Mäuse zeigte folglich auch keine signifikanten Differenzen, die Werte der beiden Versuchsgruppen waren sowohl für den RCR State 2, als auch für den RCR State 4 annähernd gleich (Abb. 20 A,B).

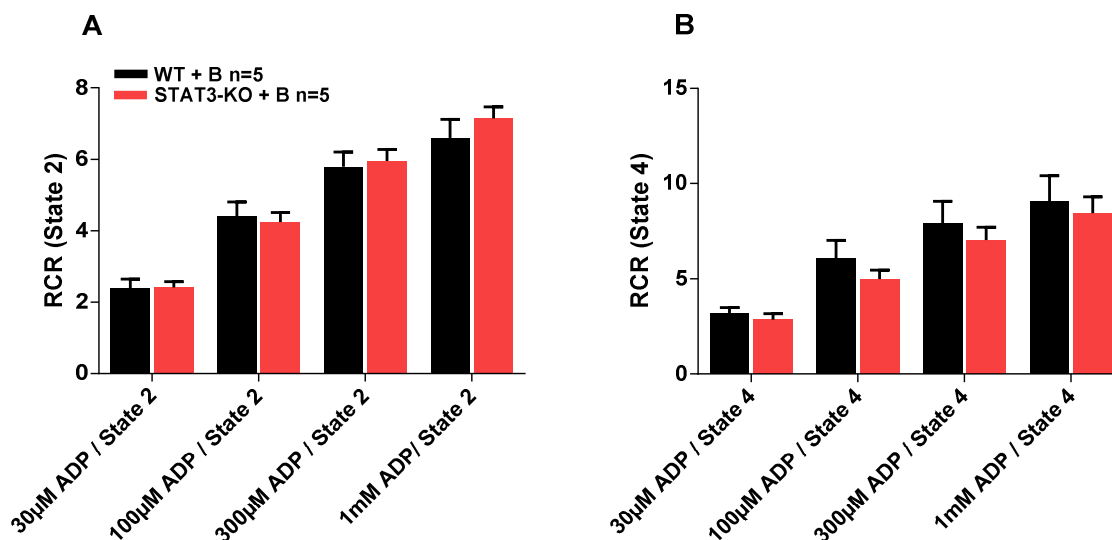


Abbildung 20: Respiratorischer Kontrollindex von postpartalen WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin aus dem Verhältnis (A) State 3/State 2-Respiration und (B) State 3/State 4-Respiration. Es stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT (n=5) und STAT3-KO (n=5) Mäusen heraus. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

In Abb. 21 A wird die Respiration der behandelten und der unbehandelten WT-Versuchsgruppe im direkten Vergleich dargestellt. Dabei zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Atmungskapazität. Im Gegensatz dazu ergaben sich signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zwischen den behandelten- gegenüber den unbehandelten STAT3-KO Mäusen, welche in Abb. 21 B dargestellt werden. Dabei zeigte die mit Bromocriptin behandelte STAT3-KO Gruppe im State 3 deutlich gesteigerte Respirationsraten als die unbehandelte Vergleichsgruppe (1 mM ADP: **280,03** STAT3-KO+B vs. **142,46** STAT3-KO).

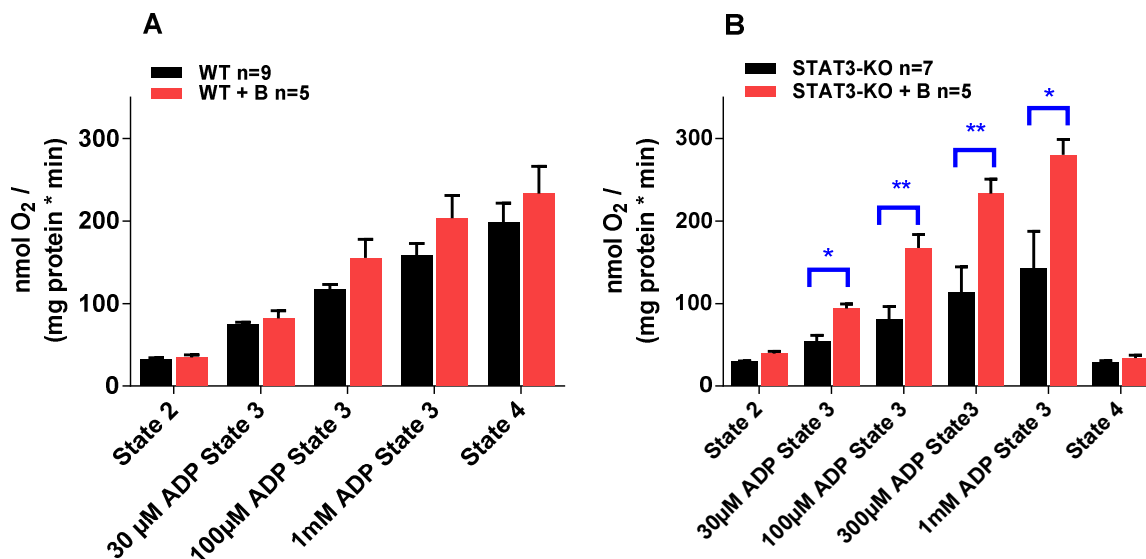


Abbildung 21: Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Der Sauerstoffverbrauch von unbehandelten WT (n=9) im Vergleich zu den behandelten WT (n=9) Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede (A). Der Vergleich zwischen unbehandelten STAT3-KO (n=7) und behandelten STAT3-KO (n=5) Mäusen ergab im State 3 signifikante Unterschiede (B). *p < 0,05 (Two-way-Anova). **p < 0,005 (Two-way-Anova). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

4.2.2 Messung der mitochondrialen Superoxid-Emission

Bei der Messung von Superoxid mittels ESR-Spektroskopie in behandelten WT und STAT3-KO Mäusen kristallisiert sich bisher nur eine Tendenz zu erhöhter Superoxid-Emission in STAT3-KO Mäusen im State 2 heraus, jedoch können bei der geringen n-Zahl keine deutlichen Unterschiede, insbesondere im physiologisch relevanten Bereich (100 µM, 1 mM) ausgemacht werden (Abb. 22). Im State 3 gleichen sich die zwei Gruppen hinsichtlich der Superoxid-Emission wieder aneinander an. Nach Hinzugabe von DNP wurde ebenso vermehrt Superoxid in STAT3-KO Mäusen als in der WT-Kontrolle gemessen (Abb. 22 A).

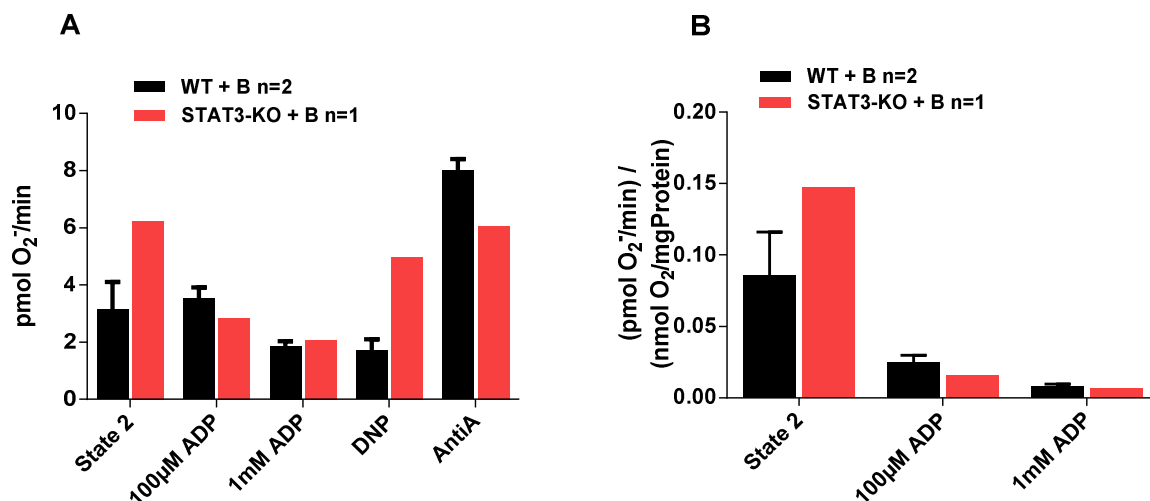


Abbildung 22: Superoxid-Produktion in pmol · O₂⁻/min (A) und Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in (pmol · O₂⁻ /min)/(nmol O₂/mg Protein) (B) in postpartalen WT- und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Erste Daten zur Superoxid-Emission in behandelten WT (n=2) und STAT3-KO (n=1) Mäusen zeigen eine Tendenz zu mehr Superoxid in STAT3-KO Mäusen unter basaler Respiration im State 2, welche sich im State 3 an die Menge in der WT-Kontrolle angleicht. Dies gilt sowohl für die absolute Superoxid-Produktion (A), als auch für die Superoxid-Produktion im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch (B). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

4.2.3 Fluorometrische Messung der mitochondrialen Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Emission

Es ergaben sich keine Unterschiede in der H₂O₂-Emission zwischen Bromocriptin-behandelten WT und STAT3-KO Mäusen (Abb. 23 A). Die Menge an H₂O₂ war sowohl im State 2 als auch im State 3 in beiden Gruppen auf demselben Niveau und stieg unter DNP-Gabe gleichermaßen an. Auch die zuvor in unbehandelten Tieren gemessenen Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO waren aufgehoben. Das Verhältnis von H₂O₂ zur Respiration (Abb. 23 B) veranschaulicht, dass die größte Menge an H₂O₂ pro O₂ Verbrauch während des State 2 entsteht (**0,4** WT+B vs. **0,29** STAT3-KO+B) und dass sie mit steigender ADP-Konzentration, und damit einhergehendem schneller ablaufendem Elektronentransport immer weiter abnimmt, sodass sie bei 1 mM ADP den niedrigsten Wert erreicht (**0,05** WT+B vs. **0,04** STAT3-KO+B).

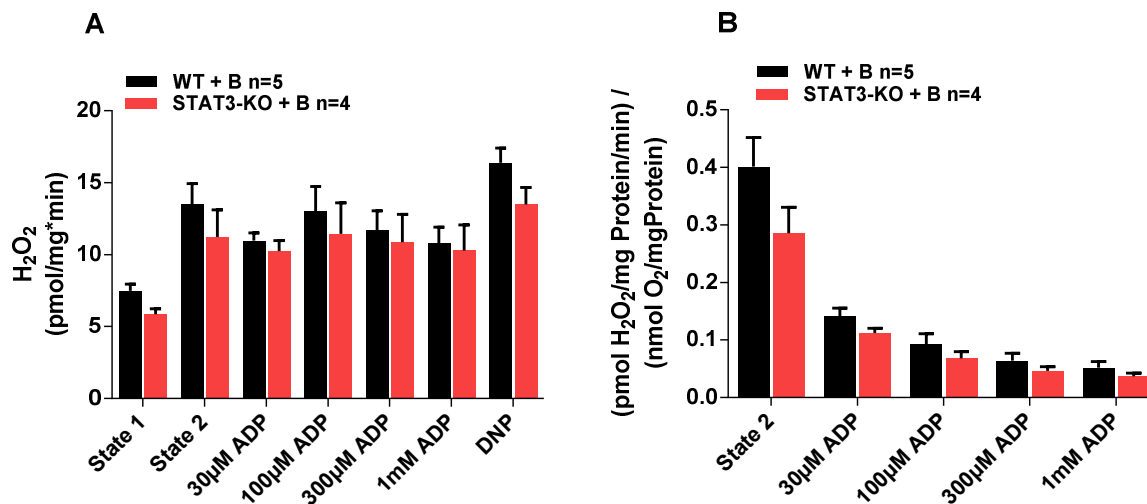


Abbildung 23: H₂O₂-Gehalt in pmol/mg*min (A) und H₂O₂-Emission im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch in (pmol H₂O₂/mg Protein/min)/(nmol O₂/mg Protein) (B) in WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Die H₂O₂-Messung in behandelten WT (n=5) und STAT3-KO (n=4) Mäusen erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

4.3 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente an unbehandelten STAT3-KO und WT Mäusemyozyten

4.3.1 Zellverkürzungsmessungen

Anhand der Aufzeichnung der Zellverkürzungsmessung an der IonOptix-Anlage mit dem dazugehörigen Computerprogramm war es möglich die Kontraktilität der Myozyten zu jedem beliebigen Zeitpunkt des Experiments zu analysieren. Wir entschieden uns für vier feste Zeitpunkte, zu denen wir die Kontraktionen der Myozyten der eingangs beschriebenen Versuchsgruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale, die im Folgenden näher erläutert werden, verglichen:

1. 10 – 15 Kontraktionen nach ca. 100 Sek. unter gleichzeitigem Zufluss von NT₁-Lösung und einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz
2. Die letzten 3 Kontraktionen unter gleichzeitigem Zufluss von NT₁-Lösung und Isoprenalin (30 nM) und einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, wobei die Kontraktionsamplitude der Myozyte durch den β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin schon sichtbar vergrößert sein sollte
3. Die letzten 10 – 15 Kontraktionen vor Beendigung der 5 Hz Belastungs-Phase
4. 10 Kontraktionen ca. 60 Sek. nach Senkung der Stimulation auf die Ausgangsfrequenz von 0,5 Hz, wobei nur NT₁-Lösung hinzugegeben wurde, um das Isoprenalin auszuwaschen.

