

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Herzzentrum Leipzig der Universität Leipzig

**Untersuchung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der
mitochondrialen Integrität bei Vorhofflimmern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Dorina Schwach
aus Stuttgart

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. med. vet. Thomas W. Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Almuth Einspanier
Prof. Michael A. Borger MD PhD

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Almuth Einspanier, Veterinär-Physiologisch-Chemisches
Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Michael A. Borger MD PhD, Universitätsklinik für Herzchirurgie,
Universität Leipzig
Prof. Dr. med. David Holzhey, Universitätsklinikum Wuppertal, Universität
Witten/Herdecke, Abteilung Herzchirurgie

Tag der Verteidigung: 14.06.2022

Für die schabendabschde Schwabe

Birgit und Matthias

Danke

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	1
1.1 VF in der Humanmedizin	1
1.2 VF in der Veterinärmedizin.....	2
1.3 Pathophysiologie des VF.....	4
1.4 Oxidativer Stress und dessen Rolle in der Pathogenese des VF	8
1.5 Biomarker des oxidativen Stress	10
1.6 Apoptose und Hypoxie im Rahmen des VF	12
1.7 ROS- und DNA-Schäden.....	13
1.8 Einfluss des Thioredoxin-Systems bei oxidativem Stress.....	14
2 Zielsetzung.....	15
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Geräte	16
3.2 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	18
3.3 Chemikalien und Reagenzien	19
3.4 Herzohrproben	20
3.4.1 Proteinextraktion Herzohrproben.....	20
3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung der Herzohrgewebelysate.....	22
3.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten	23
3.5.1 NOX-Aktivität.....	23
3.5.2 XO-Aktivität	25
3.5.3 SOD-Aktivität	26
3.5.4 Katalase-Aktivität	27
3.6 ELISA	28
3.6.1 AIF.....	28
3.6.2 Cytochrom C	29

3.6.3 HIF-1 α	30
3.7 PCR.....	31
3.7.1 Isolierung der mtDNA.....	31
3.7.2 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der mtDNA.....	32
3.7.3 Durchführung der PCR.....	32
3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.7.5 Isolierung der nucDNA.....	35
3.8. RT-PCR	35
3.9 SDS-PAGE und Western Blot	37
3.9.1 SDS-PAGE.....	39
3.9.2 Western Blot.....	40
3.10 Statistische Auswertung.....	42
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Gruppencharakteristika.....	43
4.2 Enzymkinetik.....	44
4.2.1 NOX-Aktivität.....	44
4.2.2 XO-Aktivität	46
4.2.3 SOD-Aktivität	47
4.2.4 Katalase-Aktivität	49
4.3 Quantifizierung der AIF-, Cytochrom C- und HIF-1 α -Konzentrationen mittels ELISA	50
4.3.1 AIF.....	50
4.3.2 Cytochrom C	51
4.3.3 HIF-1 α	52
4.4 Nachweis der 4977 bp-Deletion in der humanen mtDNA mittels PCR.....	53
4.5 Quantifizierung des relativen mtDNA-Gehaltes mittels RT-PCR.....	56

4.6 Proteinexpressionsmessungen von TRX 1, TXNIP und ITCH mittels Western Blot	58
.....
4.6.1 TRX1	58
4.6.2 TXNIP	59
4.6.3 ITCH	60
5 Diskussion.....	62
6 Zusammenfassung	71
7 Summary	73
8 Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums.	7
Abb. 2: Circulus vitiosus des VF.....	8
Abb. 3: Exemplarische Messung der NOX-Aktivität bei einer OD von 550 nm der Probe A19	45
Abb. 4: NOX-Aktivität der Patienten mit VF und SR.....	45
Abb. 5: Exemplarische Messung der XO-Aktivität bei 570 nm Probe A19	46
Abb. 6: XO-Aktivität der Patienten mit VF und SR	47
Abb. 7: Exemplarische Messung der SOD-Aktivität bei 420 nm Probe A19	48
Abb. 8: SOD-Aktivität der Patienten mit VF und SR.....	48
Abb. 9: Exemplarische Messung der Katalase-Aktivität bei 240 nm Probe A19.....	49
Abb. 10: Katalase-Aktivität der Patienten mit VF und SR	50
Abb. 11: AIF-Konzentration der Patienten mit VF und SR	51
Abb. 12: Cytochrom C-Konzentration der Patienten mit VF und SR.....	52
Abb. 13: HIF-1 α -Konzentration der Patienten mit VF und SR.....	53
Abb. 14a: Schematische Darstellung der humanen mtDNA	54
Abb. 14b: Schematische Darstellung der ROS geschädigten humanen mtDNA.....	54
Abb. 15: Exemplarische Gelelektrophorese für den Nachweis der 4977 bp-Deletion	55
Abb. 16: Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese der Proben A10 und A11.	56
Abb. 17: Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf von mtDNA und nucDNA.....	57
Abb. 18: Relativer mtDNA-Gehalt der Patienten mit VF und SR	58
Abb. 19: Proteinexpression TRX 1/GAPDH der Patienten mit VF und SR.....	59
Abb. 20: Proteinexpression TXNIP/GAPDH der Patienten mit VF und SR	60
Abb. 21: Proteinexpression ITCH/GAPDH der Patienten mit VF und SR	61

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der NOX-Aktivität in U/mg	25
Formel 2: Berechnung der XO-Aktivität in mU/ml.....	26
Formel 3: Berechnung der SOD-Aktivität in U/mg.....	27
Formel 4: Berechnung der Katalase-Aktivität in U/mg	28
Formel 5: AIF-Konzentration in ng/ml.....	29
Formel 6: Cytochrom C-Konzentration in ng/ml.....	30
Formel 7: HIF-1 α -Konzentration in pg/ml.....	31
Formel 8: Berechnung des relativen mtDNA-Gehalts.....	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Formen des VF.....	2
Tab. 2: Vergleich der symptomatischen Einteilung des VF in der Human- und der Veterinärmedizin	3
Tab. 3: Verwendete Geräte	16
Tab. 4: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	18
Tab. 5: Chemikalien und Reagenzien	20
Tab. 6: Zusammensetzung des Relaxingpuffers.....	21
Tab. 7: Zusammensetzung der Standardverdünnungsreihe mit BSA und Relaxing-Lysepuffer für die Proteinkonzentrationsbestimmung.....	23
Tab. 8: Zusammensetzung des Proteasompuffers.....	24
Tab. 9: Reaktionslösungen für die SOD-Aktivitätsbestimmung.....	26
Tab. 11: Primer für die PCR zum Nachweis der 4977 bp-Deletion	33
Tab. 12: Eingesetzte Primer-Kombinationen für die PCR	33
Tab. 13: Reaktionsablauf der PCR	34
Tab. 14: Komponenten der quantitativen RT-PCR.....	36
Tab. 15: Primer für die quantitative RT-PCR	37
Tab. 16: Reaktionsablauf der quantitativen RT-PCR	37
Tab. 17: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE und den Western Blot.....	38
Tab. 18: Zusammensetzung de Trenngels.....	39
Tab. 19: Zusammensetzung des Sammelgels.....	40
Tab. 20: Antikörper für den Western Blot	41
Tab. 21: Gruppencharakteristika der VF- und SR-Gruppe	43

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AERP	atriale effektive Refraktärzeit
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Apaf-1	Apoptose Protease aktivierender Faktor 1
AR	atriales Remodeling
arb. Units	<i>arbitrary units</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CP-Wert	<i>crossing point</i>
Cu/Zn	Kupfer/Zink
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUOX	duale Oxidase
EAR	elektrisches atriales Remodeling
EHRA	<i>European Heart Rhythm Association</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fe	Eisen
HIF-1	Hypoxie-induzierender Faktor
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ISACHC	<i>International small animal cardiac health council</i>
ITCH	Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase
KAR	kontraktiler atriales Remodeling
Mn	Mangan
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MW	Mittelwert

N ₂	Stickstoff
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NOX	NADPH - Oxidase
NTC	<i>no template control</i>
nucDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anionen
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
SAR	strukturelles atriales Remodeling
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sinusrhythmus
Tab.	Tabelle
TRX	Thioredoxin
TRXR	Thioredoxin - Reduktase
TXNIP	Thioredoxin - interagierendes Protein
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
VF	Vorhofflimmern
XDH	Xanthin - Dehydrogenase
XO	Xanthin - Oxidase
XOR	Xanthin - Oxidoreduktase
∑	Summe

1 Einführung

Das Vorhofflimmern (VF) ist eine kardiovaskuläre Erkrankung und eine der häufigsten Herzrhythmusstörungen, die im Zusammenhang mit kardialen Grunderkrankungen auftreten kann. VF gehört zu den supraventrikulären Arrhythmien, die meist symptomarm bleiben, aber auch Palpitationen, Tachykardien, Schwindel oder Synkopen hervorrufen können (KIRCHHOF et al. 2017). Durch Störungen der Erregungsbildung und Leitung im linken Atrium des Herzens kommt es zu kreisenden Erregungsfronten, die die Vorhofkontraktion vermindern. Die unregelmäßige Übertragung dieser Erregungsfronten auf die Ventrikel ist vom Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) abhängig (HEROLD et al. 2017). Im Elektrokardiogramm (EKG) können bei VF unregelmäßige QRS-Komplexe und fehlende P-Wellen nachgewiesen werden. Aufgrund der durch VF hervorgerufenen Unterbrechung der Synchronisation von Vorhof und Ventrikel, sowie der daraus resultierenden turbulenten Strömungsverhältnisse bei unzureichender Kontraktion, kann es zu erhöhter Thrombenbildung kommen. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Apoplex (KIRCHHOF et al. 2017).

1.1 VF in der Humanmedizin

In der Humanmedizin ist das VF die am häufigsten vorkommende, klinisch signifikante Arrhythmie (GO et al. 2001). Es werden Prävalenzen von 0,95 % (GO et al. 2001) bis 3 % (KIRCHHOF et al. 2017) beschrieben. Die Prävalenz des VF ist bei Frauen insgesamt geringer als bei Männern. Jedoch kann das Risiko, an der Erkrankung des VF zu sterben, für Frauen erhöht sein (KIRCHHOF et al. 2017). Darüber hinaus steigt die Inzidenz des VF mit zunehmendem Alter auf bis zu 10 % an. Von höheren Inzidenzen und Prävalenzen wird v.a. in Entwicklungsländern berichtet (KIRCHHOF et al. 2017). In der Humanmedizin werden fünf Formen des VF unterschieden: erstmalig diagnostiziert, paroxysmal, persistierend, lang anhaltend persistierend und permanent (KIRCHHOF et al. 2017). In Tabelle 1 (Tab. 1) sind die fünf Formen des VF beschrieben.

Tab. 1: Formen des VF

VF-Typ	Definition
erstmalig diagnostiziert	bisher noch nicht diagnostiziertes VF, unabhängig von der Schwere der Erkrankung
paroxysmal	VF, das innerhalb von 7 Tagen endet
persistierend	VF, das länger als 7 Tage anhält
lang anhaltend persistierend	ununterbrochenes VF, das mindestens 1 Jahr anhält
permanent	VF, das von Patient und Arzt akzeptiert wird; es erfolgt keine Behandlung

VF = Vorhofflimmern

Die Einteilung der Symptome des VF erfolgt nach dem Schema der *European Heart Rhythm Association* (EHRA) (Tab. 2). Die häufigsten Symptome des VF sind Müdigkeit, sowie Dyspnoe im Ruhezustand und/oder unter Belastung, seltener Herzklopfen und Brustschmerzen. Risikofaktoren für die Erkrankung des VF sind zunehmendes Alter, Nikotinabusus, Hypertonie, Adipositas oder bereits bestehende Herzklappenerkrankungen (KIRCHHOF et al. 2017). In der Framingham-Herz-Studie, einer Kohortenstudie, in der die Ursachen und Risiken kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht wurden, berichten WOLF et al. (1991) von einem erhöhten Schlaganfallrisiko und verkürzter Lebenszeit bei Patienten mit VF. Die Diagnose des VF erfolgt mithilfe eines EKG. Irreguläre RR-Intervalle ohne eindeutig abgrenzbare P-Wellen bestätigen den Verdacht des Vorliegens von VF. Je nach Form und Ausprägung des VF wird in der Humanmedizin mit oralen Antikoagulanzen (z.B. Dabigatran) als Schlaganfallprävention, Antiarrhythmika (z.B. Amiodaron), β -Blockern und Digitalispräparaten zur Herzfrequenzkontrolle oder chirurgischer Katheterablation therapiert (KIRCHHOF et al. 2017). In jedem Fall ist der Erhalt oder die Wiederherstellung der Lebensqualität das Ziel der Therapie. Eine Remission der Erkrankung ist ebenso möglich, wie das Versterben des Patienten, weshalb die Prognose individuell betrachtet werden sollte.