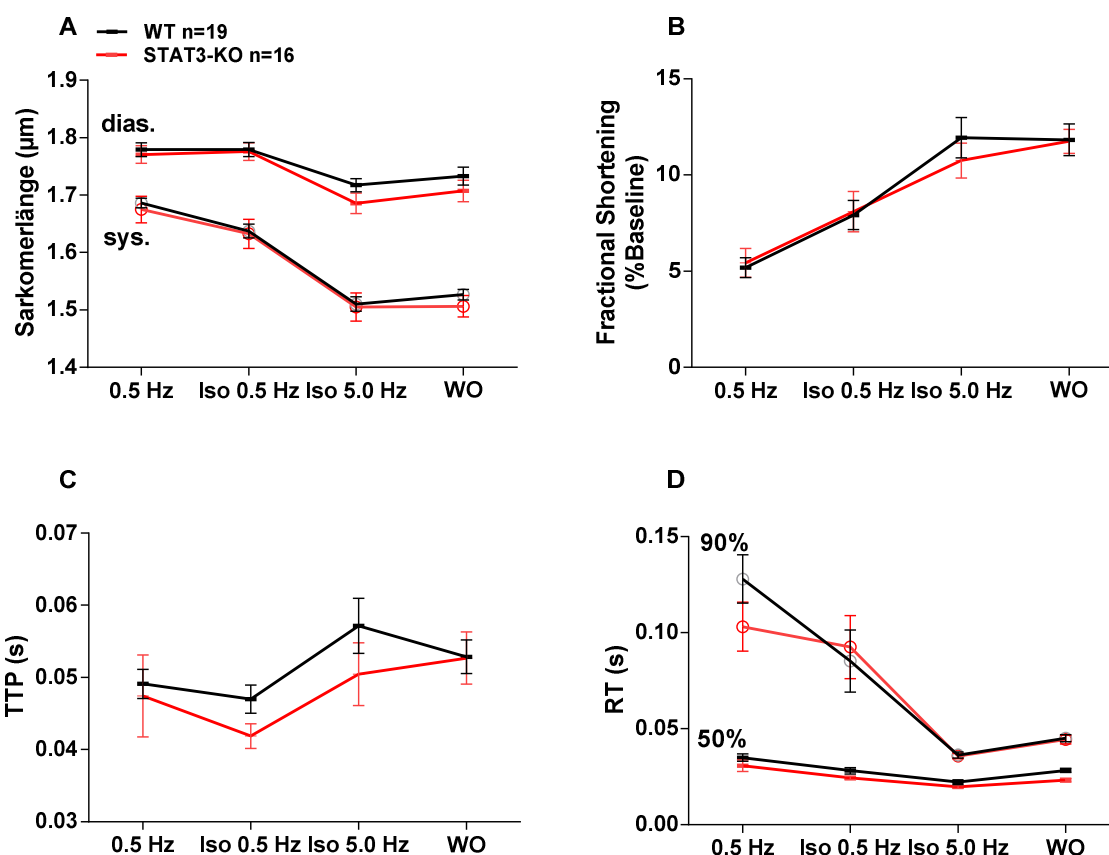


Abbildung 24: Parameter der Zellverkürzung von WT (n=19) und STAT3-KO (n=16). A Systolische bzw. diastolische Sarkomerlänge. B Fraktionelle Zellverkürzung. C Zeit bis zur maximalen Verkürzung der Myozyte. D Zeit bis zur 50%- bzw. 90%-Relaxation. Keine signifikanten Unterschiede innerhalb der ersten Versuchsgruppe zwischen WT und STAT3-KO Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

Gegenstand der Zellverkürzungsuntersuchungen waren einerseits die systolische bzw. diastolische Sarkomerlänge, sowie die fraktionelle Sarkomerverkürzung, aber auch die Zellverkürzungszeit (Zeit zum Maximum; „Time-to-Peak“), welche die Zeit bis zur maximalen Verkürzung der Myozyte wiedergibt und ebenso die Zeit bis zur 50-prozentigen, bzw. bis zur 90-prozentigen Relaxation. Dabei zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied in weder der systolischen, noch der diastolischen Sarkomerlänge zwischen den peripartalen und unbehandelten STAT3-KO und den WT Mäusemyozyten gibt (Abb. 24 A).

Die fraktionelle Zellverkürzung (Abb. 24 B) nimmt in beiden Gruppen gleichermaßen stetig zu und erreicht nach Zuführen von Isoprenalin ihr Maximum. In Abb. 24 C wird die Time-to-Peak (TTP) zu allen vier Zeitpunkten des Messprotokolls dargestellt, wobei sich kein signifikanter

Unterschied in der Zeit bis zur maximalen Kontraktion zwischen STAT3-KO und WT Myozyten ergab. Beide Gruppen zeigten auch annähernd gleiche Werte für die Zeit bis zur 50-prozentigen, bzw. bis zur 90-prozentigen Erholung (RT) (Abb. 24 D).

4.3.2 Messung des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD

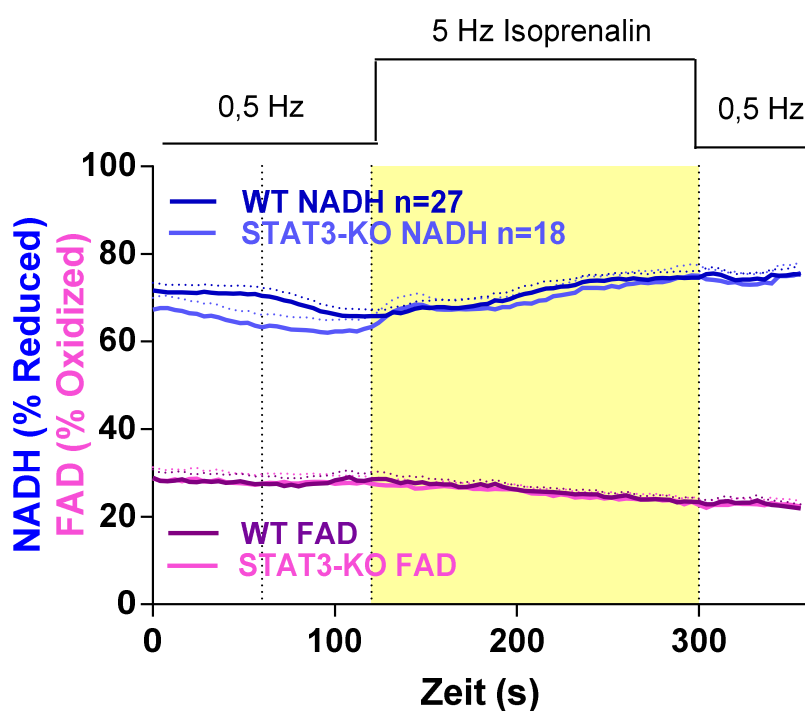


Abbildung 25: Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺, FADH₂/FAD in WT (n=27) und STAT3-KO (n=18). Angaben in Prozent der am Ende jeder Messung mit FCCP, Cyanid und H₂O₂ kalibrierten NAD(P)H- und FAD-Gesamtmenge. Der Redoxstatus hält sich in beiden Gruppen auch unter β -adrenerger Stimulation mittels Isoprenalin konstant. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Bei den Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H/FAD wurden die Myozyten beider Versuchsgruppen hinsichtlich ihres Redoxstatus miteinander verglichen. Dieser war während des gesamten Messprotokolls in STAT3-KO und WT Myozyten sowohl für NAD(P)H, als auch für FAD nicht unterschiedlich (Abb. 25). Die Werte für die Autofluoreszenz von NAD(P)H bzw. FAD waren relativ konstant (NAD(P)H ca. **70%** für WT und STAT3-KO. FAD ca. **30%** für WT und STAT3-KO), wobei die NAD(P)H-Autofluoreszenz unter 5 Hz und Isoprenalin für beide Gruppen gleichermaßen geringfügig anstieg, während die FAD-Autofluoreszenz keine Veränderung zeigte. In Abb. 26 ist zusätzlich das Verhältnis von NAD(P)H/FAD als sensitiver

und ratiometrischer Index des mitochondrialen Redoxstatus dargestellt, welches eine transiente Verschiebung in Richtung Reduktion während erhöhter Arbeitslast zeigt. Auch in dieser Darstellung zeigt sich jedoch kein Unterschied des mitochondrialen Redoxstatus in Myozyten von peripartalen WT und STAT3-KO Mäusen.

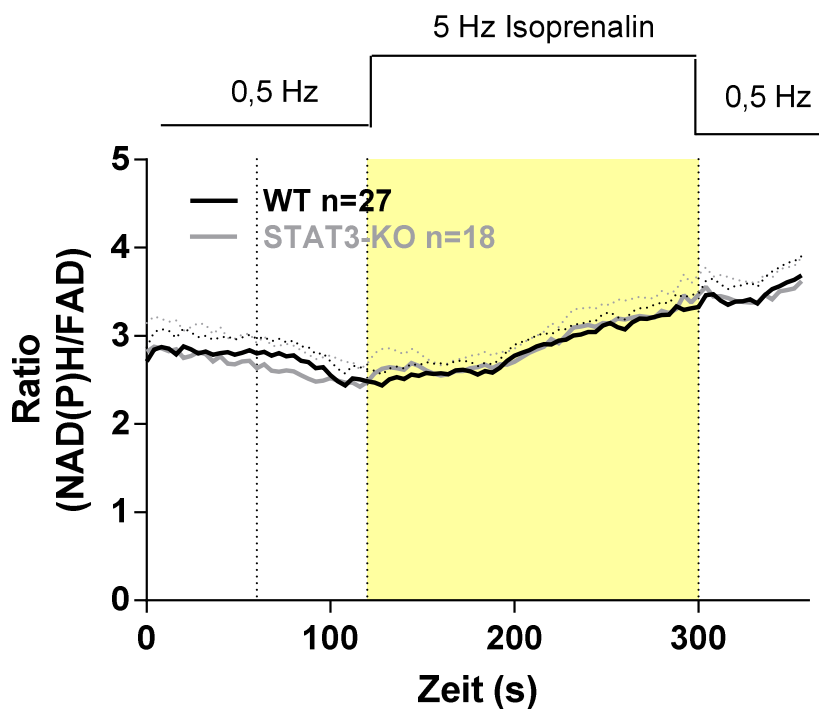


Abbildung 26: Verhältnis von NAD(P)H zu FAD⁺ als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus in WT (n=27) und STAT3-KO (n=18). Unter basalen Bedingungen bei 0,5 Hz konstante Ratio. Unter erhöhter Arbeitslast bei 5 Hz geringgradige Reduktion des Redoxstatus. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

4.3.3 Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion

Abb. 27 präsentiert die Messergebnisse als Fluoreszenzintensität (F) zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung im Verhältnis zur Ausgangsfluoreszenzintensität (F₀) zu Beginn der Messung, unter den in der Abbildung gekennzeichneten Bedingungen. Dabei scheinen sich WT und STAT3-KO Myozyten hinsichtlich der Superoxid-Produktion unter 0,5 Hz Stimulationsfrequenz zunächst einmal nicht zu unterscheiden. Auch nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz konnte kein signifikanter Unterschied in der Netto-Superoxid-Produktion festgestellt werden. Etwa 90 Sek. nach Arbeitslasterhöhung zeigte sich lediglich eine geringgradige Tendenz zu einer höheren

Superoxidproduktion in den STAT3-KO Myozyten, die sich allerdings während der Auswaschphase des Isoprenalins unter 0,5 Hz Stimulationsfrequenz wieder an die Rate der Superoxidproduktion in WT Myozyten angleich.

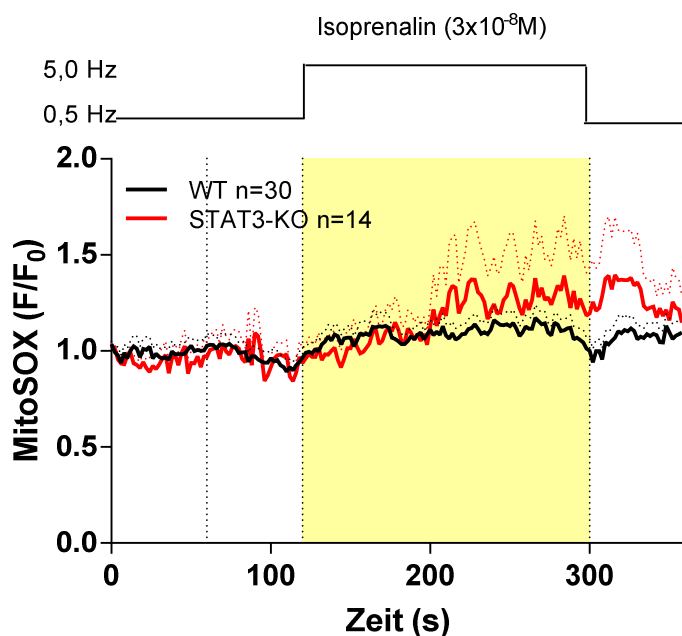


Abbildung 27: Mitochondriale Superoxid-Produktion gemessen mit dem Farbstoff MitoSOX-Red in isolierten Kardiomyozyten von WT (n=30) und STAT3-KO Mäusen (n=14). Die gemessene Superoxid-Rate war in WT und STAT3-KO vergleichbar, selbst unter Erhöhung der Arbeitslast bei 5 Hz und gleichzeitiger Infusion von Isoproterenol (3×10^{-8} M). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

4.4 Fluoreszenz- und Zellverkürzungsexperimente an STAT3-KO und WT Mäusemyozyten nach Behandlung mit Bromocriptin

4.4.1 Zellverkürzungsmessungen

Die Zellverkürzungsmessungen an den mit dem Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonisten Bromocriptin behandelten WT und STAT3-KO Mäusemyozyten ergaben weder für die systolische bzw. diastolische Sarkomerlänge, noch für die fraktionelle Zellverkürzung signifikante Unterschiede (Abb. 28 A,B).