1.2 VF in der Veterinärmedizin

Auch in der Veterinärmedizin ist das VF beschrieben. Vor allem große Hunderassen wie der Dobermann, der Irische Wolfshund und die Deutsche Dogge, aber auch Rennpferde sind

besonders prädisponiert für diese Erkrankung (OHMURA et al. 2003, WESS et al. 2010). Das VF ist die am häufigsten diagnostizierte Arrhythmie bei Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), die in Europa und Nordamerika sehr häufig beim Dobermann vorkommt (DUKES-MCEWAN et al. 2003; DOMANJKO-PETRIČ et al. 2002). WESS et al. 2010 sprechen von einer kumulativen Prävalenz von 58,2 %. Die Überlebenszeit betroffener Hunde mit DCM und VF ist deutlich verringert (CALVERT et al. 1997). Bei Pferden ist VF die am häufigsten vorkommende, klinisch signifikante Arrhythmie (GEHLEN und STADLER 2002; RYAN et al. 2005). OHMURA et al. 2003 berichten von einer 0,29 %igen Prävalenz bei Rennpferden, wobei das Risiko an VF zu erkranken, ab einem Alter von 4 Jahren zunimmt. AMADA und KURITA (1975) berichten darüber hinaus von einer paroxysmalen Form bei Rennpferden, die innerhalb von 1 bis 2 Tagen reversibel ist. Das VF hat häufig einen Leistungsabfall der Pferde zur Folge (MITTEN 1996). Die Erkrankung des VF kann ebenfalls bei der Katze auftreten (CÔTE et al. 2004). In der Studie von CÔTE et al. (2004) wird von einem vermehrten Auftreten des VF bei männlichen Katzen berichtet. Eine spezifische Einteilung der Symptomatik des VF in der Veterinärmedizin existiert nicht. In der Veterinärmedizin werden Arrhythmien nach ihrem Ursprung (supraventrikulär/ventrikulär), ihrer Frequenz (bradykard/tachykard) und ihrer Art (Erregungsbildungs-/Erregungsleitungsstörung) eingeteilt (MENZIES-GOW 2001). Allerdings lässt sich die EHRA-Klassifikation der Humanmedizin mit der symptomatischen Einteilung der *International Small Animal Cardiac Health Council* (ISACHC) für Herzerkrankungen von 1994 angleichen. Die miteinander vergleichbaren Stadien sind jeweils nebeneinander aufgeführt (Tab. 2).

Tab. 2: Vergleich der symptomatischen Einteilung des VF in der Human- und der Veterinärmedizin

EHRA-Klassifikation	ISACHC-Klassifikation
<i>Score 1</i> <ul style="list-style-type: none"> • keine Symptome • keine Beschwerden 	<i>Score 1a</i> <ul style="list-style-type: none"> • keine Symptome • auskultatorisch Herzerkrankung feststellbar • röntgenologisch keine Vergrößerung des Herzens feststellbar
-	<i>Score 1b (s.1a)</i> <ul style="list-style-type: none"> • jedoch: röntgenologisch Vergrößerung des Herzens

EHRA-Klassifikation	ISACHC-Klassifikation
<i>Score 2a</i> <ul style="list-style-type: none"> • leichte Symptome • keine Einschränkung im Alltag 	-
<i>Score 2b</i> <ul style="list-style-type: none"> • mittelschwere Symptome • keine Einschränkung im Alltag 	-
<i>Score 3</i> <ul style="list-style-type: none"> • schwere Symptome • Einschränkungen im Alltag 	<i>Score 2</i> <ul style="list-style-type: none"> • leichte bis mittelgradige Herzerkrankung • verminderte Leistungstoleranz • Dyspnoe bei Anstrengung
<i>Score 4</i> <ul style="list-style-type: none"> • behindernde Symptome • kein normaler Alltag möglich 	<i>Score 3</i> <ul style="list-style-type: none"> • schwere Herzerkrankung • stark verminderte Leistungstoleranz • Dyspnoe im Ruhezustand

EHRA = European Heart Rhythm Association, ISACHC = International small animal cardiac health council

Als Risikofaktor für VF in der Veterinärmedizin gilt, ähnlich wie in der Humanmedizin, das zunehmende Alter (OHMURA et al. 2003). Die Diagnose des VF in der Veterinärmedizin erfolgt ebenfalls mithilfe des EKG. Die Auskultation sowie eine röntgenologische/sonografische Untersuchung und/oder ein Langzeit-EKG können in unklaren Fällen zur Diagnose führen. Die Behandlung des VF in der Veterinärmedizin beschränkt sich größtenteils auf die medikamentöse Therapie mit Antiarrhythmika und Digitalispräparaten. Bei Katzen sollte aufgrund des erhöhten Risikos einer Aortenthrombose an eine Therapie mit Antikoagulantien gedacht werden (CÔTE et al. 2004). Das Ziel der Therapie sowie die Prognose der Erkrankung sind mit den humanmedizinischen Angaben vergleichbar.

1.3 Pathophysiologie des VF

Von molekularbiologischen Veränderungen und dem Phänomen des „atrialen Remodelings“ (AR) beim VF berichten viele Studien aus der Human- und Veterinärmedizin. Als AR werden alle strukturellen und funktionellen Veränderungen des Atriums bei VF bezeichnet, die Einfluss auf den Erhalt und das Auftreten der Erkrankung nehmen (NATTEL et al. 2008).

MORILLO et al. (1995) wiesen im Tiermodell Hund bei massiver atrialer Stimulation (400 Schläge pro min über 6 Wochen) eine um 15 % verkürzte atriale effektive Refraktärzeit (AERP) nach. Auch WIJFFELS et al. (1995) berichten im Tiermodell der Ziege bei künstlich induziertem VF von deutlich verkürzter AERP und von einer Verminderung der Frequenzadaptation der Aktionspotentiale. Das Phänomen der verkürzten AERP und der Verminderung der Frequenzadaptation wird auch als elektrisches atriales Remodeling (EAR) bezeichnet (ALLESSIE et al. 2002). DAOUD et al. (1996) und YU et al. (1998) wiesen eine signifikant verkürzte AERP beim akuten, induzierten VF des Menschen nach. Auch die atriale Leitungsgeschwindigkeit ist verlangsamt. Das Produkt der verkürzten AERP und Leitungsgeschwindigkeit begünstigt die Erkrankung des VF (BOSCH et al. 2002). Das EAR und die damit verbundene hohe Frequenz von Membrandepolarisationen bewirken einen erhöhten Kalziumeinstrom ins Zytosol der Zelle (GOETTE et al. 2004). BOSCH et al. (1999) berichten von einem bis zu 70 % reduzierten Kalziumauswärtsstrom aus der Zelle. Es kommt zu einer Kalziumüberladung der atrialen Myozyten (GOETTE et al. 2004), woraufhin licht- und elektronenmikroskopisch ultrastrukturelle Veränderungen der Zellen sichtbar werden. Diese strukturellen Veränderungen bezeichnet man auch als strukturelles atriales Remodeling (SAR). Das SAR der atrialen Myozyten beinhaltet unter anderem eine Vergrößerung der Zelle, einen zentralen Verlust von Sarkomeren (Myolyse), das Fragmentieren des sarkoplasmatischen Reticulums und die Veränderung von strukturellen Proteinen in Quantität und Lokalisation (ALLESSIE et al. 2002). Humane Studien, sowie Studien am Tiermodell, berichteten von einer im Rahmen des SAR bei VF auftretenden interstitiellen atrialen Fibrose (BOLDT et al. 2004; BURSTEIN et al. 2009; NATTEL 2002). Ursächlich kommt eine vermehrte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems in Frage, welches eine myozytäre Hyperplasie und Hypertrophie der Fibroblasten hervorruft (GOETTE et al. 2000; MCEWAN et al. 1998). Bei einer bereits bestehenden Fibrose des Gewebes, beispielsweise durch andere kardiovaskuläre Erkrankungen, kann das VF die Kollagenakkumulation nochmals verstärken (GOETTE und LENDECKEL 2004; LI et al. 1999). Die interstitielle atriale Fibrose bedingt eine Zunahme der ungleichmäßigen Erregungsleitung von den Herzvorhöfen in die Ventrikel und eine Abnahme der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit, sodass weitere Episoden des VF auftreten können (LI et al. 1999). Bereits 1965 berichteten LOGAN et al. von einer eingeschränkten linksatrialen systolischen Funktion nach überstandener Episode des VF. Diese atriale Dysfunktion, auch

kontraktilen atriales Remodeling (KAR) genannt, steht vermutlich ebenfalls im Zusammenhang mit einer Kalziumüberladung der Zelle (ALLESSIE et al. 2002). Experimentelle und klinische Studien zeigen, dass der Kalziumkanalblocker Verapamil in der Lage ist, die eingeschränkte linksatriale systolische Funktion zu hemmen (DAOUD et al. 1999; LEISTAD et al. 1996). Die erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration führt auch zu Veränderungen der mitochondrialen Struktur (GOETTE et al. 2004).

Je nach Spezies und Tiermodell variiert das SAR in den Mitochondrien (ALLESSIE et al. 2002). Im Tiermodell des Hundes ist eine hohe atriale Frequenz assoziiert mit einer Vergrößerung der Mitochondrien (MORILLO et al. 1995), wohingegen im VF-Modell der Ziege von einem vermehrten Auftreten kleiner Mitochondrien mit longitudinal orientierten Cristae gesprochen wird (AUSMA et al. 1997). GOETTE und LENDECKEL (2006) berichten bei VF in humanem Gewebe von vermehrtem Auftreten hyperplastischer Mitochondrien mit einer Lyse der Cristae. Der vermehrte Kalziumeinstrom in die Zelle beeinträchtigt außerdem die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese und damit die endogene Atmung in den Mitochondrien (GOETTE et al. 2014). Mithilfe von molekularem Sauerstoff (O_2) werden bei physiologischen Verhältnissen Fette und Zucker in den Mitochondrien oxidiert, die der ATP-Synthase Energie zur Verfügung stellen (Abbildung 1) (Abb.1). Somit kann ATP hergestellt werden. Bei eingeschränkter ATP-Synthese und mangelnder Sauerstoffkonzentration kommt es zu einem Energiedefizit, was den funktionellen Schaden des Mitochondriums, aufgrund des vermehrten Kalziumeinstroms, nochmals verstärkt. Es kommt zu einer Hyperplasie, zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität, zu einer Verminderung des oxidativen Stoffwechsels und zu einer vermehrten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species*, ROS) in den Mitochondrien (KOEHLER et al. 2018).