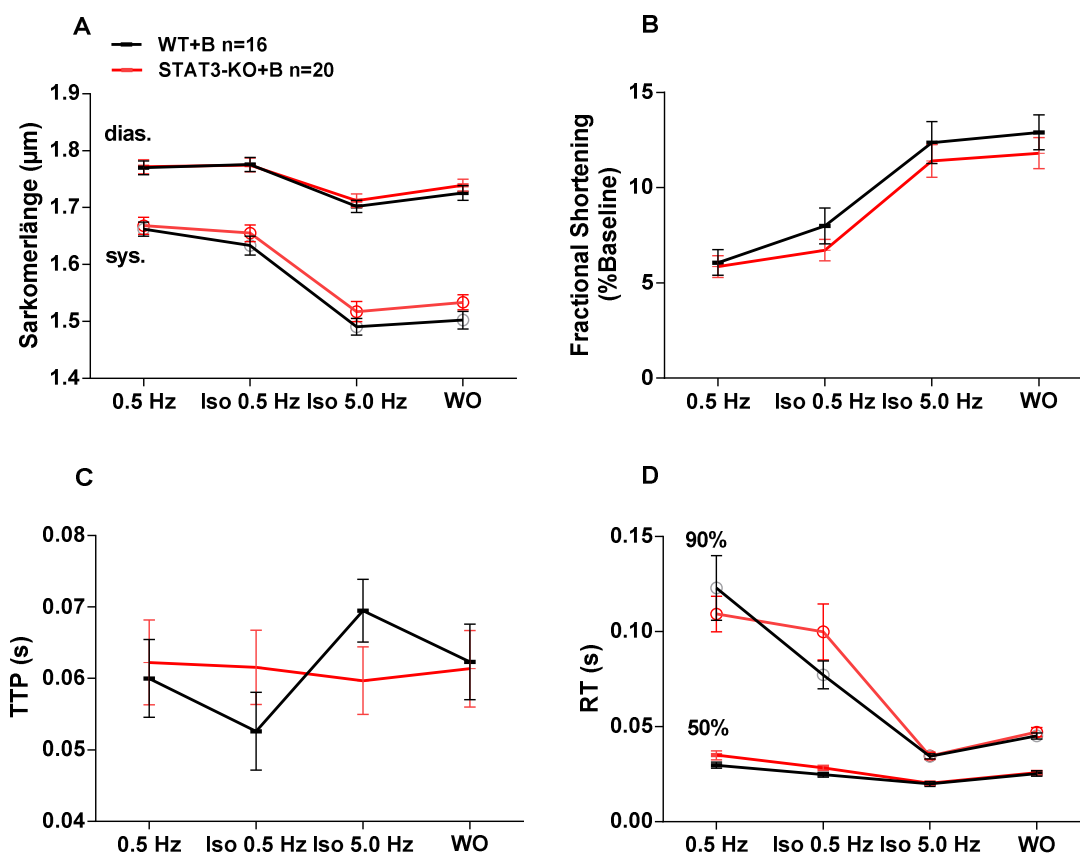


Abbildung 28: Parameter der Zellverkürzung von WT + B (n=16) und STAT3-KO + B (n=20). A Systolische bzw. diastolische Sarkomerlänge. B Fraktionelle Zellverkürzung. C Zeit bis zur maximalen Verkürzung der Myozyte. D Zeit bis zur 50%- bzw. 90%-Relaxation. Keine signifikanten Unterschiede innerhalb der zweiten Versuchsgruppe zwischen WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

Die WT Myozyten tendierten unter erhöhter Arbeitslast und Isoprenalin länger bis zur maximalen Kontraktion zu brauchen, als die STAT3-KO Myozyten, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 28 C). Auch bei der Zeit bis zur 50-prozentigen bzw. 90-prozentigen Erholung traten keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen auf (Abb. 28 D).

4.4.2 Messung des Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD

Hinsichtlich des Redoxstatus der behandelten Versuchsgruppen ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede. Dieser zeigte allerdings im Gegensatz zur unbehandelten

Versuchsgruppe im Verlauf eine leichte Tendenz zur Oxidation, welche insbesondere unter erhöhter Arbeitslast und Isoprenalin zunahm (Abb. 29: NAD(P)H ca. **60%** für WT und STAT3-KO. FAD ca. **35%** für WT und STAT3-KO).

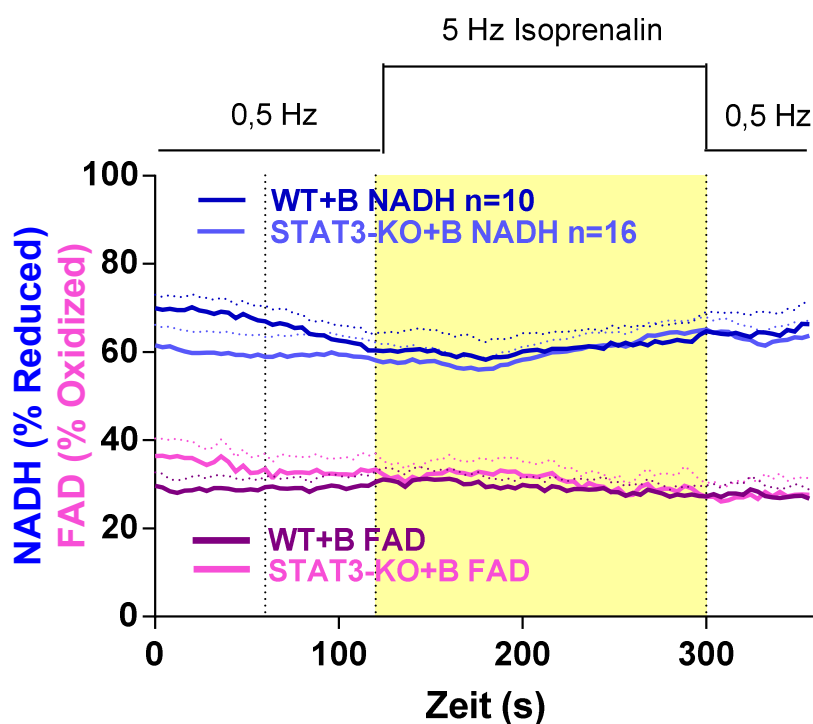


Abbildung 29: Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺, FADH₂/FAD in WT + B (n=10) und STAT3-KO + B (n=16). Geringgradige Tendenz zur Oxidation unter erhöhter Arbeitslast bei 5 Hz in beiden Gruppen. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO Mäusen nach Behandlung mit Bromocriptin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

Im weiteren Verlauf erfolgte in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen nach Beendigung der 5 Hz Sequenz die Regeneration der Redoxäquivalente, sodass sich die Werte wieder den Ausgangswerten annäherten (NAD(P)H ca. **70%** für WT und STAT3-KO. FAD ca. **28%** für WT und STAT3-KO).

Das ratiometrische Verhältnis von NAD(P)H/FAD, dargestellt in Abb. 30, verdeutlicht diesen oxidierten Redoxzustand während der Einwaschphase des Isoprenalins und des Stressprotokolls und die darauffolgende Erholung der Redoxäquivalente. Insgesamt ergab sich auch hier kein Unterschied zwischen behandelten WT und STAT3-KO Myozyten.

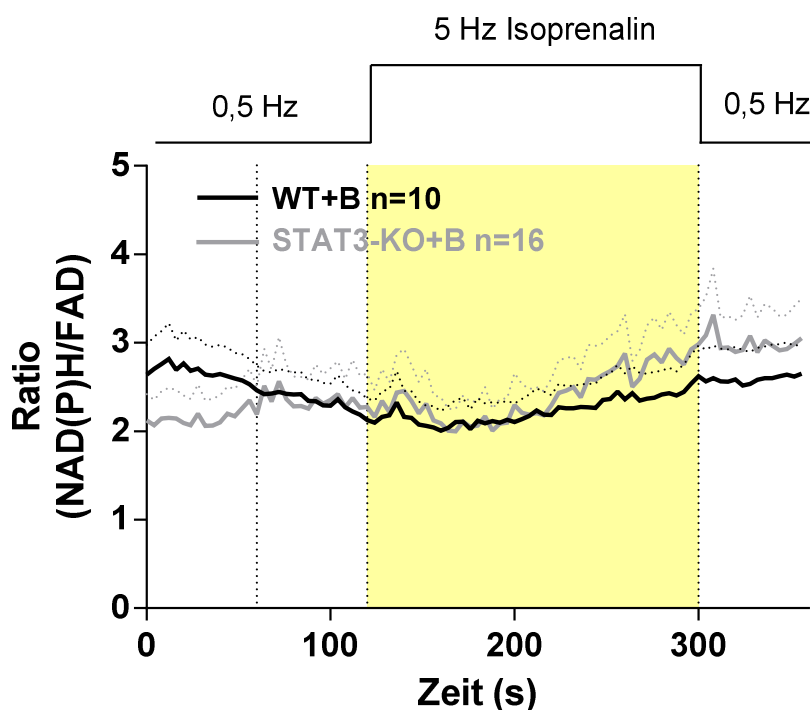


Abbildung 30: Verhältnis von NAD(P)H zu FAD als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus in WT+B (n=10) und STAT3-KO+B (n=16). Geringgradige Tendenz zur Oxidation unter erhöhter Arbeitslast bei 5 Hz. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und STAT3-KO nach Behandlung mit Bromocriptin. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

4.4.3 Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion

Auch die Gruppe der behandelten WT und STAT3-KO Myozyten wurde auf die Produktion von Superoxid untersucht. Bei der Messung der mitochondrialen Superoxid-Produktion mit dem Farbstoff MitoSOX-Red gemäß vorher beschriebenem Protokoll konnten keine Unterschiede zwischen den behandelten WT und STAT3-KO Mäusen festgestellt werden (Abb. 31). Die Fluoreszenzintensität (F) blieb während des gesamten Messprotokolls weitgehend konstant. Überraschenderweise änderte sich diese auch nicht unter erhöhter Arbeitslast (farbig unterlegtes Areal in der Abbildung).

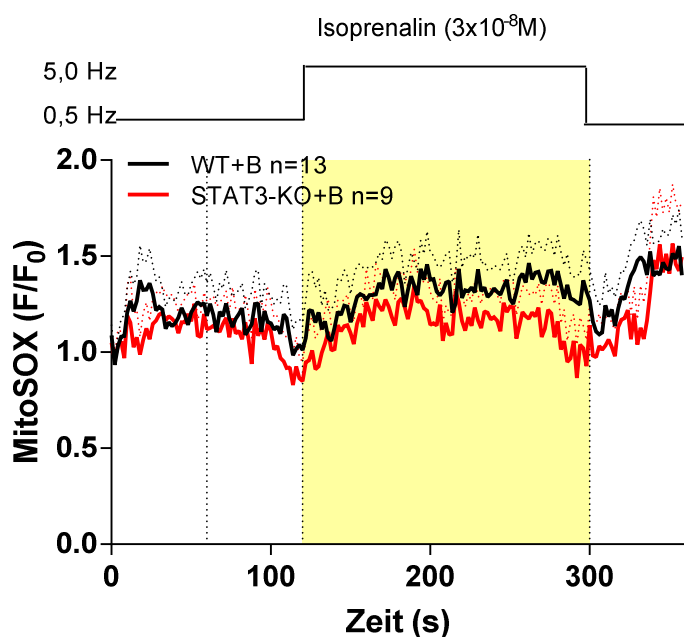


Abbildung 31: Mitochondriale Superoxid-Produktion in isolierten Kardiomyozyten von WT+B (n=13) und STAT3-KO+B Mäusen (n=9) nach Behandlung mit Bromocriptin. Es stellten sich keine Unterschiede nach der Behandlung mit Bromocriptin zwischen WT und STAT3-KO dar. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM.

In Abbildung 32 wurden jeweils die unbehandelten und behandelten Mäuse einer Gruppe zur besseren Beurteilbarkeit des Bromocriptin-Effekts gegenübergestellt. Auch hierbei zeigten sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede.