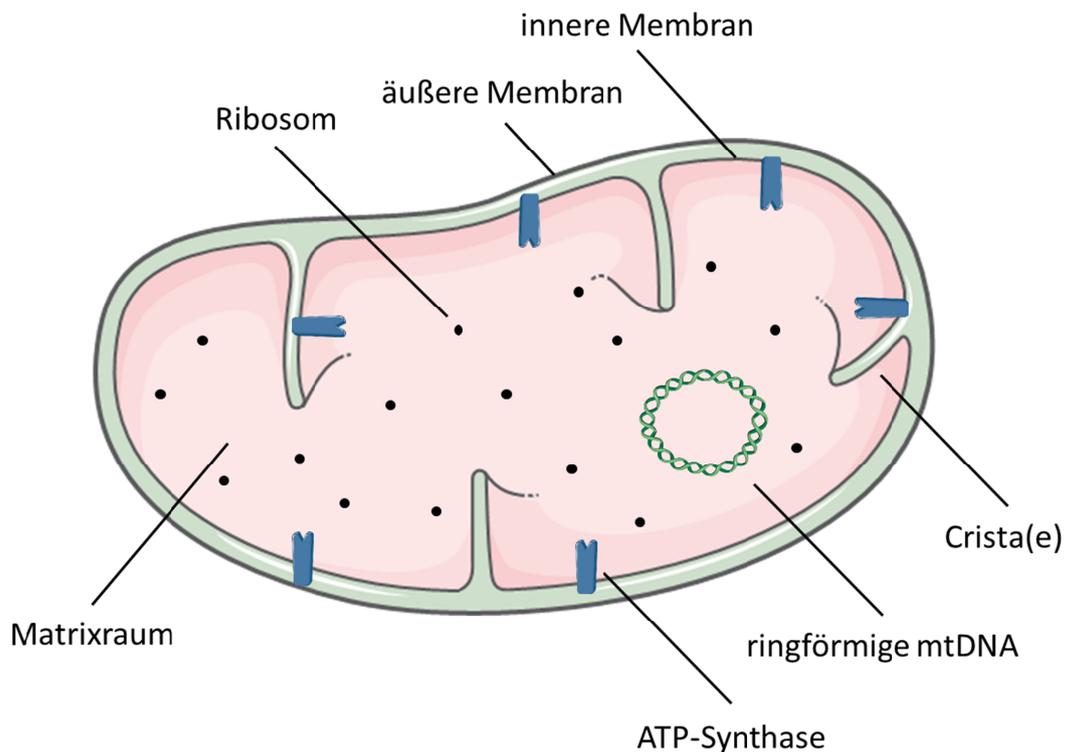


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums Im Matrixraum befinden sich Ribosomen (für die Proteinbiosynthese zuständig) und die mitochondriale DNA (mtDNA). Die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert und katalysiert folgende Reaktion: Adenosindiphosphat (ADP) + Phosphat \rightarrow ATP + H_2O . Die Cristae sind Ausstülpungen der inneren Membran und dienen u.a. der Oberflächenvergrößerung. Der Bereich zwischen innerer und äußerer Membran wird Intermembranraum genannt. Die äußere Membran ist von Poren durchsetzt und für die meisten Stoffe durchlässig (LÖFFLER et al. 2007).

Das Zusammenspiel des EAR, des SAR, des KAR und des oxidativen Stresses im Hinblick auf die Entstehung und den Erhalt des VF ist in Abb. 2 zusammenfassend dargestellt.

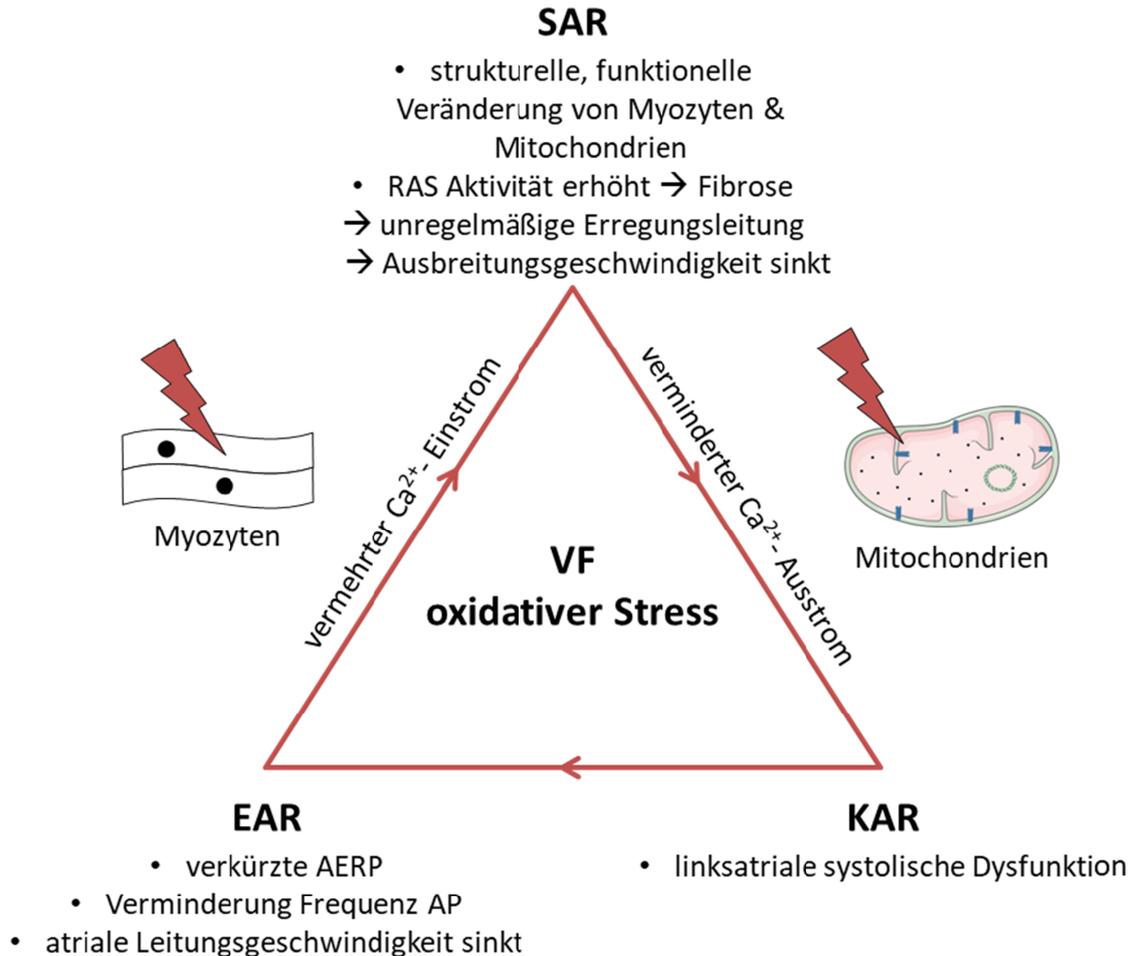


Abb. 2: Circulus vitiosus des VF AERP = atriale effektive Refraktärzeit, AP = Aktionspotential, Ca^{2+} = Kalziumionen, EAR = elektrisches atriales Remodeling, KAR = kontraktiles atriales Remodeling, RAS = Renin-Angiotensin-System, SAR = strukturelles atriales Remodeling, VF = Vorhofflimmern

1.4 Oxidativer Stress und dessen Rolle in der Pathogenese des VF

Als ROS werden kurzlebige, diffundierende, reaktive, chemische Verbindungen bezeichnet, die Sauerstoff enthalten. Auch einige Sauerstoffradikalspezies mit mittlerer Lebensdauer wie z.B. Hydroperoxid-Anionen (O_2^-), Nitroxylradikale oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) fallen unter den Begriff der ROS (SIMON et al. 2000). ROS werden sowohl während des physiologischen oxidativen Metabolismus der Mitochondrien als auch in zellulärer Reaktion auf pathogene Agenzien gebildet (RAY et al. 2012). Der Begriff des „oxidativen Stress“ impliziert dabei ein

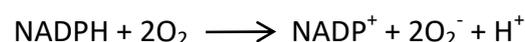
Ungleichgewicht zwischen der übermäßigen Produktion von ROS und der mangelnden antioxidativen Antwort der Zelle (HALLIWELL 2007). Im Jahr 2001 wiesen MIHM et al. erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und chronischem VF nach, wobei der oxidative Stress durch die Aktivität von Hydroxylradikalen und Peroxynitrit vermittelt zu sein schien. Die exakte Pathogenese des oxidativen Stress im Zusammenhang mit VF konnten MIHM et al. (2001) nicht herausfinden, jedoch bildet diese Studie die wissenschaftliche Basis für weitere Forschungen auf diesem Gebiet (KORANTZOPOULOS et al. 2007). Die übermäßige Produktion von ROS kann die Entstehung von Arrhythmien begünstigen. Im Wesentlichen werden in der Literatur drei molekulare Veränderungen des Gewebes beschrieben: eine ROS-induzierte, erhöhte fokale Aktivität der Kardiomyozyten, die Beeinflussung von Ionenkanälen, sowie die Veränderung der elektrischen Ansprechbarkeit von Zell-zu-Zell-Verbindungen (SOVARI 2016). BERSEWICZ und HORACKOVA (1991) konnten in Ratten- und Meerschweinchen-Myozyten eine, nach ROS-Induktion, verlängerte Aktionspotentialdauer nachweisen. Dies geht einher mit frühen und verzögerten Nachdepolarisationen der Zellen. Desweiteren können ROS die Entstehung von kreisenden Erregungsfronten (*Reentry*) begünstigen (ONO et al. 2006). Hierbei sind einige Kardiomyozyten bei verlängerter Aktionspotentialdauer nicht erregbar, andere sind bei verkürzter Aktionspotentialdauer erregbar (ONO et al. 2006). Sowohl die verlängerte Aktionspotentialdauer, als auch das Phänomen des *Reentry* beeinflussen die Aktivität von Natriumkanälen und stellen Mechanismen für ROS-induzierte Arrhythmien dar (QU et al. 2011). Während ein Anstieg des späten Natriumeinstroms, ausgelöst durch eine frühe Nachdepolarisation der Kardiomyozyten, zu Arrhythmien führen kann, führt die durch ROS verursachte Verringerung des gesamten Natriumstroms zu einer Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit und damit zu kreisenden Erregungsfronten (SOVARI 2016). ROS sind in der Lage, die Aktivität des L-Typ Kalziumkanals zu stimulieren, was die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen der Kardiomyozyten erleichtern kann (THOMAS et al. 1998). Darüber hinaus stimulieren Hydroxylradikale die Öffnung des kardialen Ryanodinrezeptors, welcher den Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischem Reticulum in das Zytoplasma reguliert (ANZAI et al. 1998). Eine abnorme Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischem Reticulum während der Diastole kann in verzögerten Nachdepolarisationen der Kardiomyozyten resultieren (AI et al. 2005). Neben der Beeinflussung von Natrium- und Kalziumkanälen können ROS ATP-abhängige Kaliumkanäle inhibieren (YANG et al. 2010). Dies

kann zu verkürzten Repolarisationsphasen und zu einer verlängerten Aktionspotentialdauer führen (SOVARI 2016). Oxidativer Stress fördert auf zellulärer Ebene nicht nur die Aktivität der Kardiomyozyten und Ionenkanäle, sondern auch eine myokardiale Fibrose (CUI et al. 2009). Fibrosiertes, myokardiales Gewebe bildet eine Barriere für die Aktionspotentialausbreitung (DE BAKKER et al. 1988) und agiert, aufgrund der erhöhten ektopischen Aktivität der Myofibroblasten, potentiell arrhythmogen (MIRAGOLI et al. 2007). Die elektrische Reizleitung der Kardiomyozyten ist bei erhöhtem oxidativen Stress aufgrund einer unzureichenden Funktion der *gap junctions* beeinträchtigt (JEONG et al. 2012). Zusammenfassend ist das Phänomen des oxidativen Stress als Konsequenz, aber auch als Auslöser der Erkrankung des VF zu sehen (GASPAROVA et al. 2017). Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die Erkrankung des VF und die Rolle des oxidativen Stress nicht vollständig verstanden und die Behandlung ist nach wie vor herausfordernd (XIE et al. 2015). Der Einfluss des VF auf die Produktion von ROS und die mitochondriale Integrität, sowie die dabei ablaufenden zellulären Vorgänge sind in der Literatur nur unzureichend beschrieben (BUKOWSKA et al. 2008; DONG et al. 2017).

1.5 Biomarker des oxidativen Stress

Die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen (NOX), die Xanthin-Oxidase (XO), die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase sind Enzyme, die mit der Entstehung von ROS im Zusammenhang stehen. Während die NOX und die XO als ROS-Produzenten agieren (CAI und HARRISON 2000), werden der SOD und der Katalase antioxidative Eigenschaften zugesprochen (GOSSLAU und RENSING 2002).

Die NOX sind eine Gruppe von Enzymkomplexen, die die Elektronenübertragung von NADPH auf O_2 katalysieren, wobei O_2^- entstehen (DIKALOV 2011). Im Folgenden ist die Reaktionsgleichung der NOX schematisch dargestellt:

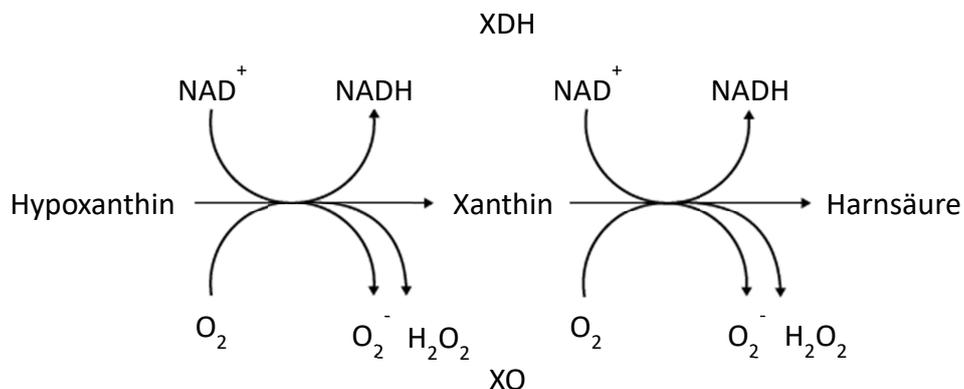


Man unterscheidet zwei Typen von NOX: Die phagozytäre und die nicht-phagozytäre NOX. Des Weiteren werden sieben Isoformen unterschieden, die in verschiedenen Geweben des Körpers vorkommen: Die NOX 1 bis 5 und die duale Oxidase 1 und 2 (DUOX 1 und 2)

(BEDARD und KRAUSE 2007). Die Isoformen NOX 1, NOX 2, NOX 4 und NOX 5 kommen in kardiovaskulärem Gewebe vor und sind beispielsweise in Kardiomyozyten oder kardialen Fibroblasten nachgewiesen worden. Die NOX 2 und die NOX 4 sind die dominierenden Isoformen in den Kardiomyozyten (ZHANG et al. 2013). In vorangegangenen Studien konnte sowohl in humanen, als auch in tierischen VF-geschädigten Herzhohren eine NOX-abhängige ROS-Produktion festgestellt werden (DUDLEY et al. 2005, KIM et al. 2005). Die NOX wird von BUKOWSKA et al. (2012) sogar als Hauptquelle von ROS in VF-geschädigtem Gewebe betitelt. Eine Inhibition der NOX im Mausmodell konnte die Entwicklung von VF verhindern (YANG et al. 2020). Deshalb eignet sich die NOX als hervorragender Biomarker für die ROS-Produktion und damit für oxidativen Stress in VF-geschädigtem Gewebe.

Die im Zytosol der Zelle lokalisierte Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) katalysiert den Abbau von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure während des Purinstoffwechsels (CAI und HARRISON 2000; NISHINO et al. 1997). Es existieren zwei ineinander umwandelbare Formen der XOR: Die Xanthin-Dehydrogenase (XDH) und die XO. Die XDH ist in der Lage Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu reduzieren, während die XO mithilfe von O_2 O_2^- und H_2O_2 produziert (CAI und HARRISON 2000).

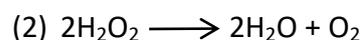
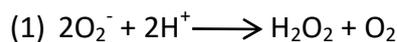
Die Reaktionsgleichung der XOR ist im Folgenden schematisch dargestellt:



Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, gehören O_2^- und H_2O_2 zu den ROS und bei übermäßiger Produktion zu den Markern für oxidativen Stress. SAKABE et al. (2012) berichten bei künstlich induziertem VF im Tiermodell Hund von einer Verringerung des oxidativen Stress durch Inhibierung der XO mithilfe von Allopurinol.

Die SOD und die Katalase werden dem antioxidativen System der Zelle zugeordnet und dienen dem zellulären Schutz gegen oxidativen Stress. Die SOD katalysiert den Zerfall von

O_2^- zu H_2O_2 und O_2 . Abhängig von der Metallionenkonfiguration werden drei Isoformen der SOD unterschieden. Die Mangan (Mn)-SOD ist vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert. Die Kupfer/Zink (Cu/Zn)-SOD kommt hauptsächlich im Zytosol der Zelle, aber auch im Nukleus vor. Die Eisen (Fe)-SOD kann auch extrazellulär vorkommen. Die Katalase ist sowohl im Zytosol der Zelle, als auch in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert die Zersetzung von H_2O_2 zu Wasser (H_2O) und O_2 . Die katalysierten Reaktionen der SOD (1) und der Katalase (2) sind im Folgenden schematisch dargestellt (YU 1994).



Eine übermäßige Produktion von O_2^- und H_2O_2 in der Zelle führt zu einer vermehrten Aktivität der SOD und der Katalase. Deshalb sind beide Enzyme geeignet, indirekte Rückschlüsse auf den Grad des oxidativen Stresses zu ziehen.

1.6 Apoptose und Hypoxie im Rahmen des VF

Der direkte Zusammenhang des vermehrten Kalziumeinstroms in die Zelle mit der ROS-Produktion, oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion im Krankheitsbild des VF (XIE et al. 2015) hat Einfluss auf die intrazellulär vorkommende Protease Calpain. Eine Kalziumüberladung der Mitochondrien führt zu einer Aktivierung der mitochondrialen Calpaine, die die Apoptose der Zelle über die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen initiieren können. Die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen, wie z.B. der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) oder das Cytochrom C, erfolgt aus dem mitochondrialen Intermembranraum. (NORBERG et al. 2008). AIF wird im Zuge der Caspase-unabhängigen Apoptose in den Zellkern transloziert, induziert dort eine Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (KAR et al. 2010; LORENZO et al. 1999; SUSIN et al. 1999). Cytochrom C, ein Protein der mitochondrialen Atmungskette (GREEN und REED 1998), bildet im Zuge der Caspase-abhängigen Apoptose zusammen mit dem Apoptose Protease aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1), Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und der Procaspase-9 das Apoptosom im Zytosol der Zelle (KAR et al. 2010). Das Apoptosom initiiert die Autokatalyse der Procaspase-9 zur Caspase-9 und aktiviert weitere Effektor-Caspasen

(z.B. Caspase-3). Dies veranlasst die Apoptose der Zelle (LÖFFLER et al. 2007). Ein Zusammenhang zwischen VF und Hypoxie in atrialem Gewebe wurde postuliert (ARRIGO et al. 2015; GRAMLEY et al. 2010; LIN et al. 2012). Ein O₂-Mangel führt zu AR im Gewebe, was die Entstehung des VF begünstigt. Ein Teil der zellulären Antwort auf Sauerstoffmangel ist der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) (GREIJER und VAN DER WALL 2004). HIF-1, ein Heterodimer, besteht aus einer α - und einer β - Untereinheit. Die Stabilität der α -Untereinheit ist O₂-abhängig, wohingegen die Transkription und Synthese konstant erfolgen (KE und COSTA 2006). Bei Normoxie im Gewebe wird HIF-1 α schnell abgebaut, sodass sich kaum HIF-1 α -Proteine nachweisen lassen (WANG et al. 1995). Unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert sich HIF-1 α und wird vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wo eine Dimerisierung mit HIF-1 β erfolgt (KALLIO et al. 1997). Über das hypoxiesensitive Element ist der aktivierte HIF-Komplex an der Expression von Genen beteiligt, die den durch die Hypoxie induzierten Schaden in der Zelle reduzieren. (KE und COSTA 2006).

1.7 ROS- und DNA-Schäden

ROS können über die Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren die DNA schädigen und so z.B. Basenmodifikationen oder Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche hervorrufen (EPE et al. 1988). Über 100 solcher oxidativer Modifikationen der DNA sind bekannt (HOEIJMAKERS 2001). Unter erhöhtem oxidativen Stress ist insbesondere die mitochondriale DNA (mtDNA) anfällig für Schäden und Mutationen (LIN et al. 2003). Im Unterschied zur nukleären DNA (nucDNA) besitzt die mtDNA keine Introns und wird ohne Korrektur- (engl.: *proofreading*) und Reparaturmechanismen in höherer Rate repliziert (LEE et al. 1994). Die Genomzusammensetzung und die Größe der mtDNA variiert je nach Spezies. Die humane mtDNA ist eine 16.569 Basenpaare (bp) lange, doppelsträngige, zirkuläre DNA, deren Genexpression essenziell für die endogene mitochondriale Atmung ist (ANDERSON et al. 1981). Die Mutationen der mtDNA variieren in ihrer Größe und Lokalisation (CORTOPASSI und ARNHEIM 1990; LEE et al. 1994; WEI 1992) und akkumulieren im Mitochondrium (LIN et al. 2003). Die häufigste Mutation ist die Deletion eines 4977 bp großen Fragments. Das 4977 bp- Fragment liegt zwischen der Nukleotidposition 8470/8482 und 13447/13459 der mtDNA (LEE et al. 1994; LIN et al. 2003). CORRAL-DEBRINSKI et al. (1991) konnten in humaner ischämisch geschädigter Herzmuskulatur ein vermehrtes Auftreten der 4977 bp-Deletion

nachweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 4977 bp-Deletion, ähnlich wie die meisten mitochondrialen Deletionen mit zunehmendem Alter ansteigen (CORRAL-DEBRINSKI et al. 1992; KRAYTSBERG et al. 2006; LEE et al. 1994; MOHAMED et al. 2006) und vermehrt in atrialem Gewebe von Patienten mit VF nachgewiesen werden (LIN et al. 2003; und LAI et al. 2003). Ob die 4977 bp-Deletion das Ergebnis oder die Ursache des VF darstellt, bleibt ungeklärt (TSUBOI et al. 2001).

1.8 Einfluss des Thioredoxin-Systems bei oxidativem Stress

Ein weiteres antioxidatives System ist das Thioredoxin (TRX)-System. Es besteht aus den beiden Oxidoreduktasen TRX- und Thioredoxin-Reduktase (TRXR), die antioxidative und redoxregulatorische Funktionen in der Zelle übernehmen (NORDBERG und ARNÉR 2001). Unter Verwendung von NADPH katalysiert TRXR die Reduktion des aktiven Zentrums von TRX, das dann in der Lage ist, Disulfidbrücken in Peroxiredoxine zu spalten und somit H_2O_2 zu reduzieren (NORDBERG und ARNÉR 2001). Des Weiteren kann TRX ROS über freie Thiole an den Cysteinresten 32 und 35 reduzieren (ZHANG et al. 2010) und somit oxidativen Stress lindern. Ein endogener Inhibitor des TRX und Teil des TRX-Systems ist das Thioredoxin-interagierende Protein (TXNIP) (HWANG et al. 2014). TXNIP hemmt die antioxidative Funktion von TRX durch Bindung an seine redoxaktiven Cysteinreste (ZHANG et al. 2010). ZHANG et al. (2010) konnten die Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase (ITCH) als die E3-Ligase identifizieren, die polyubiquitinyliert und somit den proteasomalen Abbau reguliert (ZHANG et al. 2010). Im Tiermodell der Ratte konnte das Potential von TRX1, Reperfusion-induzierte Arrhythmien zu hemmen, nachgewiesen werden (AOTA et al. 1996). Dies lässt Rückschlüsse auf die Fähigkeit des TRX-Systems, ROS induzierte Arrhythmien zu hemmen, zu. Die Aktivität des TRX-Systems in der Zelle lässt Rückschlüsse auf das Maß des oxidativen Stresses zu und wurde deshalb in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Ein vermehrt aktives TRX-System könnte ein Hinweis auf eine übermäßige Produktion von ROS und damit auf oxidativen Stress im Gewebe sein.

2 Zielsetzung

Die Pathogenese des VF ist trotz zahlreicher Studien noch weitestgehend unklar. Einige Studien am Tiermodell konnten veränderte zelluläre Mechanismen bei der Erkrankung des VFs wie beispielsweise eine übermäßige ROS-Produktion oder mitochondriale Dysfunktion feststellen. Der Einfluss des VF auf die Produktion von ROS und die mitochondriale Integrität, sowie die dabei ablaufenden zellulären Vorgänge sind in der Literatur nur hinreichend beschrieben. Studien an menschlichem Gewebe sind selten. Vergleichende Aspekte zwischen Tier und Mensch sind in der Literatur nicht beschrieben. Deshalb wurden in dieser Arbeit die durch VF induzierten Effekte auf die ROS-Produktion und die mitochondriale Integrität in humanem Vorhofgewebe untersucht. Dazu wurden Proben des linken Herzhohls von Patienten mit VF und Patienten mit Sinusrhythmus (SR) miteinander verglichen. Die Produktion von ROS wurde indirekt über die Quantifizierung von Enzymaktivitäten der NOX, der XO, der SOD und der Katalase ermittelt. Darüber hinaus wurden Marker für Hypoxie und Apoptose quantifiziert und der Grad der Schädigung mtDNA ermittelt. Außerdem wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um die antioxidative Antwort der Zelle im Hinblick auf das TRX-System zu untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die ROS-Produktion sowie ROS-induzierte und –assoziierte zelluläre Mechanismen bei Patienten mit VF zu analysieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das TRX-System, das als ROS-Scavenger fungiert, ein neuer Ansatzpunkt für medikamentöse Therapie sein könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

In Tab. 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte alphabetisch aufgelistet.