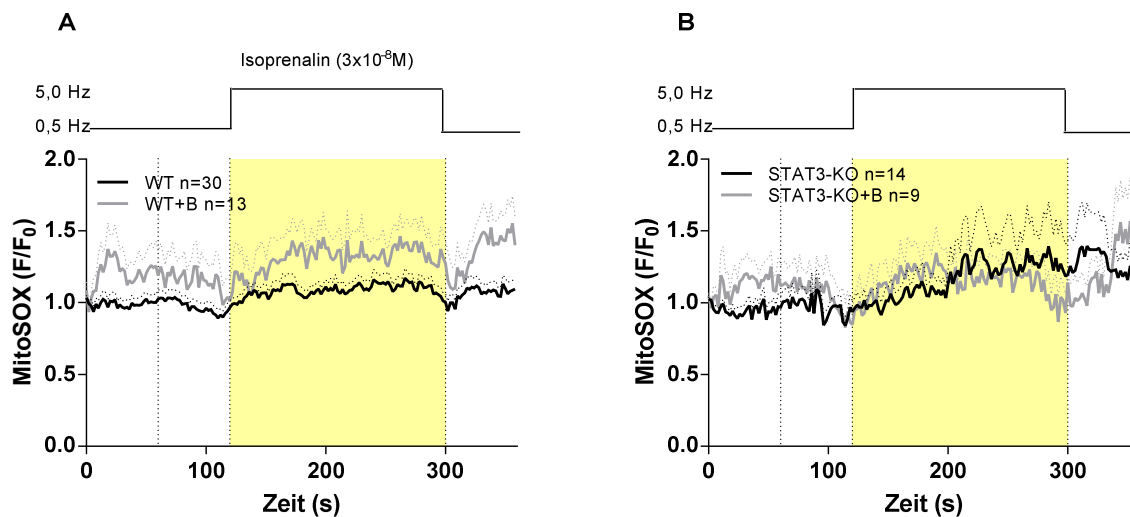


Abbildung 32: Mitochondriale Superoxid-Produktion in isolierten Kardiomyozyten von A WT (n=30) und WT+B (n=13) und B STAT3-KO (n=14) und STAT3-KO+B (n=9). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen des STAT-3-Knockouts auf die mitochondriale Energetik und ATP-Produktion bei postpartalen Mäusen

Eine Abhängigkeit der mitochondrialen Funktion von dem myokardialen Protein STAT3 konnte mittlerweile in mehreren Studien gezeigt werden. Allen voran zeigte die Arbeit von Wegrzyn et al. eine signifikant reduzierte State 3 Atmung in isolierten Mitochondrien aus pro-B-Zellen von STAT3-KO Mäusen in einem Alter von 8 Wochen. Durch den Einsatz komplexspezifischer Substrate bei der Atmungsmessung an Mitochondrien und durch Enzymaktivitätsmessungen konnte bei Wegrzyn et al. die verschlechterte Respiration auf die Komplexe I und II der Atmungskette zurückgeführt werden. Diese war bei der Verwendung von Substraten für Komplex I um 70% und für Komplex II um 50% verringert. Zu ähnlichen Ergebnissen kam es auch bei Boengler (2010) und Elschami et al. (2013), die beide eine verringerte State 3 Atmung an isolierten Mitochondrien gemessen haben, wobei bei Elschami et al. die Aktivität aller vier Komplexe der Atmungskette reduziert vorlagen und bei Boengler et al. vor allem Komplex I in seiner Funktion beeinträchtigt zu sein schien.

Eine funktionelle Analyse an Mitochondrien von postpartalen Mäusen mit einem STAT3-KO wie wir sie durchgeführt haben wurde bisher noch nicht vorgenommen. In der Arbeit von Hilfiker-Kleiner et al. (2007) konnten als Zeichen der Hypoxie deutlich verringerte Konzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und ADP und eine erhöhte Expression von HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) in Kardiomyozyten von postpartalen STAT3-KO Mäusen festgestellt werden. Die Ergebnisse unserer Experimente an isolierten Mitochondrien von postpartalen STAT3-KO Mäusen sind in Bezug auf den verringerten ADP-induzierten Sauerstoffverbrauch deckungsgleich mit den zuvor erwähnten. Dabei konnten wir bei der Verwendung von Komplex-I-Substraten eine verringerte State 3 Atmung in den STAT3-KO Mäusen im Vergleich zu den WT Geschwistertieren feststellen, der auch bei uns auf einen Defekt an Komplex I hindeuten könnte.

Ein derartiger Unterschied in der mitochondrialen Atmung könnte zu einer Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung in den Kardiomyozyten führen, da die größten energiekonsumierenden Prozesse, zum einen die Ca²⁺-abhängige Myosin ATPase und zum anderen sämtliche Ionen-ATPasen, sehr sensibel auf Veränderungen der ATP-Konzentration reagieren und eine verringerte Ca²⁺-Beladung des SR zur Folge haben könnten (Balaban, 2002),

aus der wiederum Änderungen im Kontraktionszyklus der Myozyten resultieren würden. Unsere Experimente an intakten Kardiomyozyten haben allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Zellverkürzungsparametern zwischen STAT3-KO und WT Mäusen gezeigt, sodass sich hier eine Diskrepanz zwischen den Resultaten aus den Experimenten an den isolierten Mitochondrien einerseits und denen an intakten Kardiomyozyten andererseits ergibt. Die akute Verschlechterung der Respiration in den Mitochondrien könnte sich jedoch auch erst im Verlauf auf die zelluläre Ebene niederschlagen, sodass Veränderungen in der Kontraktilität der Myozyten noch im Langzeitverlauf folgen könnten. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass der Phänotyp der STAT3-KO Mäuse teilweise heterogen ausgeprägt war (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Hilfiker-Kleiner). Dieser unterschiedlich ausgeprägte Phänotyp der PPCM könnte weiterhin zu den scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen beitragen. Ferner muss berücksichtigt werden, dass die apoptotischen Myozyten bei den Zellverkürzungsexperimenten nicht verwertet worden sind, sondern nur die intakten kontrahierenden Myozyten ausgewählt wurden. Da die Kardiomyozyten im Rahmen der Zellverkürzungsexperimente im Vergleich zur in vivo Situation einer eher geringeren Arbeitslast ausgesetzt waren, kann es auch durchaus sein, dass sich hierbei noch keine schwerwiegende Beeinträchtigung der Kontraktilität manifestiert hat. Des Weiteren gilt es zu berücksichtigen, dass sich die isolierten Mitochondrien in keinem physiologischen Kontext befanden, d.h. sämtliche Interaktionen zwischen ihnen und weiteren Zellbestandteilen und der Einfluss des zellulären Ionenhaushalts auf die Mitochondrien, wie z.B. der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt, welcher sich im Rahmen der Herzinsuffizienz auf Grund einer erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration stark verändert, nicht berücksichtigt werden konnten.

In unseren Vorarbeiten wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt, jedoch nicht an postpartalen, sondern an basalen *nullipara* STAT3-KO Mäusen (Stapel et al., 2016). Dabei stellten sich entgegen der Ergebnisse der eingangs erwähnten Arbeiten an isolierten Mitochondrien weder bei der respiratorischen Untersuchung der Mitochondrien, noch an den isolierten Kardiomyozyten Differenzen zwischen ungestressten STAT3-KO und WT Mäusen heraus. Dies passt auch zu den Befunden von Hilfiker-Kleiner et al. (2007), die bei den basalen STAT3-KO Mäusen keine erhöhte Mortalität oder Anzeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz zeigen konnten. Auch die stöchiometrische Analyse von Phillips et al., die eine relevante Interaktion von STAT3 mit Komplex I und II aufgrund einer zu geringen Konzentration von STAT3 in den Mitochondrien unwahrscheinlich macht, unterstützt die Ergebnisse von J.A. Saar. Phillips et al. schätzen die absolute Menge von STAT3 auf etwa

1:10⁵/mg Protein, was der üblichen Konzentration von zellulären Transkriptionsfaktoren entspricht (Elf et al., 2007). Daher wird auch angenommen, dass die durch STAT3 verursachten Veränderungen nicht auf direkter Protein-Protein-Interaktion, sondern vielmehr auf transkriptioneller Ebene und über die Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege basieren, die bisher noch Gegenstand aktueller Forschungen sind (Phillips et al., 2010).

Dass sich dennoch in unseren Versuchen mit postpartalen STAT3-KO Mäusen eine signifikant reduzierte Atmung im Vergleich zum WT darstellte, muss nicht im Widerspruch zu den Arbeiten von Saar und Phillips et al. stehen. Der wohl bedeutendste Unterschied zwischen *nullipara* und postpartalen STAT3-KO Mäusen besteht, neben den im Zuge der Schwangerschaft auftretenden u.a. hämodynamischen Veränderungen, in dem vermehrten Vorkommen des proteolytischen Enzyms Cathepsin D (Hilfiker-Kleiner et al., 2007), welches durch in der Abwesenheit von STAT3 gesteigerten oxidativen Stress aus den Lysosomen ins Zytosol der Kardiomyozyten freigesetzt wird (Corbacho et al., 2002; Roberg et al., 1998) und hauptsächlich für die Spaltung des Prolaktins in das 16-kDa-PRL verantwortlich ist. Dieses maladaptive 16-kDa-PRL-Spaltprodukt führt in Endothelzellen zu Apoptose und hemmt deren Proliferation, sodass es zu einer relevanten Beeinträchtigung der kardialen Mikrozirkulation kommt. Zudem wurde mehrfach gezeigt, dass auch STAT3 kritisch an der Angiogenese im Herzen beteiligt ist (Bartoli et al., 2003; Hilfiker-Kleiner, 2004; Osugi et al., 2002). So kam es in basalen STAT3-KO Mäusen bereits unmittelbar postnatal zu einer reduzierten Vaskularisierung, welche auch im Verlauf nach 8 – 12 Wochen deutlich geringer ausgeprägt war als in der WT Kontrollgruppe. In postpartalen STAT3-KO Mäusen kann es schließlich sein, dass die Mikrozirkulation nicht nur durch das maladaptive 16-kDa-PRL, sondern auch durch das Fehlen von STAT3 massiv beeinträchtigt wird. Gerade in der Schwangerschafts- bzw. Perinatalperiode, in der das Herz als Reaktion auf die veränderten hämodynamischen Bedingungen eine physiologische Hypertrophie entwickelt (Hudlicka et al., 1996), ist eine ausreichende Angiogenese essenziell, um den Herzmuskel mit ausreichend Sauerstoff und Substraten zu versorgen. Wird dies nicht gewährleistet, so kann es folglich über die reduzierte Bereitstellung von Substraten und Redoxäquivalenten an der Atmungskette zu einer Herabsetzung der mitochondrialen Funktion bzw. der einzelnen Komplexaktivitäten kommen, wie wir bei unserer polarographischen Atmungsmessung feststellen konnten.

5.2 Auswirkungen des STAT3-Knockouts auf die mitochondriale ROS-Emission

Es ist bekannt, dass während der Schwangerschaft vermehrt oxidativer Stress entsteht, der üblicherweise mit einer entsprechenden Heraufregulierung antioxidativer Enzyme einhergeht und dass diese besonders stark in der postpartalen Phase bei gesunden Frauen ansteigen (Toescu et al., 2002). Hierbei wird die Notwendigkeit der adäquaten Elimination von ROS für einen komplikationslosen Verlauf der Schwangerschaft deutlich. Bei Frauen mit PPCM konnten im Serum erhöhte Level von oxidiertem LDL als Zeichen für oxidativen Stress (Weinbrenner et al., 2003) nachgewiesen werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Darüber hinaus haben Hilfiker-Kleiner et al. einerseits eine reduzierte mRNA-Expression und eine verringerte Proteinkonzentration des mitochondrialen antioxidativen Enzyms Mn-SOD und andererseits eine verstärkte ROS-Produktion im linken Ventrikel von PPCM-Patientinnen feststellen können.

Unsere Experimente an isolierten Mitochondrien aus postpartalen STAT3-KO Mäusen zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hilfiker et al. eine besonders im State 2 signifikant höhere Superoxid-Konzentration und auch unter ADP-induzierter Respiration die Tendenz zu mehr Superoxid als in der WT-Kontrollgruppe. Dass die Superoxid-Konzentration vor allem im State 2 deutlich höher ausfällt, lässt sich dadurch erklären, dass die ETC bei ausreichend vorhandenen Substraten, jedoch in Abwesenheit von ADP, über ein hohes Redoxpotential verfügt und dabei wie schon eingangs beschrieben die ROS-Produktion an der ETC umso höher ist (Chen et al., 2003), da kein koordinierter Elektronentransport stattfindet, sondern Elektronen in diesem Zustand unkoordiniert mit molekularem Sauerstoff reagieren können (Murphy, 2009; Nickel et al., 2014). Die relative Superoxid-Konzentration im Verhältnis zur Respiration war in STAT3-KO Mäusen nicht nur im State 2, sondern auch im State 3 unter Hinzugabe von 100 μM ADP, einer Konzentration, wie sie auch physiologisch in vivo vorkommt, signifikant höher als im WT, was unsere These weiter unterstützt. Interessanterweise war die absolute H_2O_2 -Konzentration in den Mitochondrien von STAT3-KO Mäusen hierbei signifikant geringer als im WT.

H_2O_2 entsteht bei der Dismutation von O_2^- durch die Mn-SOD, welche unter transkriptionellem Einfluss von STAT3 steht (Negoro et al., 2001). Dabei ist H_2O_2 kein Sauerstoff-Radikal im eigentlichen Sinne, kann jedoch durch die Aufnahme eines Elektrons zum hochreaktiven Hydroxyl-Radikal weiterreagieren (siehe Abb. 2), weshalb es trotzdem zu den ROS gezählt wird. Durch die NADPH-abhängigen Enzyme Glutathionperoxidase und Peroxiredoxin wird es dann

weiter zu Wasser umgesetzt und somit unschädlich gemacht. Das Verhältnis von H_2O_2 zu $\cdot\text{O}_2^-$, das wir als Parameter der Mn-SOD Aktivität bestimmten, war demnach in den postpartalen STAT3-defizienten Mäusen signifikant geringer, was mit der reduzierten mRNA und Protein-Expression der Mn-SOD in Übereinstimmung ist (Hilfiker-Kleiner et al.). Für die Funktionalität und das Zellüberleben spielt die antioxidative Funktion der Mn-SOD eine wichtige Rolle, so ging ein heterozygoter Mn-SOD-Knockout in transgenen Mäusen mit erhöhtem oxidativen Stress und Zelltod von Kardiomyozyten einher (Van Remmen et al., 2001). Dies allein reichte jedoch unter basalen Bedingungen nicht aus, um eine Kardiomyopathie hervorzurufen. Erst bei postpartalen heterozygoten Mn-SOD-Knockout Mäusen wurde vermutlich auf Grund des schwangerschaftsbedingten Stresses eine Kardiomyopathie induziert (Hilfiker-Kleiner et al., 2007), sodass auch in unserem Tiermodell davon auszugehen ist, dass die reduzierte Aktivität der Mn-SOD erheblich zur Pathogenese der PPCM beiträgt. In weiteren Studien war das Fehlen der Mn-SOD ebenfalls mit einer erhöhten neonatalen Sterblichkeit und der Entstehung einer DCM assoziiert (Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995). In den Zellverkürzungsuntersuchungen konnten wir jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Generation von $\cdot\text{O}_2^-$ feststellen. Dass sich die Veränderungen der mitochondrialen Energetik, welche bei unseren Experimente an isolierten Mitochondrien auftraten, nicht auf die zelluläre Ebene niedergeschlagen haben, zeigten bereits die unbeeinträchtigte elektromechanische Kopplung und der nahezu unveränderte Redoxstatus, den wir anhand der Autofluoreszenzmessungen von NAD(P)H/FAD bestimmten. Mögliche Ursachen wurden bereits diskutiert (s. Abschnitt 5.1). Insofern passt auch der Befund der unveränderten ROS-Emission zu den Ergebnissen der Zellverkürzungsexperimente. Insbesondere der balancierte Redoxstatus in den intakten Kardiomyozyten der STAT3-KO Mäuse gewährleistet einerseits die regelrechte ROS-Elimination über die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die NADPH-abhängigen Enzymsysteme GPX und PRX, und limitiert andererseits die Entstehung von ROS an der ETC (Murphy, 2009) und spricht für einen kompensierten Zustand der Kardiomyozyten. Wir können demnach davon ausgehen, dass die erhöhte ROS-Emission nicht auf einer Verarmung von NADH, NADPH oder FADH_2 beruht.

Oxidativer Stress kann über mehrere Mechanismen entstehen, geht aber in den Mitochondrien hauptsächlich auf die ROS-Produktion an der ETC, dabei im Wesentlichen an Komplex I, und in unserem Tiermodell, wie wir vermuten, auf die fehlende Elimination von $\cdot\text{O}_2^-$ durch die bei einem STAT3-Verlust verminderte Expression der Mn-SOD zurück. Untersuchungen von HIF-1 α zeigten überraschenderweise außerdem, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einer

sogar verstärkten Superoxid-Produktion kommt (Schofield et al., 2004; Semenza et al., 2011). Bei postpartalen STAT3-KO Mäusen konnte eine erhöhte Expression von HIF-1 α als Zeichen der Hypoxie, welche vermutlich nicht nur auf Basis der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz entstanden ist, sondern ebenso auf die durch das 16-kDa-PRL verursachte reduzierte Vaskularisierung zurückzuführen ist, nachgewiesen werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Es besteht demzufolge die Möglichkeit, dass die Hypoxie in unseren STAT3-KO Mäusen (es handelt sich um die gleiche Mäusezucht, wie bei Hilfiker-Kleiner et al.) einen weiteren Trigger für die Entstehung von ROS darstellt.

Weshalb es bei der PPCM und generell bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer verminderten Expression von STAT3 bzw. Herunterregulierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs kommt, ist bislang noch nicht hinreichend geklärt, ebenso wenig wie die Frage, ob diese Herunterregulierung Folge oder Ursache der Erkrankung ist. Allerdings wurde schon mehrfach die Redoxsensibilität von STAT3 an dessen Cystein-Resten thematisiert, über welche die transkriptionale Aktivität des Proteins reguliert werden könnte (Butturini et al., 2014; Kurdi et al., 2012; Xie et al., 2009), wobei es unklar ist, ob die mitochondriale Aktivität von STAT3 dadurch beeinflusst wird. In dem Falle eines Funktionsverlustes von STAT3 infolge von Oxidation durch ROS mit konsekutiv verringerter Expression der Mn-SOD könnte ein Teufelskreis entstehen, durch den die Expression und Aktivität von Cathepsin D und in der Folge die Entstehung des 16-kDa-PRL, als wesentliche Merkmale in der Pathophysiologie der PPCM, immer weiter gesteigert würden. Mäuse mit einem postnatal generierten Kardiomyozyten-spezifischem STAT3-KO entwickeln im Alter eine Herzinsuffizienz (Hilfiker-Kleiner, 2004). Die Redoxsensibilität und der nachfolgende Funktionsverlust von STAT3 könnten diese im gealterten Myokard auftretende Herzinsuffizienz dadurch erklären, dass das myokardiale Protein STAT3 einer dementsprechend langfristigen ROS-Produktion exponiert wäre.

Der Verlust von STAT3 war neben unseren Ergebnissen auch in weiteren Studien mit einer verstärkten ROS-Produktion in Mitochondrien assoziiert (Szczepanek et al., 2012; Zouein et al., 2014), wobei eine direkte Kausalität bzw. die genauen Mechanismen, die zur ROS-Entstehung geführt haben, bisher noch nicht aufgedeckt wurden. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass STAT3 über eine Interaktion mit dem Protein GRIM19, welches zur Untereinheit NDUFA13 des Komplex I der ETC gehört (Zouein et al., 2015) an der Regulation der Aktivität dieses Komplexes beteiligt sei (Wegrzyn et al., 2009; Zhang et al., 2013; Zouein et al., 2014). GRIM19 ist bedeutend für die Stabilität von Komplex I und die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (Huang et al., 2004) und soll weiterhin sogar für die mitochondriale

Aufnahme von STAT3 verantwortlich sein (Tammineni et al., 2013), sodass eine intakte Interaktion mit STAT3 in der Tat essenziell für die regelrechte Aktivität von Komplex I sein könnte (Zhang et al., 2013). ROS entstehen vorwiegend an Komplex I und III der Atmungskette (Chen et al., 2003). Eine Assoziation zwischen STAT3 und Komplex I wäre folglich bei einer verminderten Expression von STAT3 eine mögliche Ursache für die verstärkte ROS-Emission, die wir in unseren Experimenten nachweisen konnten.

In der Arbeit von Szczepanek et al. konnte gezeigt werden, dass bei transgenen Mäusen (MLS-STAT3E) mit einer Überexpression von STAT3 in Mitochondrien die Komplex I- und II-Aktivität während Ischämie reduziert vorlag. Im Gegensatz zu der WT-Vergleichsgruppe war die ROS-Produktion bei diesen MLS-STAT3E Mäusen nicht erhöht und ein Freilassen des Cytochrom c mit nachfolgendem Zelltod konnte verhindert werden (Szczepanek et al., 2011). Da die beschriebenen Effekte bereits nach 45 Minuten Ischämiezeit nachweisbar waren, gehen die Autoren davon aus, dass diese nicht auf die genomische Aktivität von STAT3 als Transkriptionsfaktor, sondern vielmehr auf eine direkte Interaktion von STAT3 und der ETC zurückzuführen sind. Die Überexpression von STAT3 in Mitochondrien soll also in diesem Modell durch die Blockade von Komplex I- und II während Ischämie für die verringerte ROS-Produktion verantwortlich und somit besonders bei zellulärem Stress protektiv sein, während sie unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die ROS-Produktion zeigte.

Im ischämischen Zustand der Zelle ist die Geschwindigkeit der ETC durch die fehlende O₂-Versorgung reduziert, sodass Elektronen in den Mitochondrien akkumulieren (Schumacker, 2013). Die Wiederherstellung des Blutflusses und die damit einhergehende Wiederaufnahme der Aktivität der ETC resultiert bereits nach wenigen Minuten in einem enormen Anstieg von ROS, dem sog. "ROS-burst" (Ambrosio et al., 1993; Babot et al., 2013). Dass besonders die Komplex I Aktivität im Kontext von Ischämie- und Reperfusion eine bedeutende Rolle spielt, konnte durch eine Arbeit von Chouchani et al. gezeigt werden, bei der durch das spezielle Agens MitoSNO (*mitochondria-selective S-nitrosating agent*), das als Stickstoffmonoxid-Spender spezifisch in Mitochondrien einen Cystein-Rest der ND3-Untereinheit des Komplex I nitrosyliert, die Aktivität des Komplex I reduziert und auch hierbei in der Folge die ROS-Produktion verringert werden konnte (Chouchani et al., 2013). Dabei ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass NO während Ischämie/Reperfusion kardioprotektiv wirkt (Duranski et al., 2005). Hieraus ergibt sich ein therapeutischer Ansatz, der womöglich auch in unserem PPCM-Modell einen positiven Effekt auf die mitochondriale ROS-Produktion medieren könnte, zumal bei einer weiteren Studie eine stark erhöhte Vulnerabilität gegenüber Ischämie- bzw. Reperfusionsschäden in der

späten Schwangerschaft, welche mit einer verminderten STAT3-Expression assoziiert war, nachgewiesen werden konnte (Li et al., 2012). Bei Boengler et al. wurde die Phosphorylierung von STAT3 an einerseits dem Serinrest-727 und andererseits dem Tyrosinrest-705 mit dem spezifischen Inhibitor *Stattic* (STAT three inhibitory compound) und somit dessen Aktivierung in kardialen Mitochondrien gehemmt (Schust et al., 2006), was zu einer reduzierten ADP-induzierten Respiration und insbesondere verringerten Komplex-I-Aktivität, einer signifikant gesteigerten H₂O₂-Produktion und einer erniedrigten Schwelle der mPTP-Öffnung führte (Boengler et al., 2013). Dies stimmt neben den Ergebnissen aus zahlreichen weiteren Studien, bei denen eine STAT3-Deletion in verschiedenen Zellpopulationen, darunter u.a. Osteoblasten (Zhou et al., 2011), Astrozyten (Sarafian et al., 2010) und hämatopoetischen Stammzellen (Mantel et al., 2013), ebenfalls eine erhöhte ROS-Produktion verursachte, auch mit unseren Ergebnissen überein.

In unseren Experimenten haben wir die mitochondriale bzw. extramitochondriale Ca²⁺-Konzentration und die Funktion des mPTP nicht näher untersucht, es ist jedoch möglich, dass auch in den von uns untersuchten isolierten Mitochondrien die gesteigerte ROS-Emission zur Öffnung des mPTP und einem konsekutivem Ausstrom von Cytochrom c geführt hat, was letztendlich in einem vermehrtem Zelluntergang der Kardiomyozyten resultiert haben könnte. Wie schon eingangs erwähnt, scheint allerdings bereits die verminderte Expression von STAT3 einen Effekt auf den mPTP zu haben. So zeigt Boengler et al., dass der Verlust von STAT3 die Schwelle für die Ca²⁺-induzierte Öffnung des mPTP herabsetzte (Boengler et al., 2010). Das Öffnen des mPTP, das also auf der einen Seite durch die gesteigerte ROS-Emission und auf der anderen Seite durch die STAT3-Defizienz ausgelöst sein könnte, wäre eine Erklärung dafür, dass es in Kardiomyozyten von STAT3-KO Mäusen nach zwei Schwangerschaften zu einer deutlich gesteigerten Apoptoserate kam, was u.a. anhand der erhöhten Caspase-3-Konzentration nachgewiesen werden konnte (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Der Phänotyp der PPCM präsentierte sich des Weiteren mit den typischen Zeichen der Herzinsuffizienz, darunter führend die Dilatation der insbesondere linken Herzkammer (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Diese LV-Dilatation ging bei Hilfiker et al. mit einer erhöhten Expression von MMP3 (Matrix Metalloproteinase-3) einher. MMP3 gehört zu einer Gruppe proteolytischer Enzyme, welche vor allem an Gewebeumbauprozessen beteiligt sind und in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert werden (Vu et al., 2000). Die Aktivität Kardiomyozyten-spezifischer MMPs ist bei Herzinsuffizienz erhöht (Creemers et al., 2001; Spinale et al., 1998). Weiterhin ist eine Assoziation von MMP3 zum LV-Remodeling bekannt (Hayashidani et al., 2003; Rohde et al.,

1999; Tziakas et al., 2005). In der Vergangenheit wurde außerdem gezeigt, dass MMPs durch ROS aktiviert werden können (Rajagopalan et al., 1996), sodass sich hieraus eine mögliche Ursache für die LV-Dilatation ergibt. In einer Studie von Wencker et al. wurde ferner gezeigt, dass bereits niedrige chronische Apoptoseraten ausreichen, um eine Dilatative Kardiomyopathie (DCM), welche der PPCM in der klinischen Ausprägung sehr ähnelt (Hilfiker-Kleiner et al., 2012:), auszulösen (Wencker et al., 2003). Durch Inhibition der Apoptose gelang es außerdem, das Auftreten der DCM zu verhindern (Wencker et al., 2003). Vorstellbar wäre also auch, dass die erhöhte Apoptoserate bei der PPCM zur Dilatation des linken Ventrikels beiträgt. Unabhängig von der Schwangerschaft kam es in einem Mausmodell mit einem genetisch generierten gp-130-KO, der eine Herunterregulation des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs zur Folge hatte, zu einer akut auftretenden DCM mit massiv erhöhter Apoptose während akuter Druckbelastung (Hirota et al., 1999), wodurch die Bedeutung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs für die Kardioprotektion und die regelrechte Adaptation an Stresssituationen hervorgehoben wird.