Tab. 3: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Blotting-Kammer, Semi-Dry Blotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
BluePower 500 Plus und BluePower Plus	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Detektionsplattform „Fusion Solo S“	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Eismaschine	Intercontinentale Ziegma Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Folienschweißgerät AS 3604 inklusive dazugehöriger Folie	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur (Vertikal- und Horizontalgelsystem)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gerix 1000	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
ICycler und IQ 5 Multicolor RTPCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inkubator „Function Line“	Thermo Scientific Heraeus®, Rockford, IL, USA
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Laborfeinwaage „CP 225 D“	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Laborwaage FA-3100-2	Faust Laborbedarf AG, Schaffhausen, Schweiz
LightCycler 480 Instrument II inklusive dazugehörige Software	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Magnetrührer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Geräte	Hersteller
Microplate Reader Infinite® 200 PRO mit dazugehöriger Software i-control™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplattenschüttler	Barnstead International, Iowa, USA
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Mörser mit Pistill	Haldenwanger, Waldkraiburg, Deutschland
NanoQuant plate™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
pH-Messgerät „pH Level 1“	inoLab WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 100 µl; 200 µl; 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®, elektrisch	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler „DUOMAX 1030“, wippend	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Timer „Rotilabo®-Signal-Timer“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge „5417 R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV Transilluminator	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Vortexmischer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries, Bohemia, New York
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge „Biofuge stratos“	Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland

3.2 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

In Tab. 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Hilfsmittel sowie Verbrauchsmaterialien alphabetisch aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platte „Zellkulturtestplatte 96F“	Techno Plastic Products AG (TPP), Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platte pureGrade™ von BRANDplates®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
96-Well-Platte semi-skirted LC480 PCR Plates for Roche 480 cycler	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
Alu-Folie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest. Spritzflasche	Kautex Textron GmbH & Co. KG, Bonn-Holzlar, Deutschland
Autoklavierband	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Carbogen Gasflasche	Linde AG, Pullach, Deutschland
Reaktionsröhrchen 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon® Round Bottom Polystyrene Tubes 5 ml	Corning Life Science, Tewksbury, USA
Gel-Blotting Papier „Whatman-Paper GB 005“	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Glasplatten PAGE, gerade/ausgeschnitten	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Handschuhe, Peha soft nitrile, white	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Kamm, 20 Taschen	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Kryo-Röhrchen 20 (für 2,0 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Laborglasflaschen 100 ml; 250 ml; 500 ml; 1000 ml; 2000 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Pinzette	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
qPCR Adhesive Clear Seals	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten 5 ml; 10 ml; 25 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spacer	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Spatel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtlid.
sterile Pipettenspitzen „MultiGuard Barrier Tips“ 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Verpackungsfolie Sarogold® Pro	Saropack AG, Rorschach, Schweiz
Wägebapier	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Waschschalen	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
Wiegeschalen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zellkulturschalen 100 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Reaktionsröhrchen 15 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Reaktionsröhrchen 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Reagenzien von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland). Chemikalien und Reagenzien sonstiger Firmen sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Blue Loading Buffer 6 x	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde AG; Pullach, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x	Biotium Inc., Fremont, Kalifornien
Proteinmarker IV Prestained	VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
100 bp DNA-Ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

3.4 Herzohrproben

Für die Laboranalysen wurden ca. 1 cm x 0,5 cm große Gewebeproben von linken Herzohren von zwei verschiedenen Patientengruppen verwendet: Patientengruppe 1 schloss 15 Patienten mit paroxysmale, persistierendem oder permanentem VF ein, die eine herzchirurgische Intervention durchliefen. Patientengruppe 2 schloss 15 Patienten ohne VF ein, bei denen Vorhofohrgewebe im Rahmen einer herzchirurgischen Intervention entnommen wurde. Die Probenentnahme wurde von Kooperationspartnern der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Campus Grosshadern, Leitung: Prof. Dr. med. C.M. Hagl) durchgeführt und dem Forschungslabor der Klinik für Herzchirurgie am Herzzentrum Leipzig zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München genehmigt und nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Patienten wurden vor Beginn der Studie über den Nutzen und die Verwendung der Daten aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Herzohrproben wurden bei -80 °C gelagert.

3.4.1 Proteinextraktion Herzohrproben

Für die Quantifizierung des Proteingehalts wurde eine Proteinextraktion durchgeführt. Hierfür wurden die bei -80 °C gelagerten Herzohrproben in einen Behälter mit flüssigem

Stickstoff (N₂) überführt, um das Auftauen des Gewebes zu vermeiden. Mithilfe einer Laborwaage, Petrischale, Pinzette und Skalpell wurden Probenmengen von 20-30 mg abgewogen und in einen doppelt mit Alufolie ausgekleideten Mörser gegeben. Durch erneute Zugabe von flüssigem N₂ und intensivem Mörsern entstand ein feines Pulver, das mithilfe eines Spatels in ein, auf Eis gekühltes, 5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Genanntes Gefäß enthielt 500 µl Relaxing-Lysepuffer, dessen Zusammensetzung in Tab. 6 aufgelistet ist.

Tab. 6: Zusammensetzung des Relaxingpuffers

Puffer	Zusammensetzung
Lagerfähiger Relaxing-Lysepuffer (zuerst EGTA in Aqua dest. lösen und pH 8,0 einstellen)	HEPES 90 mM
	KCl 126 mM
	NaCl 36 mM
	MgCl ₂ 1 mM
	EGTA 50 mM
	ATP 8 mM
	Kreatinphosphat 10 mM
	Ad 1 Liter Aqua dest.
Gebrauchsfertiger Relaxing-Lysepuffer	Relaxingpuffer Stocklösung 495 µl
	Protease/Phosphatase-Inhibitor 5 µl
	Σ = 500 µl

ATP = Adenosintriposphat, Aqua dest. = Aqua destillata, EGTA = Ethylenglycol-bisaminoethylethertetraessigsäure, HEPES = Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure, KCl = Kaliumchlorid, MgCl = Magnesiumchlorid, NaCl = Natriumchlorid, Σ = Summe

Anschließend wurden die Proben mithilfe eines Ultraschallhomogenisators bei geringer Intensität über 10 Zyklen behandelt. Nachdem das Zellgemisch in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen pipettiert wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g

und 4°C in einer Tischzentrifuge. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert, ohne das darunter befindliche Zellpellet zu schädigen und in acht 0,5 ml-Reaktionsröhrchen à 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung der Herzohrgewebelysate

Um die Proteinkonzentration der Herzohrgewebelysate zu ermitteln, wurde das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA) und Mikrotiterplatten von TPP® (Trasadingen, Schweiz) verwendet. Das BCA Protein Assay Kit ermöglicht eine Proteinkonzentrationsbestimmung auf der Basis einer Bicinchoninsäure (englisch: *bicinchoninic acid*, BCA)-Farbreaktion. BCA ist ein wasserlösliches Natriumsalz, welches in alkalischer Umgebung einen violetten Farbkomplex mit Kupfer-Ionen (Cu^{1+}) bildet. Proteine reagieren mit alkalischen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen (Biuret Reaktion). Der hierbei gebildete Farbkomplex steigt proportional zur Proteinkonzentration an und kann photometrisch gemessen werden (SMITH et al. 1985). In einem 0,5 ml-Reaktionsröhrchen wurden 29,7 µl Relaxing-Lysepuffer und 3,3 µl des Überstandes aus der Proteinextraktion (1:10 Verdünnung) vermischt. Es wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung ist in Tab. 7 aufgeführt. In Dreifachbestimmung wurden je 9 µl der verdünnten Probe auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Standards und die Negativkontrollen (Relaxing-Lysepuffer) wurden in Zweifachbestimmung aufgetragen. Laut Herstellerangaben wurden zusätzlich 4 µl des im Kit enthaltenen Konstitutionspuffers pro Well dazugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde für 1 min auf eine Schüttelplatte gestellt und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Menge des mitgelieferten BCA-Reagenz berechnet und gemäß den Herstellerangaben verwendet. Mithilfe einer Multipipette wurde das BCA-Reagenz zügig in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte erneut für 1 min auf die Schüttelplatte gestellt, für 30 min bei 37°C und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte mithilfe des Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 666 nm mit der dazugehörigen Software i-control™. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in mg/ml wurde eine Eichgerade mithilfe von Microsoft® Excel 2010 aus den Messwerten der

Standardverdünnungsreihe erstellt. Unter Verwendung der Eichgerade war die Ermittlung der Proteinkonzentrationen in den Proben möglich. Die auf diese Weise errechneten Werte konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Tab. 7: Zusammensetzung der Standardverdünnungsreihe mit BSA und Relaxing-Lysepuffer für die Proteinkonzentrationsbestimmung

Standard	BSA Konzentration (µg/µl)	Zu pipettierende Volumina	Relaxing-Lysepuffer (µl)
A	2	300 µl aus BSA-Ampulle	0
B	1,5	375 µl aus BSA- Ampulle	125
C	1	325 µl aus BSA- Ampulle	325
D	0,75	175 µl aus B	175
E	0,5	325 µl aus C	325
F	0,25	325 µl aus E	325
G	0,125	325 µl aus F	325
H	0,025	100 µl aus G	400

BSA = bovines Serum Albumin

3.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Produktion von ROS wurde indirekt über die Quantifizierung von Enzymaktivitäten der NOX, der XO, der SOD und der Katalase ermittelt. Die Proteinkonzentrationen der Herzohrgewebelysate wurden mithilfe von Verdünnungen in Relaxing-Lysepuffer auf 0,2-0,3 mg/ml standardisiert, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

3.5.1 NOX-Aktivität

Die NOX katalysiert mithilfe von NADPH und O₂ die Produktion von O₂⁻ (ERICKSON et al. 1999). O₂⁻ sind in der Lage, Cytochrom C zu reduzieren, was photometrisch erfasst werden kann (KOPPENOL et al. 1976). Um die Aktivität der NOX zu bestimmen, wurde zunächst die

Krebs-Henseleit-Stammlösung hergestellt (118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,6 mM CaCl₂; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄). Für jede Messung wurde eine Arbeitslösung bestehend aus 2 ml Krebs-Henseleit-Stammlösung und 38 ml Aqua dest. in ein 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt. Danach wurden 0,04 g D-Glucose (25 mM) und 0,04 g NaHCO₃ (1,2 mM) eingewogen und in das 50 ml-Reaktionsröhrchen zugegeben. Die Arbeitslösung wurde für 5 min mit Carbogen begast. Die bei -80 °C gelagerten Herzohrgewebelysate in Relaxing-Lysepuffer wurden auf Eis aufgetaut. Für die Messung wurden die Proben 1:10 in Proteasom-Lysepuffer verdünnt. Die Zusammensetzung der Proteasompuffer-Stocklösung und des Proteasom-Lysepuffers sind in Tab. 8 beschrieben.