Die gesteigerte Superoxid-Konzentration in kardialen Mitochondrien könnte weiterhin durch Modifikation empfindlicher Strukturen direkte Schäden an der inneren Mitochondrienmembran hervorrufen (Mannella et al., 2008) und zur Oxidation von mitochondrialen Proteinen (Tsutsui et al., 2009) führen. So vermuten Ide & Tsutsui et al., dass ROS auch die mitochondriale DNA (mtDNA) schädigen können und es dadurch zu einer verringerten Expression mtDNA-kodierter Gene und Enzyme der ETC kommen könnte (Ide et al., 2001). Diese These wäre ein weiterer Ansatz zur Erklärung der reduzierten Atmung, welche wir in unseren Versuchen bei den STAT3-KO Mäusen gemessen haben und hätte zugleich verhängnisvolle Folgen, da der ROS-bedingte Schaden an der ETC die mitochondriale Dysfunktion immer weiter unterhalten würde.

5.3 Auswirkungen der Bromocriptin-Behandlung auf die mitochondriale Energetik bei postpartalen STAT3-Knockout Mäusen

Bromocriptin ist ein Derivat der Mutterkornalkaloide und wird als Arzneimittel u.a. in der Therapie der Parkinson-Krankheit und der Akromegalie eingesetzt. Dabei beruht die therapeutische Wirksamkeit vorrangig auf dessen Agonismus am Dopamin-D₂-Rezeptor, der zu einer gesteigerten Dopamin-Freisetzung führt. Bei postpartalen Frauen wird Bromocriptin hingegen verwendet, um die Laktation zu beenden, da es durch die vermehrte Freisetzung des Dopamins zu einer Hemmung der Prolaktin-Sekretion aus der Hypophyse kommt (Sliwa et al., 2010). Unsere Versuchstiere aus der medizinischen Hochschule Hannover (MHH) wurden eine Woche vor bis zu zwei Wochen nach dem Wurf mit 2,5 mg Bromocriptin/d, welches über das Trinkwasser appliziert wurde, behandelt. Sämtliche Messungen wurden unmittelbar im Anschluss an die Behandlung durchgeführt.

Im Rahmen der PPCM wird dem Prolaktin bzw. dem 16-kDa-PRL-Spaltprodukt eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Erkrankung zugeschrieben, sodass von Hilfiker et al. erstmals der Versuch einer kausalen Therapie mit Bromocriptin unternommen wurde (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Eine spezifische Therapie ist vor dem Hintergrund der generell eingeschränkten Therapieoptionen in der Schwangerschaft besonders wichtig. So wurde die hohe Sterblichkeit in postpartalen STAT3-KO Mäusen unter der Behandlung mit Bromocriptin in der Tat reduziert und ebenso konnten Zeichen des LV-Remodelings, wie die verminderte Angiogenese, die erhöhte Fibrosierung und letztendlich die LV-Dilatation, vollständig verhindert werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Des Weiteren blieb in den behandelten STAT3-KO Mäusen die erhöhte mRNA-Expression des Hypoxie-Indikators HIF-1 α und von MMP3 aus, was also auch auf transkriptionaler Ebene auf eine erfolgreiche Unterbindung des PPCM Phänotyps hindeutet.

Unsere Daten zur mitochondrialen Atmungskapazität von behandelten STAT3-KO Mäusen zeigen in Kongruenz zu den Ergebnissen von Hilfiker et al. eine deutliche Verbesserung der ADP-induzierten State 3 Atmung im Vergleich zur unbehandelten STAT3-KO Vergleichsgruppe und deuten somit zunächst auf eine Bromocriptin-Sensibilität hin. Diese impliziert weiterhin, dass die reduzierte Atmungskapazität in unbehandelten STAT3-KO Mäusen kausal mit dem Auftreten des 16-kDa-PRL im Zusammenhang steht. Unsere Experimente erlauben allerdings keine Aussage darüber, über welche konkreten Mechanismen die Regulation der mitochondrialen Atmungskette stattfindet. Ein direkter Effekt würde die Lokalisation des 16-

kDa-PRL in myozytären Mitochondrien voraussetzen, welche bisher noch nicht beschrieben worden ist und auch eher unwahrscheinlich ist. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die protektiven Effekte von Bromocriptin auf eine indirekte Art die mitochondriale Energetik beeinflussen und dass Bromocriptin selbst keine direkte Wirkung auf das Myokard hat. Dafür sprechen auch unsere Ergebnisse der polarographischen Atmungsmessung an behandelten WT Mäusen, die keinerlei Unterschiede in der Respiration im Vergleich zu den unbehandelten WT Mäusen zeigten. Diese Ergebnisse decken sich auch mit denjenigen von Hilfiker-Kleiner et al., die keine Veränderungen der kardialen Funktion, der Angiogenese, des Blutdrucks oder der Herzfrequenz bei den behandelten postpartalen WT Mäusen feststellen konnten (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Ebenfalls in Übereinstimmung hierzu, konnten wir auch bei den Zellverkürzungsuntersuchungen keinen Effekt von Bromocriptin auf die Kontraktilität der postpartalen WT Mäuse feststellen. Diesbezüglich sei allerdings auch erwähnt, dass zwischen behandelten STAT3-KO und WT Mäusen, wie auch schon bei den Versuchen mit den unbehandelten Versuchsgruppen, keine signifikanten Unterschiede in den Zellverkürzungsparametern aufgetreten sind.

Nähere Untersuchungen des 16-kDa-PRL zeigten außerdem, dass das Überleben der Kardiomyozyten in Anwesenheit des Prolaktin-Spaltprodukts nicht beeinträchtigt wird (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Die kardiale Dysfunktion in postpartalen STAT3-KO Mäusen hängt vielmehr von der reduzierten Vaskularisierung der myokardialen Gefäße ab, die einen dementsprechend eingeschränkten kardialen Metabolismus bedingt. Schon im Jahre 1991 wurde die antiangiogenetische Wirkung des 16-kDa-PRL auf Endothelzellen von Ferrara et al. beschrieben (Ferrara et al., 1991). Über die Aktivierung von Caspase-3 und NF- κ B soll das 16-kDa-PRL die Apoptose in Endothelzellen einleiten (Tabruyn et al., 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass es einerseits zur Inhibition der VEGF-induzierten proangiogenetischen Signalkaskaden (Angelo et al., 1999) und andererseits durch Blockade der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu einer Inhibition der Vasodilatation kommt (Gonzalez et al., 2004).

Bromocriptin scheint aus den oben angeführten Gründen keine direkten Effekte auf das Myokard zu verursachen. Es gewährleistet wahrscheinlich eher durch den Erhalt der Mikrozirkulation eine suffiziente Substrat- und Sauerstoffversorgung der myokardialen Gefäße und verbessert dadurch den kardialen Metabolismus in postpartalen STAT3-KO Mäusen, was sich in unseren Versuchen in einer verbesserten Atmungskapazität im Vergleich zu der behandelten WT-Versuchsgruppe geäußert hat.

5.4 Auswirkungen der Bromocriptin-Behandlung auf die mitochondriale ROS-Emission bei postpartalen STAT3-Knockout Mäusen

Die zuvor beschriebenen protektiven Effekte der Bromocriptin-Behandlung auf das Myokard beruhen sehr wahrscheinlich im Wesentlichen auf die Inhibition der Prolaktin-Ausschüttung und der konsekutiv reduzierten 16-kDa-PRL-Entstehung. Wir vermuten, dass die herunterregulierte mitochondriale Mn-SOD infolge des STAT3-Verlusts bei der PPCM maßgeblich zu der erhöhten ROS-Konzentration in STAT3-defizienten Mäusen beiträgt, welche wiederum durch Steigerung des oxidativen Stresses die Sekretion des proteolytischen Enzyms Cathepsin D (CD) und des maladaptiven 16-kDa-PRL zur Folge hat. Eine Regulation der STAT3- bzw. Mn-SOD-Expression durch Bromocriptin ist nicht bekannt. Es ist allerdings anzunehmen, dass die ROS-Produktion durch die wiederhergestellte Atmungskapazität reduziert werden kann. Vorstellbar wäre auch, dass die Entstehung von ROS durch den insgesamt verbesserten myokardialen Metabolismus verringert wird.

Die Superoxid-Produktion, welche bei Hilfiker et al. anhand immunhistochemischer Färbemethoden des LV in situ dargestellt wurde, konnte erst nach 3 Wochen Bromocriptin-Behandlung signifikant reduziert werden (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Unsere vorläufigen Ergebnisse der ESR-Spektroskopie an myozytären Mitochondrien der behandelten STAT3-KO Mäusen zeigten insbesondere im State 2, wie bei der Messung an den unbehandelten Versuchstieren, die Tendenz zu mehr $\cdot\text{O}_2^-$ als in der WT-Vergleichsgruppe. Wir konnten allerdings keinen relevanten Unterschied in der mitochondrialen H_2O_2 -Konzentration der Versuchstiere nach der Behandlung mit Bromocriptin feststellen. Es besteht die Möglichkeit, dass die von Hilfiker et al. beschriebenen Auswirkungen von Bromocriptin auf die ROS-Produktion erst bei einer länger andauernden Behandlung in Erscheinung treten, da unsere Versuchstiere für nur 2 Wochen postpartal behandelt worden sind und somit einer kürzeren Behandlungsdauer unterlegen waren.

In einer Arbeit von Yoshikawa et al. von 1994 wurde im Rahmen der Behandlung der Parkinson-Erkrankung der Effekt von Bromocriptin auf Sauerstoffradikale, speziell auf Superoxid, geprüft (Yoshikawa et al., 1994). Dabei postulieren Yoshikawa et al., dass Bromocriptin selbst antioxidative Eigenschaften besitzt und als Radikalfänger agieren soll, was die Reduktion der Superoxid-Konzentration im Gewebe des LV bei Hilfiker et al. erklären könnte. Des Weiteren wurde erst kürzlich gezeigt, dass Bromocriptin über Aktivierung der kardialen Dopamin-D₂-Rezeptoren in einem nicht schwangeren Patientenkollektiv, also unabhängig von der Blockade

der Prolaktin-Ausschüttung, den Effekt der Postkonditionierung im Kontext der Ischämie/Reperfusion verstärkt und somit kardioprotektiv wirkt (Gao et al., 2013). Dabei wurde durch die Anwendung von Bromocriptin nicht nur die Infarktgröße signifikant reduziert, sondern interessanterweise auch die Aktivität der SOD gesteigert, wobei in dieser Arbeit nicht zwischen der rein in den Mitochondrien vorkommenden Mn-SOD und der cytosolischen SOD unterschieden wurde. Auch dies wäre ein denkbarer Mechanismus über welchen der oxidative Stress in den schwangeren Versuchstieren von Hilfiker et al. gesenkt worden sein könnte.

5.5 Fazit

Wir schlussfolgern aus unseren Untersuchungen und Ergebnissen, dass der STAT3-Verlust in Kardiomyozyten von postpartalen Mäusen zu einer Herunterregulierung der mitochondrialen Mn-SOD mit einer konsekutiv gesteigerten Superoxid-Produktion geführt hat. Neben der generell vorhandenen Belastung des Körpers durch die Schwangerschaft begünstigt dieser pathologische Mechanismus auf zellulärer Ebene die Entstehung von oxidativem Stress, welcher wiederum weitere maladaptive Prozesse, wie die Entstehung des 16-kDa-PRL und dessen hemmenden Effekte auf die Angiogenese, zur Folge hat. Der kardiale Metabolismus wird durch die reduzierte Vaskularisierung wesentlich beeinträchtigt, welches sich deutlich durch eine verschlechterte mitochondriale ADP-induzierte Respiration und eine reduzierte Energiebereitstellung in Form von ATP geäußert hat. Die Beeinträchtigung der Atmungskette bietet hierbei wiederum eine weitere Möglichkeit, wie ROS, neben dem verminderten Abbau durch die Mn-SOD, entstehen können. ROS sind in der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz von großer Bedeutung und führen unmittelbar über unterschiedliche Mechanismen, zu denen u.a. das maladaptive Remodeling, die Beeinträchtigung der ETC durch direkte Schäden an den einzelnen Komplexen und die Modifizierung von redoxsensiblen Proteinen gehören, zum Krankheitsprogress. Die Ergründung der genauen Mechanismen der ROS-Entstehung ist daher unerlässlich. Unter basalen Bedingungen führte der STAT3-Knockout zu keinen wesentlichen Veränderungen, doch wir vermuten, dass die peri- bzw. postpartale Herzinsuffizienz gerade durch die erhöhte Arbeitslast des Herzens in der Schwangerschaft bzw. Perinatalperiode ausgelöst worden sein könnte. Unklar bleibt weiterhin, ob STAT3 seine Effekte direkt in den Mitochondrien oder als Transkriptionsfaktor durch Aktivierung bestimmter Gene mediiert.