Tab. 8: Zusammensetzung Proteasompuffer

Puffer	Zusammensetzung	
Proteasompuffer Stocklösung	Tris pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	ATP	2 mM
	Glycerin	20 %
	DTT	4 mM
		ad 1 Liter Aqua dest.
Proteasom-Lysepuffer	Proteasompuffer Stocklösung	495 µl
	Protease/Phosphatase- Inhibitor	5 µl
		Σ = 500 µl

ATP = Adenosintriphosphat, Aqua dest. = Aqua destillata, DTT = Dithiothreitol, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Σ = Summe

Anschließend wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 1 ml Krebs-Henseleit-Arbeitslösung, 20 µl Cytochrom C (4 mM) und 10 µl NADPH (10 mM, pH 7,1) in ein 1 ml-Reaktionsröhrchen überführt. Von jeder verdünnten Probe wurden 7,75 µl zu 302,25 µl Reaktionsmix (Krebs-Henseleit-Arbeitslösung, Cytochrom C, NADPH) in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen gegeben. Als

Negativkontrolle wurden 7,75 µl Aqua dest. und 302,25 µl Reaktionsmix (Krebs-Henseleit-Arbeitslösung, Cytochrom C, NADPH) vermischt. Aus den 1,5 ml-Reaktionsröhrchen der Probe und der Negativkontrolle wurden anschließend je 150 µl in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Über die Reduktion des Cytochrom C konnte die Absorption bei 550 nm und die Enzymkinetik der NOX für 10 min bei 550 nm mit einem Messintervall von 30 s mithilfe des Infinite® 200 PRO ermittelt werden. Aus allen Messpunkten der Negativkontrolle wurde der Mittelwert (MW) gebildet. Anschließend wurde der MW der Negativkontrolle von den Messpunkten der Probe zum Startzeitpunkt (T0) und nach 10 min (T10) subtrahiert. Mit der Formel 1 konnte die Aktivität der NOX in Units (U)/mg Protein berechnet werden.

$$\left\{ \frac{\left[\frac{(T10 - T0)}{19} \right] * 400}{\text{Proteinkonzentration in mg/ml}} \right\} \div 1000 = \text{Aktivität in U/mg}$$

Formel 1: Berechnung der NOX Aktivität in U/mg

3.5.2 XO-Aktivität

Die XO wurde mithilfe des Xanthin Oxidase Activity Colorimetric Assay Kit von BioVision (Milipitas, CA, USA) quantifiziert. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers. Die standardisierten Proben wurden 1:10 in Relaxing-Lysepuffer verdünnt. Die 30 minütige Enzymkinetikmessung der XO erfolgte mithilfe des Infinite® 200 PRO und der dazugehörigen Software i-control™ bei einer Wellenlänge von 570 nm und einem Messintervall von 5 min. Mithilfe der Formel 2 konnte die XO-Aktivität berechnet werden.

$$\left(\frac{B}{(T2 - T1) * V} \right) * \text{Verdünnung der Probe} = \text{Aktivität in nmol/min/ml}$$

$$= \text{Aktivität in mU/ml}$$

Formel 2: Berechnung der XO-Aktivität in mU/ml $B =$ von XO generierte Menge H_2O_2 in nmol, $T_1 =$ Zeitpunkt der ersten Absorptionsmessung in min, $T_2 =$ Zeitpunkt der letzten Absorptionsmessung in min, $V =$ Reaktionsvolumen in der Kavität

3.5.3 SOD-Aktivität

Pyrogallol, ein Benzolderivat, oxidiert in wässriger Lösung. Dabei wird ein gelb-brauner Farbstoff gebildet, der photometrisch messbar ist. Die SOD kann die Autooxidation von Pyrogallol inhibieren, wodurch eine Quantifizierung der Enzymaktivität möglich wird (MARKLUND und MARKLUND 1974). Zur Bestimmung der SOD-Aktivität wurden die bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Herzohrgewebelysate auf Eis aufgetaut. Für die Messung wurden die standardisierten Proben 1:10 in Relaxing-Lysepuffer verdünnt. Die Reaktionslösung bestand aus 1 ml einer 50 mM Tris-Lösung (Lösung 1), 8,5 μl einer 10 mM HCl/Pyrogallollösung (Lösung 2) und 3,5 μl einer 50 mM Tris/Katalase-Lösung (Lösung 3). In Tab. 9 sind die verwendeten Lösungen aufgelistet.

Tab. 9: Reaktionslösungen für die SOD-Aktivitätsbestimmung

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
100 ml einer 50 mM Tris-Lösung (pH 8,3)	10 ml einer 10 mM HCL-Lösung plus 30 mg Pyrogallol	630 μl einer 50 mM Tris-Lösung (pH 9,0) plus 370 μl Katalase

HCl = Salzsäure, SOD = Superoxiddismutase, Tris = Trishydroxymethylaminomethan

Lösung 2 und Lösung 3 wurden für jede Messung neu hergestellt. Von jeder 1:10 verdünnten Probe wurden 7,75 μl zu 302,25 μl Reaktionslösung (Lösung 1-3) in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen gegeben (1:400 Verdünnung). Als Negativkontrolle wurden 7,75 μl Aqua dest. mit 302,25 μl Reaktionslösung (Lösung 1-3) in einem 1,5 ml-Reaktionsröhrchen vermischt. Aus den 1,5 ml-Reaktionsröhrchen der Probe und der Negativkontrolle wurden anschließend je 150 μl in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die 10 minütige Enzymkinetikkessung der SOD erfolgte mithilfe des Infinite[®] 200 PRO und der

dazugehörigen Software i-control™ bei einer Wellenlänge von 420 nm und einem Messintervall von 30 s. Mithilfe der Formel 3 konnte die SOD-Aktivität in U/ml berechnet werden. Ein U ist definiert als die Enzymmenge, die zu einer 50 %igen Inhibierung der Autooxidation von Pyrogallol führt (MARKLUND und MARKLUND 1974).

$$\Delta A = A(\text{Ende}) - A(\text{Anfang})$$

$$\text{Inhibition der Pyrogallol Autooxidation (in \%)} = \left(\frac{\Delta A (\text{Probe})}{\Delta A (\text{Negativkontrolle})} \right) * 100 \%$$

$$\text{SOD Aktivität (U/mg)} = \left(\frac{\% \text{ Inhibition der Pyrogallol Autooxidation}}{50 \%} \right) \div \text{Proteinkonz. in mg/ml}$$

Formel 3: Berechnung der SOD Aktivität in U/mg $A = \text{gemessene Absorption}$, $A(\text{Anfang}) = \text{erste gemessene Absorption}$, $A(\text{Ende}) = \text{letzte gemessene Absorption}$, $\text{Proteinkonz.} = \text{Proteinkonzentration}$

3.5.4 Katalase-Aktivität

Die Katalase katalysiert die Reaktion von H_2O_2 zu O_2 und H_2O . Der Verbrauch von H_2O_2 kann photometrisch detektiert werden (JOHANSSON und BORG 1988). Für die Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde eine bei 4 °C gekühlte 35 %ige H_2O_2 /PBS-Lösung (pH 7,1) in einem 50 ml-Reaktionsröhrchen hergestellt. Die bei -80 °C gelagerten Herzohrgewebelysate wurden auf Eis aufgetaut. Von jeder Probe wurden 8,8 µl zu 301,2 µl H_2O_2 /PBS-Lösung in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen gegeben. Aus dem Reaktionsröhrchen der jeweiligen Probe wurden je 150 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (pureGrade™ von BRANDplates®) pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 150 µl 35 %ige H_2O_2 /PBS-Lösung auf die Mikrotiterplatte pipettiert und mitgemessen. Die 10 minütige Enzymkinetikkmessung der Katalase erfolgte mithilfe des Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 240 nm und einem Messintervall von 30 s. Zunächst wurden die Differenz der Proben und Negativkontrollen zu Beginn (T_0) ermittelt. Gleiches Verfahren wurde für die Messwerte nach 10 min durchgeführt. Mit Formel 4 kann anschließend die Aktivität der Katalase in U/mg berechnet werden.

$$\frac{\left[\frac{\text{MW aus } (T10 - T0)}{\varepsilon_{0,04}} \right] * 35,227}{\text{Proteinkonzentration in mg/ml}} = \text{Aktivität in U/mg}$$

Formel 4: Berechnung der Katalase-Aktivität in U/mg ε = molarer Extinktionskoeffizient von H_2O_2

3.6 ELISA

Mithilfe des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) lassen sich Proteine quantifizieren. Durch Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper entstehen Farbreaktionen, die photometrisch erfasst werden können (ENGVALL und PERLMANN 1971). Um eine mögliche Apoptose und/oder Hypoxie in den vorliegenden Herzohrgewebebeobachten festzustellen wurde die Menge des AIF, des Cytochrom C und des HIF-1 α mithilfe sogenannter Sandwich-ELISA quantifiziert. Hierfür wurden 30 der bei -80 °C gelagerten Herzohrgewebebeobachten verwendet.

3.6.1 AIF

Der AIF, ein Flavoprotein, liegt in einer gesunden Zelle an die Mitochondrien gebunden vor. Bei Zellschädigung und/oder bei Apoptose wird AIF in den Zellkern transloziert und induziert eine Kondensation des Chromatins (SUSIN et al. 1999). Um AIF zu quantifizieren, wurde das Human AIF ELISA Kit der Firma Abcam (Milton, UK) verwendet. Die Herzohrgewebebeobachten wurden auf Eis aufgetaut und 1:40 im 1 x *Cell Extraction Buffer PTR* verdünnt. Die Zubereitung der mitgelieferten Reagenzien und der AIF-Standardreihe entsprach den Angaben des Herstellers. Je 50 μ l der Probe bzw. 50 μ l des AIF-Standards wurden in die vorgesehenen Kavitäten der 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. In jede Kavität wurden 50 μ l des *Antibody Cocktails* pipettiert. Die abgedeckete Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei RT auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400 Umdrehungen pro min (U/min) inkubiert. Mithilfe von je 200 μ l des *Wash Buffer PT* konnte die 96-Well Mikrotiterplatte dreimal gewaschen werden. In jede Kavität wurden 100 μ l *TMB Substrate* pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 10 min bei RT im Dunklen auf einem Schüttler bei 400 U/min inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l der *Stop Solution* hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde

erneut für 1 min bei RT auf einem Schüttler bei 400 U/min inkubiert. Die 10 minütige Kinetikmessung der OD erfolgte mithilfe des Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Messintervall von 30 s. Mithilfe der Formel 5 konnte die Konzentration des AIF in ng/ml errechnet werden.

$$(OD_{10} - OD_{0\text{ Standard}}) * \text{Verdünnung der Probe} = \text{AIF in ng/ml}$$

Formel 5: AIF-Konzentration in ng/ml OD_{10} = *Optische Dichte nach 10 min bei 600 nm*, $OD_{0\text{ Standard}}$ = *OD der AIF-Standardreihe bei 0 ng/ml AIF*, *Verdünnung der Probe* = *Faktor 40*

3.6.2 Cytochrom C

Cytochrom C, ein Protein der mitochondrialen Atmungskette (GREEN und REED 1998), bildet im Zuge der Caspase-abhängigen Apoptose zusammen mit dem Apaf-1, dATP und der Procaspase-9 den Apoptosom Komplex im Zytosol der Zelle (KAR et al. 2010). Das Apoptosom initiiert die Autokatalyse der Procaspase-9 zur Caspase-9 und aktiviert weitere Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3). Dies veranlasst die Apoptose der Zelle (LÖFFLER et al. 2007). Um Cytochrom C zu quantifizieren, wurde das Human Cytochrom C ELISA Kit der Firma Abcam verwendet. Hierfür wurden die Herzohrgewebelysate auf Eis aufgetaut und 1:10 im 1 x *Cell Extraction Buffer PTR* verdünnt. Die Zubereitung der mitgelieferten Reagenzien und der Cytochrom C-Standardreihe entsprach den Angaben des Herstellers. Je 50 µl der Probe bzw. 50 µl des Cytochrom C-Standards wurden in Einfachbestimmung in die vorgesehenen Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. In jede Kavität wurden 50 µl des *Antibody Cocktails* pipettiert. Die abgedeckete Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei RT auf einem Schüttler bei 400 U/min inkubiert. Mithilfe von je 200 µl des *Wash Buffer PT* konnte die Mikrotiterplatte dreimalig gewaschen werden. Anschließend wurde in jede Kavität 100 µl *TMB Substrate* pipettiert und für 6 min bei RT im Dunklen auf einem Schüttler bei 400 U/min inkubiert. 100 µl der *Stop Solution* wurden hinzugegeben. Erneut wurde die Mikrotiterplatte für 1 min bei RT auf einem Schüttler bei 400 U/min inkubiert. Die 10 minütige Kinetikmessung der optischen Dichte (OD) erfolgte mithilfe des Infinite® 200 PRO bei einer

Wellenlänge von 600 nm und einem Messintervall von 30 s. Mithilfe der Formel 6 konnte die Konzentration des Cytochrom C in ng/ml errechnet werden.

$$(OD_{10} - 0 \text{ Standard}) * \text{Verdünnung der Probe} = \text{Cytochrom C in ng/ml}$$

Formel 6: Cytochrom C-Konzentration in ng/ml *OD 10 = optische Dichte nach 10 min bei 600 nm, 0 Standard = OD der Cytochrom C-Standardreihe bei 0 ng/ml Cytochrom C, Verdünnung der Probe = Faktor 10*

3.6.3 HIF-1 α

Der HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor und besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die Konzentration der Untereinheit HIF-1 α ist abhängig von der O₂-Konzentration im Gewebe. Bei Sauerstoffmangel steigt die HIF-1 α Konzentration im Zellkern stark an (SEMENZA 2002). Um HIF-1 α zu quantifizieren, wurde das High Sensitive ELISA Assay Kit for HIF-1 α der Firma Cloud-Clone Corp (TX, USA) verwendet. Die Herzohrgewebelysate wurden auf Eis aufgetaut und 1:10 in PBS verdünnt. Die Zubereitung der mitgelieferten Reagenzien und der HIF-1 α -Standardreihe entsprach den Angaben des Herstellers. Je 100 μ l der Proben bzw. der HIF-1 α -Standardreihe wurden in Einfachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettiert. Die abgedeckte 96-Well Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in den Kavitäten abgekippt und je 100 μ l des *Detection Reagent A* in die Kavitäten pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 1 h bei 37°C inkubiert. Mithilfe von je 200 μ l der *Wash Solution* wurde die 96-Well Platte dreimalig gewaschen. Je 100 μ l der *Detection Reagent B* Lösung wurden hinzugegeben. Erneut wurde die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37°C inkubiert. Je 90 μ l der *Substrate Solution* wurden in jede Kavität pipettiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von je 50 μ l einer *Stop Solution* beendet. Die Mikrotiterplatte wurde für 10 s auf einen Schüttler bei 400 U/min gestellt. Die Messung der OD erfolgte als Endpunktmessung mithilfe des Infinite® 200 PRO bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mithilfe der Formel 7 konnte die Konzentration des HIF-1 α in pg/ml errechnet werden.

(OD 450 nm – 0 Standard) * Verdünnung der Probe = HIF-1 α in pg/ml

Formel 7: HIF-1 α -Konzentration in pg/ml $OD\ 450\ nm = OD\ bei\ 450\ nm,\ 0\ Standard = OD\ der\ HIF-1\alpha-Standardreihe\ bei\ 0\ pg/ml\ HIF-1\alpha,\ Verdünnung\ der\ Probe = Faktor\ 10$

3.7 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde angewendet, um ROS-induzierte Deletionen im Gewebe nachzuweisen. Insbesondere das Auftreten der 4977 bp-Deletion der mtDNA sollte überprüft werden. Hierfür wurde isolierte mtDNA verwendet.

3.7.1 Isolierung der mtDNA

Um die mtDNA zu isolieren, wurde das Mitochondrial DNA Isolation Kit der Firma BioVision (Milipitas, CA, USA) verwendet. Je 20–30 mg der bei -80 °C gelagerten Herzohrproben wurden abgewogen und in einen mit RNase™ AWAY gereinigten Mörser gegeben. Mithilfe eines Pistills wurden die Proben fein zermahlen und mit einem Spatel in 1 ml des mitgelieferten *1 x Cytosol Extraction Buffer* gelöst. Die Gewebesuspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für weitere 10 min bei 700 x g und 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde bei -20°C bis zur Isolierung der nukleären DNA gelagert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml *1 x Cytosol Extraction Buffer* resuspendiert. Erneut wurde für 30 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Das reine mitochondriale Zellpellet wurde mit 30 μ l des *Mitochondrial Lysis Buffer* und 10 μ l des *Enzyme B Mix* versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht in einem 50 °C warmen Wasserbad inkubiert. Danach wurden 100 μ l Ethanol hinzugegeben, das Gemisch für 10 min bei -20 °C inkubiert und für 5 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Pellet, welches die mtDNA enthielt, wurde zweimalig mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 μ l DEPC-Wasser resuspendiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die isolierte mtDNA bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der mtDNA

Die Reinheit und die Konzentration der mtDNA wurde mithilfe der NanoQuant plate™, des Infinite® 200 PRO und der Software i-control™ ermittelt. In alle 16 Kavitäten der NanoQuant plate™ wurde je 1 µl Aqua dest. pipettiert. Die Platte wurde geschlossen und die Kontrollmessung bei 260 nm, 280 nm und 310 nm gestartet. Bei einer durchschnittlichen OD von $\leq 0,1$ für diese Kontrollmessung konnte die Reinheit und die Konzentration der mtDNA bestimmt werden. Die Reste des Aqua dest. wurden mit einem Papiertuch entfernt. In alle 16 Kavitäten wurden je 1 µl der zu testenden mtDNA pipettiert. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Der Gehalt der mtDNA in ng/µl ergab sich aus der gemessenen OD bei 260 nm, die mit dem Verdünnungsfaktor und dem Extinktionskoeffizienten multipliziert wurde. Die Reinheit der mtDNA konnte mithilfe des Quotienten der OD bei 260 nm und 280 nm (260/280 Ratio) beurteilt werden. Die optimale Reinheit der mtDNA liegt vor, wenn die 260/280-Ratio 1,8 beträgt.

3.7.3 Durchführung der PCR

Für die PCR wurde die bei -20 °C gelagerte mtDNA der Herzohrgewebeproben auf Eis aufgetaut. Das Taq PCR Core Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) wurde für die Durchführung der PCR verwendet. Die Komponenten der PCR sind in Tab. 10 und die verwendeten Primer in Tab. 11 aufgelistet. Tab. 12 zeigt die verwendeten Primerkombinationen, zusammen mit der bp-Länge der Primer, bei vorhandener 4977 bp-Deletion der mtDNA. Alle Komponenten wurden auf eine 96-Well-Platte semi-skirted LC480 PCR Plates (Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland) pipettiert. Eine *no template control* (NTC) wurde mitgeführt. Als Positivkontrolle diente die mtDNA einer geschädigten humanen Herzohrgewebeprobe, die sicher die 4977 bp-Deletion aufwies. Der Reaktionsablauf der PCR ist in Tab. 13 gezeigt. Der erste Zyklusschritt der durchgeführten PCR, die initiale Denaturierung, erfolgte bei 95 °C für 3 min. Die Denaturierung (94 °C, 1 min), Hybridisierung (62 °C, 1 min) und Elongation (72 °C, 1 min) wurde in 35 Zyklen wiederholt. Die finale Elongation erfolgte bei 72 °C für 10 min. Nach beendeter Reaktion wurde die Mikrotiterplatte bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

Tab. 10: Komponenten der PCR

Komponente	Konzentration je Reaktion
10 x PCR Buffer	1 x
dNTP mix	200 µM jeder dNTP
Taq DNA Polymerase	2,5 U
Template mtDNA	≤ 1 µg
Primer A	0,5 µM
Primer B	0,5 µM
RNAse freies H ₂ O	ad 20 µl

DNA = Desoxyribonukleinsäure, dNTP = Nukleosidtriphosphate, mtDNA = mitochondriale DNA, RNA = Ribonukleinsäure

Tab. 11: Primer für die PCR zum Nachweis der 4977 bp-Deletion

Primerbezeichnung	Schmelztemperatur	Gensequenz (5' → 3')
L5	58,3 °C	CCGGGGGTATACTACGGTCA
L6	49,3 °C	CTCTAGAGCCCACTGTAAAG
H2	62,9 °C	GGGAAGCGAGGTTGACCTG
H4	54,6 °C	CTAGGGTAGAATCCGAGTATGTTG

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Tab. 12: Eingesetzte Primer-Kombinationen für die PCR

Primerkombinationen	PCR-Produktlänge bei Vorliegen der 4977 bp-Deletion
L5/H4	802 bp
L6/H4	667 bp
L6/H2	389 bp

bp = Basenpaare

Tab. 13: Reaktionsablauf der PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Hybridisierung	62 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min
finale Elongation	72 °C	10 min

} 35 Zyklen

3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die mit der PCR amplifizierten mtDNA-Fragmente anhand ihrer Länge bzw. Größe aufgetrennt. Hierfür wurde eine horizontale Gelelektrophorese-Apparatur verwendet. Ein 1,5%iges Agarosegel wurde mithilfe von Universal-Agarose, gelöst in 1x TAE-Puffer (4,84 g Tris; 1,14 ml Essigsäure 100%; 0,37 g EDTA) hergestellt. 15 µl des Farbstoffs *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* wurden in das flüssige Gel pipettiert. Das Agarosegel wurde in den Gelschlitzen der Gelelektrophorese-Apparatur gefüllt und nach ca. 15 min mit 1x TAE-Puffer übergossen. Für die Beladung der Geltaschen wurde die bei 4 °C gelagerte Mikrotiterplatte bereitgestellt. Die amplifizierte mtDNA wurde im Verhältnis 6:1 mit dem *Blue Loading Buffer 6x* versetzt und aufgetragen. 1 µl *Blue Loading Buffer 6x*, 1 µl 100 bp DNA-Ladder (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und 4 µl Aqua dest. wurden vermischt und als Größenstandard zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte mitgeführt. Mithilfe des BluePower™ Plus-Gerätes erfolgte die Gelelektrophorese bei 70 V für 120 min. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern zur Anode. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller wandern sie durch das Gel. Mithilfe des UV-Transilluminators und des Gerix 1000 wurde das Agarosegel analysiert und dokumentiert. Die 4977 bp-Deletion galt als nachgewiesen, wenn die 4977 bp-Deletion mit allen drei Primer-Kombinationen verifiziert werden konnte.

3.7.5 Isolierung der nucDNA

Für die Isolierung der nucDNA wurde das bei -20 °C gelagerte Gewebepellet der Herzohren auf Eis aufgetaut. Mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen konnte die nucDNA aus den Gewebepellets gewonnen werden. 180 µl des *ALT Buffers* und 20 µl *Proteinase K* wurden zur jeweiligen Probe hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine 60 minütige Inkubation bei 56 °C. Das homogene Gemisch wurde für 10 s bei 8000 x g zentrifugiert. 4 µl *RNase A* wurden hinzugefügt, um die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen der Ribonukleinsäure (RNA) zu katalysieren. Die Proben wurden für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert, bevor 200 µl des *AL Buffers* zugegeben wurden. Nach erneutem Mischen und 10 min Inkubation im 70 °C warmen Wasserbad wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und 10 s bei 8000 x g zentrifugiert. Das lysierte Herzohrgewebepellet wurde in eine vom Hersteller mitgelieferte *QIAamp spin column* pipettiert und in einem 2 ml *Collection Tube* für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die *QIAamp spin column* wurde in ein sauberes 2 ml *Collection Tube* überführt und mit 500 µl *AW1 Buffer* befüllt. Nach 1 min Zentrifugation bei 8000 x g wurde die *QIAamp spin column* in ein sauberes 2 ml *Collection Tube* überführt und mit 500 µl *AW2 Buffer* befüllt. Die Proben wurden für 3 min bei 13000 x g zentrifugiert, in ein sauberes 2 ml *Collection Tube* überführt und für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die *QIAamp spin column* wurde in ein autoklaviertes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und mit 200 µl *AE Buffer* befüllt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Erneut wurden 200 µl *AE Buffer* hinzupipettiert, 5 min inkubiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Reinheit und der Gehalt der gewonnenen nucDNA wurde mithilfe der NanoQuant plate™, des Infinite® 200 PRO und der Software i-control™ ermittelt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die isolierte nucDNA bei -20 °C gelagert.