Die Behandlung mit dem Dopamin-D₂-Agonisten Bromocriptin führte zu einer Verbesserung der mitochondrialen Atmungskapazität bzw. stellte diese wieder vollständig her. Dabei könnte der

6 Literaturverzeichnis

- 1) Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(9-10), 1140–1149.
- 2) Adlam, V. J., Harrison, J. C., Porteous, C. M., James, A. M., Smith, R. a J., Murphy, M. P., Sammut, I. A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Faseb J*, 19(9), 1088–95.
- 3) Ago, T., Liu, T., Zhai, P., Chen, W., Li, H., Molkenin, J. D., Sadoshima, J. (2008). A Redox-Dependent Pathway for Regulating Class II HDACs and Cardiac Hypertrophy. *Cell*, 133(6), 978–993.
- 4) Akar, F. G., Aon, M. A., Tomaselli, G. F., & O'Rourke, B. (2005). The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3527–3535.
- 5) Ambrosio, G., Zweier, J. L., Duilio, C., Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P. P., Flaherty, J. T. (1993). Evidence that mitochondrial respiration Is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18532–18541.
- 6) Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J., & Weiner I, R. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor- induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol.Endocrinol.*, 13(5), 692–704.
- 7) Aon, M. A., Cortassa, S., & O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), 865–877.
- 8) Armondas, A. A., Hobai, I. A., Tomaselli, G. F., Winslow, R. L., & O'Rourke, B. (2003). Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circulation Research*, 93(1), 46–53.
- 9) Babot, M., & Galkin, A. (2013). Molecular mechanism and physiological role of active-deactive transition of mitochondrial complex I. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), 1325–30.
- 10) Balaban, R. S. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: Role of cytosolic calcium.

- Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), 1259–1271.
- 11) Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, 120(4), 483–495.
 - 12) Bartoli, M., Platt, D., Lemtalsi, T., Gu, X., Brooks, S. E., Marrero, M. B., & Caldwell, R. B. (2003). VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), 1562–1564.
 - 13) Bay, J., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2013). Intracellular Na⁺ and cardiac metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 20–27.
 - 14) Bers, D. M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21(17), 380–387.
 - 15) Bo, M. (1999). Contractile Dysfunction. *In Vitro*, 346–353.
 - 16) Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G., & Schulz, R. (2008). The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure. *Pharmacology and Therapeutics*, 120(2), 172–185.
 - 17) 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 Research in Cardiology*, 105(6), 771–785.
 - 18) Boengler, K., Ungefug, E., Heusch, G., & Schulz, R. (2013). The STAT3 inhibitor stattic impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation. *Current Pharmaceutical Design*, 19(39), 6890–5.
 - 19) Booz, G. W., Day, J. N. E., & Baker, K. M. (2002). Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(11), 1443–1453.
 - 20) Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755–767.

- 21) Butturini, E., Darra, E., Chiavegato, G., Cellini, B., Cozzolino, F., Monti, M., ... Mariotto, S. (2014). S-glutathionylation at Cys328 and Cys542 impairs STAT3 phosphorylation. *ACS Chemical Biology*, 9(8), 1885–1893.
- 22) Canton, M., Skyschally, A., Menab??, R., Boengler, K., Gres, P., Schulz, R., Heusch, G. (2006). Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *European Heart Journal*, 27(7), 875–881.
- 23) Casteilla, L., Rigoulet, M., & Pénicaud, L. (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life*, 52(3-5), 181–8.
- 24) Chance, B., Sies, H., & Boveris, a. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.
- 25) Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031.
- 26) Chouchani, E. T., Methner, C., Nadtochiy, S. M., Logan, A., Pell, V. R., Ding, S., Murphy, M. P. (2013). Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nature Medicine*, 19(6), 753–9.
- 27) Chung, E., & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular Research*, 101(4), 561–70.
- 28) Clapp, J. F., & Capeless, E. (1997). Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *American Journal of Cardiology*, 80(11), 1469–1473.
- 29) Corbacho, A. M., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, 173(2), 219–238.
- 30) Creemers, E. E., Cleutjens, J. P., Smits, J. F., & Daemen, M. J. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circulation Research*, 89(3), 201–210.
- 31) Darnell, J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5332), 1630–1635.

-
- 32) Despa, S., & Bers, D. M. (2013). Na⁺ transport in the normal and failing heart - Remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *61*, 2–10.
- 33) Despa, S., Islam, M. A., Weber, C. R., Pogwizd, S. M., & Bers, D. M. (2002). Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation*, *105*(21), 2543–2548.
- 34) Dixon, L. J., Morgan, D. R., Hughes, S. M., McGrath, L. T., El-Sherbeeny, N. A., Plumb, R. D., McVeigh, G. E. (2003). Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation*, *107*(13), 1725–1728.
- 35) Duranski, M. R., Greer, J. J. M., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., Lefer, D. J. (2005). Duranski 2005 - Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver.pdf, *115*(5).
- 36) Elf Johan, Gene-Wei Li, X. S. X. (2010). NIH Public Access, *316*(5828), 1191–1194.
- 37) Elschami, M., Scherr, M., Philippens, B., & Gerardy-Schahn, R. (2013). Reduction of STAT3 expression induces mitochondrial dysfunction and autophagy in cardiac HL-1 cells. *European Journal of Cell Biology*, *92*(1), 21–29.
- 38) Ferrara, N., Clapp, C., & Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, *129*(2), 896–900.
- 39) Chikando, A., Sarah Kettlewell, George S. Williamsa, Godfrey Smith, and W.J. Lederer (2011), *J Mol Cell Cardiology*, *72*(2), 181–204.
- 40) Gatzeva-Topalova, P. Z., Warner, L. R., Pardi, A., & Carlos, M. (2011). NIH Public Access, *18*(11), 1492–1501.
- 41) Gauthier, L. D., Greenstein, J. L., Cortassa, S., O'Rourke, B., & Winslow, R. L. (2013). A Computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria. *Biophysical Journal*, *105*(4), 1045–1056.
- 42) Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, *145*(12), 5714–5722.

- 43) Goodman, M. D., Koch, S. E., Fuller-Bicer, G. a, & Butler, K. L. (2008). Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), H1649–56.
- 44) Haghikia, A., Podewski, E., Berliner, D., Sonnenschein, K., Fischer, D., Angermann, C. E., Hilfiker-Kleiner, D. (2015). Rationale and design of a randomized, controlled multicentre clinical trial to evaluate the effect of bromocriptine on left ventricular function in women with peripartum cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology : Official Journal of the German Cardiac Society*, 911–917.
- 45) Halestrap, A. P. (2004). Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature*, 430(7003)
- 46) Halkein, J., Tabruyn, S. P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N. Q. N., Scherr, M., Struman, I. (2013). MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 123(5), 2143–2154.
- 47) Hayashidani, S., Tsutsui, H., Ikeuchi, M., Shiomi, T., Matsusaka, H., Kubota, T., Takeshita, A. (2003). Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285, H1229–H1235.
- 48) Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical Journal*, 334, 297–314.
- 49) Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N., & Skyschally, A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation Research*, 109(11), 1302–8.
- 50) Heusch, G., Canton, M., Aker, S., Van De Sand, A., Konietzka, I., Rassaf, T., Schulz, R. (2010). The contribution of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase to myofilament oxidation and progression of heart failure in rabbits. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1408–1416.
- 51) Heytler, P. G., & Prichard, W. W. (1962). A new class of uncoupling agents — Carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7(4), 272–275.

-
- 52) Hilfiker-Kleiner, D. (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. *Circulation Research*, 95(2), 187–195.
- 53) Hilfiker-kleiner, D., & Bauersachs, J. (2016). Herzerkrankungen in der Schwangerschaft, 110–115.
- 54) Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Drexler, H. (2007). A Cathepsin D-Cleaved 16 kDa Form of Prolactin Mediates Postpartum Cardiomyopathy. *Cell*, 128(3), 589–600.
- 55) Hilfiker-Kleiner, D., Struman, I., Hoch, M., Podewski, E., & Sliwa, K. (2012). 16-KDa prolactin and bromocriptine in postpartum cardiomyopathy. *Current Heart Failure Reports*, 9, 174–182.
- 56) Hirota, H., Chen, J., Betz, U. a, Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Chien, K. R. (1999). Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97(2), 189–198.
- 57) Hospital, R., & King-, U. (2007). The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *Science*.
- 58) Huang, G., Lu, H., Hao, A., Ng, D. C. H., Ponniah, S., Guo, K., Cao, X. (2004). GRIM-19 , a Cell Death Regulatory Protein , Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I GRIM-19 , a Cell Death Regulatory Protein , Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8447–56.
- 59) Hunter, S., & Robson, S. C. (1992). Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *British Heart Journal*, 68(6), 540–543.
- 60) Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Takeshita, a. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*, 88(5), 529–535.
- 61) Heusch, G., Boengler, K., & Schulz, R. (2008). Cardioprotection: Nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation*, 118(19), 1915–1919.
- 62) Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360–4.

-
- 63) Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M. F., Böhm, M., Maack, C. (2010). Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation*, *121*(14), 1606–1613.
- 64) Kohlhaas, M., & Maack, C. (2010). Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes. *Circulation*, *122*(22), 2273–2280.
- 65) Kohlhaas, M., & Maack, C. (2013). Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular Research*, *98*(2), 259–268.
- 66) Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., & Kishimoto, T. (1998). Activation of gp130 Transduces Hypertrophic Signals via STAT3 in Cardiac Myocytes. *Circulation*, *98*(4), 346–352.
- 67) Kurdi, M., Sivakumaran, V., Duh??, R. J., Aon, M. A., Paolocci, N., & Booz, G. W. (2012). Depletion of cellular glutathione modulates LIF-induced JAK1-STAT3 signaling in cardiac myocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *44*(12), 2106–2115.
- 68) Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *The Biochemical Journal*, *368*(Pt 2), 545–553.
- 69) Lamparter, S., Pankuweit, S., & Maisch, B. (2007). Clinical and immunologic characteristics in peripartum cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *118*(1), 14–20.
- 70) Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(18), 9782–9787.
- 71) Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., & Opie, L. H. (2005). Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-?? activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, *112*(25), 3911–3918.
- 72) Levy, D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation*,

- 109(9), 1143–1148.
- 73) Li, H., Gao, J., Guo, J., Li, H., Bai, S., Wu, B., ... Li, H. (2013). Involvement of dopamine D2 receptors activation in ischemic post-conditioning-induced cardioprotection through promoting PKC- ϵ particulate translocation in isolated rat hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 379(1-2), 267–276.
- 74) Li, J., Umar, S., Iorga, A., Youn, J. Y., Wang, Y., Regitz-Zagrosek, V., Eghbali, M. (2012). Cardiac vulnerability to ischemia/reperfusion injury drastically increases in late pregnancy. *Basic Research in Cardiology*, 107(4).
- 75) Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 11(4), 376–381.
- 76) Lim, C. P., & Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular bioSystems*, 2(11), 536–550.
- 77) Lkhider, M., Castino, R., Bouguyon, E., Isidoro, C., & Ollivier-Bousquet, M. (2004). Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *Journal of Cell Science*, 117, 5155–5164.
- 78) Maack, C., & O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Research in Cardiology*, 102(5), 369–392.
- 79) Mahendru, A. a, Everett, T. R., Wilkinson, I. B., Lees, C. C., & McEniery, C. M. (2014). A longitudinal study of maternal cardiovascular function from preconception to the postpartum period. *Journal of Hypertension*, 32(4), 849–56.
- 80) Mannella, C. A. (2008). Structural diversity of mitochondria: Functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 171–179.
- 81) Mantel, C., Messina-graham, S., Moh, A., Cooper, S., Hancoc, G., Fu, X., Dc, W. (2013). defects , mitochondrial dysfunction , ROS overproduction , and a rapid Mouse hematopoietic cell – targeted STAT3 deletion: stem / progenitor cell defects , mitochondrial dysfunction , ROS overproduction , and a rapid aging – like phenotype, 120(13), 2589–2599.
- 82) Mootha, V. K., Arai, A. E., & Balaban, R. S. (1997). Maximum oxidative phosphorylation

- capacity of the mammalian heart. *The American Journal of Physiology*, 272(2 Pt 2), H769–75.
- 83) Morales, A., Painter, T., Li, R., Siegfried, J. D., Li, D., Norton, N., & Hershberger, R. E. (2010). Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation*, 121(20), 2176–2182.
- 84) Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G., & Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(1), 203–8.
- 85) Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- 86) Myers, J. (2009). CELL BIOLOGY: Moonlighting in Mitochondria. *Science*, 323(5915), 723–724.
- 87) Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M. I., Eizirik, D. L., 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(9), 979–981.
- 88) Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26–33.
- 89) Nickel, A., Löffler, J., & Maack, C. (2013). Myocardial energetics in heart failure. *Basic Research in Cardiology*, 108(4), 358.
- 90) Osugi, T., Oshima, Y., Fujio, Y., Funamoto, M., Yamashita, A., Negoro, S., Kishimoto, T. (2002). Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6676–6681.
- 91) Chance, B., Williams, G. R. (1955). Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1955, 217:429-438
- 92) Joanna Wegrzyn, Ramesh Potla, Yong-Joon Chwae, Naresh B. V. Sepuri, Qifang Zhang, Thomas Koeck, Marta Derecka, Karol Szczepanek, Magdalena Szelag, Agnieszka

- Gornicka, Akira Moh, Shadi Moghaddas, Qun Chen, Santha Bobbili, Joanna Cichy, Jozef Dulak, Darren P. Baker, Alan Wolfman, Dennis Stuehr, Medhat O. Hassan, Xin-Yuan Fu, Narayan Avadhani, Jennifer I. Drake, Paul Fawcett, Edward J. Lesnefsky, Andrew C. Lerner (2009). Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration, 323(February), 793–798.
- 93) Pain, T., Yang, X. M., Critz, S. D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G. S., Downey, J. M. (2000). Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circulation Research*, 87(6), 460–466.
- 94) Phillips, D., Reilley, M. J., Aponte, A. M., Wang, G., Boja, E., Gucek, M., & Balaban, R. S. (2010). Stoichiometry of STAT3 and Mitochondrial Proteins: Implications For The Regulation Of Oxidative Phosphorylation By Protein-Protein Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23532–23536.
- 95) Pieske, B., Maier, L. S., Piacentino, V., Weisser, J., Hasenfuss, G., & Houser, S. (2002). Rate dependence of $[Na^+]_i$ and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation*, 106(4), 447–453.
- 96) Podewski, E. K. (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.
- 97) Rajagopalan, S., Meng, X.-P., Ramasamy, S., Harrison, D. G., & Gallis, Z. S. (1996). Reactive Oxygen Species Produced by Macrophage-Derived Foam Cells Regulate the Activity of Vascular Matrix Metalloproteinases In Vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 98, 2572–2579.
- 98) Randall, R. J., & Lewis, a. (1951). The folin by oliver. *Readings*, 193(1), 265–275.
- 99) Renger, G., & Hanssum, B. (2009). Oxygen detection in biological systems. *Photosynthesis Research*, 102(2), 487–498.
- 100) Roberg, K., & Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *The American Journal of Pathology*, 152(5), 1151–1156.
- 101) Rohde, L. E., Ducharme, a., Arroyo, L. H., Aikawa, M., Sukhova, G. H., Lopez-Anaya, a.,

- Lee, R. T. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*, *99*(23), 3063–70.
- 102) Sanghavi, M., & Rutherford, J. D. (2014). Cardiovascular Physiology of Pregnancy. *Circulation*, *130*(12), 1003–1008.
- 103) Sarafian, T. A., Montes, C., Imura, T., Qi, J., Coppola, G., Geschwind, D. H., & Sofroniew, M. V. (2010). Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS ONE*, *5*(3), 1–11.
- 104) Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(5), 343–354.
- 105) Schumacker, P. T. (2013). Nitric oxide quenches the fire in heart mitochondria. *Nature Medicine*, *19*(6), 666–667.
- 106) Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U., & Berg, T. (2006). Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry and Biology*, *13*(11), 1235–1242.
- 107) Semenza, G. L., Aryee, D. N. T., Niedan, S., Kauer, M., Schwentner, R., Idriss, M., ... Kovar, H. (2011). O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 Oxygen Sensing in Health and Disease O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1, *300*(24), 1173–1177.
- 108) Shattock, M. J., & Matsuura, H. (1993). Measurement of Na(+)-K⁺ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. *Circulation Research*, *72*(1), 91–101.
- 109) Skala, M., & Ramanujam, N. (2010). Multiphoton redox ratio imaging for metabolic monitoring in vivo. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *594*, 155–62.
- 110) Skyschally, A., Van Caster, P., Boengler, K., Gres, P., Musiolik, J., Schilawa, D., Heusch, G. (2009). Ischemic postconditioning in pigs: No causal role for risk activation. *Circulation Research*, *104*(1), 15–18.
- 111) Sliwa, K., & Böhm, M. (2014). Incidence and prevalence of pregnancy-related heart

- disease. *Cardiovascular Research*, 101(4), 554–60.
- 112) Sliwa, K., Förster, O., Libhaber, E., Fett, J. D., Sundstrom, J. B., Hilfiker-Kleiner, D., & Ansari, A. A. (2006). Peripartum cardiomyopathy: Inflammatory markers as predictors of outcome in 100 prospectively studied patients. *European Heart Journal*, 27(4), 441–446.
- 113) Sliwa, K., Hilfiker-Kleiner, D., Petrie, M. C., Mebazaa, A., Pieske, B., Buchmann, E., ... McMurray, J. J. V. (2010). Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 12(8), 767–778.
- 114) Spinale, F. G., Coker, M. L., Thomas, C. V., Walker, J. D., Mukherjee, R., & Hebbar, L. (1998). Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circulation Research*, 82, 482–495.
- 115) Staniek, K., & Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1460(2-3), 268–275.
- 116) Steinberg, S. F. (2014). NIH Public Access, 112(2), 393–405.
- 117) Stricklett, P. K., Nelson, R. D., & Kohan, D. E. (1999). The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *The American Journal of Physiology*, 276(5 Pt 2), F651–7.
- 118) Studer, R., Reinecke, H., Bilger, J., Eschenhagen, T., Bohm, M., Hasenfuss, G., ... Drexler, H. (1994). Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res*, 75(3), 443–453.
- 119) Szczepanek, K., Chen, Q., Derecka, M., Salloum, F. N., Zhang, Q., Szlag, M., ... Larner, A. C. (2011). Mitochondrial-targeted signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 29610–29620.
- 120) Szczepanek, K., Lesnefsky, E. J., & Larner, A. C. (2012). Multi-tasking: Nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends in Cell Biology*, 22(8), 429–437.

- 121) Szeto, H. H. (2014). First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British Journal of Pharmacology*, *171*(8), 2029–2050.
- 122) Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. a., & Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(February), 1815–1823.
- 123) Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., ... Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(8), 3801–3804.
- 124) Tammineni, P., Anugula, C., Mohammed, F., Anjaneyulu, M., Larner, A. C., & Sepuri, N. B. V. (2013). The import of the transcription factor STAT3 into mitochondria depends on GRIM-19, a component of the electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(7), 4723–4732.
- 125) The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. (2000). Vitamin E Supplementation and Cardiovascular Events. *The England Journal of Medicine*, *342*(January), 154–160.
- 126) Toescu, V., Nuttall, S. L., Martin, U., Kendall, M. J., & Dunne, F. (2002). Oxidative stress and normal pregnancy. *Clinical Endocrinology*, *57*(5), 609–613.
- 127) Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2009). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovascular Research*, *81*(3), 449–456.
- 128) Turkson, J., & Turkson, J. (2016). Expert Opinion on Therapeutic Targets STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery, 8222(April).
- 129) Turrens, J. F., Alexandre, A., & Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *237*(2), 408–414.
- 130) Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Papaioakeim, M., Hatzinikolaou, E. I., Stakos, D. A., Tentes, I. K., ... Hatseras, D. I. (2005). Comparison of levels of matrix metalloproteinase-2

- and -3 in patients with ischemic cardiomyopathy versus nonischemic cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology*, 96(10), 1449–1451.
- 140) Umar, S., Nadadur, R., Iorga, a., Amjedi, M., Matori, H., & Eghbali, M. (2012). Cardiac structural and hemodynamic changes associated with physiological heart hypertrophy of pregnancy are reversed postpartum. *Journal of Applied Physiology*, 113(August 2012), 1253–1259.
- 141) Van Remmen, H., Williams, M. D., Guo, Z., Estlack, L., Yang, H., Carlson, E. J., ... Richardson, a. (2001). Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), H1422–H1432.
- 142) Van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Van Tintelen, J. P., Van Veldhuisen, D. J., Van Der Werf, R., Jongbloed, J. D. H., Paulus, W. J., ... Van Den Berg, M. P. (2010). Peripartum cardiomyopathy as a part of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 121(20), 2169–2175.
- 143) Vu, T. H., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes and Development*, 14(17), 2123–2133.
- 144) Tanja Weinbrenner, Mercedes Cladellas, Maria Isabel Covas, Montserrat Fito, Marta Tomas, Mariano Sentı, Jordi Bruguera, Jaume Marrugat (2003). High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 168(1), 99–106.
- 145) Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., Kitsis, R. N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1497–1504.
- 146) Xie, Y., Kole, S., Precht, P., Pazin, M. J., & Bernier, M. (2009). S-Glutathionylation impairs signal transducer and activator of transcription 3 activation and signaling. *Endocrinology*, 150(3), 1122–1131.
- 147) Xuan, Y. T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y., & Bolli, R. (2001). An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9050–9055.
- 148) Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury, 1121–1135.

- 149) Yoshikawa, T., Minamiyama, Y., Naito, Y., & Kondo, M. (1994). Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. *Journal of Neurochemistry*, 62(3), 1034–8.
- 150) Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., & Shah, A. M. (2012). NADPH Oxidases in Heart Failure: Poachers or Gamekeepers? *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(9), 120827084821005.
- 151) Zhang, Q., Rajee, V., Yakovlev, V. A., Yacoub, A., Szczepanek, K., Meier, J., Lerner, A. C. (2013). Mitochondrial localized Stat3 promotes breast cancer growth via phosphorylation of serine 727. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31280–31288.
- 152) Zhou, H., Newnum, A. B., Martin, J. R., Li, P., Nelson, M. T., Moh, A., Li, J. (2011). Osteoblast/osteocyte-specific inactivation of Stat3 decreases load-driven bone formation and accumulates reactive oxygen species. *Bone*, 49(3), 404–411.
- 153) Zouein, F. A., Altara, R., Chen, Q., Lesnefsky, E. J., Kurdi, M., & Booz, G. W. (2015). Pivotal Importance of STAT3 in Protecting the Heart from Acute and Chronic Stress: New Advancement and Unresolved Issues. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2(November), 1–17.
- 154) Zouein, F. A., Duhé, R. J., Arany, I., Shirey, K., Hosler, J. P., Liu, H., Booz, G. W. (2014). Loss of STAT3 in mouse embryonic fibroblasts reveals its Janus-like actions on mitochondrial function and cell viability. *Cytokine*, 66(1), 7–16.
- 155) Weiss BM, von Segesser LK, Alon E, Seifert B, Turina MI. (1998). Outcome of cardiovascular surgery and pregnancy: a systematic review of the period 1984-1996. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Dec;179(6 Pt 1):1643-53
- 156) Peters RM., Flack JM. (2004). Hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2004 Mar-Apr;33(2):209-20
- 157) Pearson GD, Veille JC, Rahimtoola S, Hsia J, Oakley CM, Hosenpud JD, Ansari A, Baughman KL. Peripartum cardiomyopathy: National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases (National Institutes of Health) workshop recommendations and review. *JAMA*. 2000 Mar 1;283(9):1183-8.
- 158) Mela L, Seitz S. (1979). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol*. 1979;55:39-46

- 159) Clark Lc Jr., Wolf R., Granger D., Taylor Z. (1953), Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol.* 1953 Sep;6(3):189-93.
- 160) Lowry Oh., Rosebrough Nj., Farr Al., Randall Rj. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
- 161) Saar, J.A. (2014). Die Rolle von STAT3 bei der Regulation mitochondrialer Atmung und reaktiver Sauerstoffspezies im Herzen
- 162) Hudlicka O., Brown MD. (1996). Postnatal growth of the heart and its blood vessels. *J Vasc Res.* 1996 Jul-Aug;33(4):266-87.
- 163) Stapel, B., Kohlhaas, M., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Erschow, S., Knuuti, J., Silvola, J., Roivainen, A., Saraste, A., Nickel, A., Saar, J., Sieve, I., Pietzsch, S., Müller, M., Bogeski, I., Kappl, R., Jauhiainen, M., Thackeray, J., Scherr, M., Bengel, F., Hagl, C., Tudorache, I., Bauersachs, J., Maack, C., Hilfiker-Kleiner, D. Low STAT3 expression sensitizes to toxic effects of b-adrenergic receptor stimulation in peripartum cardiomyopathy. *European Heart Journal* 2017 38, 349–361

7 Publikationen/ Danksagung

7.1 Vorträge

Vortrag in einer „Rapid Fire Session“ auf dem “Heart Failure Congress” in Sevilla, Spanien (2015): *Decreased mitochondrial respiration and increased fractional ROS production in STAT3- deficient mice with Peripartum Cardiomyopathy*

Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) in Mannheim (2015): *Decreased mitochondrial respiration and increased fractional ROS production in STAT3- deficient mice with Peripartum Cardiomyopathy*

7.2 Danksagung

Bei all denjenigen Menschen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation begleitet und fortwährend unterstützt haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein Dank richtet sich in erster Linie besonders an Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack, der mit seiner ansteckenden Begeisterung und Leidenschaft für die Wissenschaft mein Interesse an der Kardiologie und die wissenschaftliche Arbeit überhaupt erst hervorrief, für seine großartige Betreuung und Unterstützung und dafür, dass er mir es ermöglichte, diese Arbeit zu realisieren. Es war für mich eine besondere Ehre mit einem so engagierten, motivierten und stets freundlich zugewandten Menschen zusammenzuarbeiten.

Auch bei Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas und Herrn Dr. rer. nat. Alexander Nickel möchte ich mich besonders für die erstklassige Betreuung und Hilfestellung bedanken, insbesondere im Kontext der Experimente aber auch zu einem großen Anteil bei Fragestellungen bezüglich der Auswertung und der Interpretation unserer Ergebnisse.

Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Angestellten des kardiologischen Forschungslabors, Frau Schnellbach und Frau Gulentz, die mich an das wissenschaftliche Arbeiten im Forschungslabor heranführten und mir jederzeit überaus hilfsbereit bei Fragestellungen jedweder Art zur Seite standen. Ihr habt einen großen wesentlichen Anteil zu dem angenehmen Arbeitsklima im Forschungslabor beigetragen. Es war mir eine große Freude, mit euch zusammenzuarbeiten.

Generell möchte ich mich bei allen weiteren Doktoranden und Doktorandinnen, Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des kardiologischen Forschungslabors, unter anderem Dr. rer. nat. Mathias Hohl, für die allgemeine Hilfsbereitschaft und die reibungslose Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Denise Hilfiker-Kleiner für die stets unkomplizierte Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Versuchstiere, ohne die die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken.

Schließlich möchte ich noch bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Vater, die mich bei all meinen Entscheidungen bedingungslos unterstützt haben und mir das Privileg, zu studieren und zu promovieren, erst ermöglichten, meinen größten Dank aussprechen.