3.8. RT-PCR

Um den relativen Gehalt der mtDNA der Herzohrgewebeproben zu quantifizieren und zwischen der Patientengruppe mit VF bzw. SR vergleichen zu können, wurde die Methodik der *real time* Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) angewandt. Die RT-PCR gewährleistet mithilfe von Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit

(HOLZAPFEL und WICKERT 2007). Hierfür wurde das QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert in die doppelsträngige DNA und emittiert durch Anregung bei 498 nm Licht der Wellenlänge 522 nm. Das Fluoreszenzsignal während der Reaktion ist proportional zur Menge der vorhandenen DNA. Das heißt, je stärker das Fluoreszenzsignal, desto größer die Menge der amplifizierten DNA. Der sog. „Crossing Point“ (CP-Wert) gibt dabei den Zeitpunkt in der PCR bzw. die Anzahl der PCR-Zyklen an, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (HOLZAPFEL und WICKERT 2007). Mithilfe des CP-Wertes und der Formel 8 wurde der relative mtDNA-Gehalt der Herzohrgewebeproben bestimmt (GONZALEZ-HUNT et al. 2016). Die RT-PCRs wurden am LightCycler 480 Instrument II der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für die RT-PCR wurde die bei -20 °C gelagerte mtDNA und nucDNA der Herzohrgewebeproben auf Eis aufgetaut. Das QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit der Firma Qiagen wurde verwendet, um die RT-PCR durchzuführen. Die Komponenten der RT-PCR sind in Tab. 14 und die verwendeten Primer in Tab. 15 aufgelistet. Tab. 16 zeigt den Reaktionsablauf der RT-PCR. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 2 min. Die Denaturierung (95 °C, 15 s) und die Hybridisierung/Elongation (60 °C, 30 s) wurden in 38 Zyklen wiederholt. Es erfolgte ein schrittweiser Anstieg der Schmelzkurve um 0,3 °C, bis 95 °C erreicht wurden.

Tab. 14: Komponenten der RT-PCR

Komponente	Konzentration je Reaktion
2 x SYBR Green PCR Master Mix	1 x
Template nucDNA/mtDNA	≤ 100 ng
Primer A	0,7 µM
Primer B	0,7 µM
RNAse freies H ₂ O	ad 15 µl

RNA = Ribonukleinsäure, nucDNA = nukleäre DNA, mtDNA = mitochondriale DNA

Tab. 15: Primer für die quantitative RT-PCR

Zielmolekül	Genom	Spezies	Vorwärtsprimer (5'→ 3')	Rückwärtsprimer (5'→ 3')
β2-Microglobulin	nucDNA	human	TGCTGTCTCCATGTTTGAT GTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAA GT
tRNA_Leucin	mtDNA	human	CACCCAAGAACAGGGTTT GT	TGGCCATGGGTATGTTGTT A

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, nucDNA = nukleäre DNA, mtDNA = mitochondriale DNA, T = Thymin

Tab. 16: Reaktionsablauf der quantitativen RT-PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Hybridisierung/ Elongation	60 °C	30 s
Schmelzkurve	Schrittweiser Anstieg um 0,3 °C bis 95 °C	

} 38 Zyklen

Aus den CP-Werten der nucDNA bzw. mtDNA wurde ein MW gebildet. Mithilfe der Formel 8 konnte der relative mtDNA-Gehalt der Herzohrgewebeprobe errechnet werden (GONZALEZ-HUNT et al. 2016).

$$\Delta CP = \text{nucDNA CP} - \text{mtDNA CP}$$

$$\text{relativer mtDNA-Gehalt} = 2 \times 2^{\Delta CP}$$

Formel 8: Berechnung des relativen mtDNA-Gehaltes

3.9 SDS-PAGE und Western Blot

In Tab. 17 sind alle benötigten Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE und den Western Blot aufgelistet.

Tab. 17: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE und den Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Trenngel Puffer (pH 8,8)	Tris 1,5 M
	EDTA 8 mM
	SDS 10 mM
	ad Aqua dest.
Sammelgel Puffer (pH 6,8)	Tris 0,5 M
	EDTA 8 mM
	SDS 10 mM
	ad Aqua dest.
5 x SDS Laufpuffer (pH 8,9)	Tris 0,25 M
	Glycin 1,92 M
	SDS 17,5 mM
	ad Aqua dest.
10 x Towbin- Puffer (Tw-P)	Tris 0,25 M
	Glycin 1,92 M
	SDS 7 mM
	ad Aqua dest.
1 x Tw-P	100 ml 10 x Tw-P und 200 ml Methanol auf 1 l Aqua dest. auffüllen
5 x Laemmli Puffer (pH 6,8)	Tris 0,5 M
	Glycerol 50 %
	SDS 10 %
	β -Mercaptoethanol 25 %
	Bromphenolblau 0,05 %
	ad Aqua dest.
5 x TBS Tween (pH 7,4)	Tris 0,25 M
	NaCl 2,5 M
	ad Aqua dest.
1 x TBS Tween	200 ml 5 x TBS Tween und 1 ml Tween® 20 auf 1 l Aqua dest. auffüllen (pH 7,4)

Aqua dest. = Aqua destillata, *EDTA* = Ethylendiamintetraessigsäure, *NaCl* = Natriumchlorid,
SDS = Natriumlaurylsulfat, *Tris* = Trishydroxymethylaminomethan

3.9.1 SDS-PAGE

Mithilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine anhand ihres Molekulargewichts auftrennen (LAEMMLI 1970). Hierfür wurden Glasplatten und Spacer mit Isopropanol gereinigt und in die vertikale Doppel-Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt. Die Apparatur wurde mit Aqua dest. befüllt, um die Dichtigkeit des Systems zu überprüfen. Die benötigten Kämme wurden zwischen die Glasplatten eingeführt und ca. 1 cm unterhalb ihres Endes markiert, um die Füllhöhe der Gele festzulegen. Das Trenngel, dessen Zusammensetzung in Tab. 18 festgehalten ist, wurde in einem Becherglas hergestellt und mithilfe einer serologischen Pipette zwischen die Glasplatten gegeben. Isopropanol wurde auf das Trenngel gegeben.

Tab. 18: Zusammensetzung de Trenngels

Gelkomponente	Volumina für eine 12 %ige Gel-Konzentration
Aqua dest.	5,3 ml
Trenngel Puffer	3,75 ml
30 % Acrylamid	6 ml
TEMED	50 µl
10 % APS	90 µl

APS = Ammoniumperoxodisulfat, Aqua dest. = Aqua destillata, TEMED = Tetramethylethyldiamin

Nach der Polymerisierung des Trenngels (ca. 15 min) wurden die Isopropanolreste entfernt und das Sammelgel hergestellt. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist in Tab. 19 aufgelistet. Mit einer serologischen Pipette wurde die Lösung für das Gel auf das ausgehärtete Trenngel pipettiert. Die Kämme wurden in die Apparatur eingeführt. Nach der Polymerisierung des zweiten Gels (ca. 15 min) wurde die Apparatur mit 1 x SDS Laufpuffer (Tab. 17) befüllt. Die Kämme wurden vorsichtig entfernt.

Tab. 19: Zusammensetzung des Sammelgels

Gelkomponente	Volumina für eine 4%ige Gel-Konzentration
Aqua dest.	7,8 ml
Sammelgel Puffer	3,3 ml
30 % Acrylamid	2 ml
TEMED	40 µl
10 % APS	150 µl

APS = Ammoniumperoxodisulfat, Aqua dest. = Aqua destillata, TEMED = Tetramethylethyldiamin

Die zu untersuchenden Herzohrgewebelysate wurden auf Eis aufgetaut und in Relaxing-Lysepuffer verdünnt, sodass eine standardisierte Proteinmenge von 20 µg/µl je Probe vorlag. 8 µl 5 x Laemmli Puffer wurden zu jeder Probe hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min inkubiert und für 10 s zentrifugiert. Je 40 µl der Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. In die erste Geltasche wurden 5 µl des Proteinmarkers IV Prestained pipettiert, um das Molekulargewicht der Proben ermitteln zu können. Die vertikale Doppel-Gelelektrophorese-Apparatur wurde an den elektrischen Strom angeschlossen. Für 60 min wurde eine konstante Spannung von 70 V und anschließend, für weitere 60 min, eine konstante Spannung von 90 V angelegt. Nachdem alle Proben das Trenngel sichtbar durchlaufen hatten, wurde die Apparatur von der Stromquelle genommen.

3.9.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein biochemisches Verfahren, bei dem die zuvor aufgetrennten Proteine aus einem Gelelektrophoreseverfahren (z.B. SDS-PAGE) auf eine Trägermembran übertragen werden. Die zu untersuchenden Proteine können anschließend mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden (TOWBIN et al. 1979). Die hier verwendeten Antikörper sind in Tab. 20 aufgelistet. Zunächst wurden 6 Gel-Blotting Papiere (Whatman-Paper) zurechtgeschnitten und in 1 x Towbin-Puffer getränkt. Als Trägermembran wurde eine

Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) verwendet, die für 5 min in Methanol aktiviert wurde.

Tab. 20: Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
TRX 1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology®
Kaninchen-POD konjugiert	Ziege	1:2000	Sigma-Aldrich®
GAPDH	Maus	1:5000	HyTest Ltd.
Maus-POD konjugiert	Ziege	1:5000	Sigma-Aldrich®
TXNIP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology®
Kaninchen-Biotin	Ziege	1:20000	Sigma-Aldrich®
Streptavidin	Meerrettich	1:2000	Thermo Fisher Scientific
Anti-ITCH/AIP4	Kaninchen	1:1000	Abcam

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, POD = Peroxidase, TRX 1 = Thioredoxin 1, TXNIP = Thioredoxin interagierendes Protein, ITCH/AIP4 = Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase/Atropin 1 interagierendes Protein 4

Drei Whatman-Paper, die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und drei weitere Whatman-Paper wurden übereinander geschichtet in die Blotting-Kammer eingespannt. Die Blotting-Kammer wurde bei 400 mA für 2 h an den elektrischen Strom angeschlossen. Die PVDF-Membran wurde für 60 min in 5 % BSA-Lösung oder 5 % Milch geblockt und anschließend mit den Primärantikörpern TRX 1, TXNIP oder ITCH (Tab. 20) in Folie bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Trägermembran nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBS-Tween (Tab. 17) mit einem passenden Sekundärantikörper (Tab. 20) für 60 min bei RT inkubiert. Bei dem Antikörper TXNIP wurde mit einem Kaninchen-Biotin Sekundärantikörper (Tab. 20) gearbeitet. Nach drei erneuten Waschschrritten wurden 2 ml der SuperSignal® Chemilumineszenz-Lösung auf die PVDF-Membran pipettiert und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der Trägermembran erfolgte mit der Detektionsplattform Fusion Solo S. Mithilfe der dazugehörigen Software VisionCapt konnten die sichtbaren Banden

densitometrisch ausgewertet werden. Die Ladekontrolle der PVDF-Membran erfolgte mit einem Antikörper der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Das Chemilumineszenzsignal der Primärantikörper (TRX 1, TXNIP, ITCH) wurde densitometrisch ins Verhältnis zu GAPDH gesetzt. An die PVDF-Membranen gebundene Antikörper wurden mithilfe des Restore Plus® Stripping Puffers denaturiert, sodass diese mehrmals verwendet werden konnten.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen und grafische Darstellungen wurden mit der Software SPSS® Statistics Version 25 der Firma IBM® (Illinois, USA) durchgeführt und erstellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit erhobene Daten und Graphen als $MW \pm$ Standardabweichung dargestellt. Der Levene-Test wurde angewandt, um Varianzgleichheiten zu prüfen. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen wurde mithilfe des T-Tests bei unabhängigen Stichproben analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ definiert. Eine Statistikberatung erfolgte beim Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig, Deutschland) an der Universität Leipzig.

4 Ergebnisse

4.1 Gruppencharakteristika

Alle relevanten Gruppencharakteristika der VF-Gruppe und der SR-Gruppe sind in Tab. 21 aufgeführt. Die VF-Gruppe beinhaltete n = 15 und die SR-Gruppe n = 15 Proben. Beide Patientengruppen wurden bezüglich der Prävalenz ihrer Nebendiagnosen zum Messzeitpunkt verglichen (Tab. 21). Das Alter (VF-Gruppe 68,6 ± 10,1 Jahre vs. SR-Gruppe 63,2 ± 9,4 Jahre), das männliche Geschlecht (VF-Gruppe 73 % vs. SR-Gruppe 87 %) und die kardiovaskulären Nebendiagnosen der beiden Patientengruppen waren miteinander vergleichbar.

Tab. 21: Gruppencharakteristika der VF- und SR-Gruppe

	VF-Gruppe n=15	SR-Gruppe n=15	p-Wert
Alter in Jahren	68,6 ± 10,1	63,2 ± 9,4	0,142
männliches Geschlecht	11 (73 %)	13 (87 %)	0,651
VF-Typ			
Paroxysmal	9 (60 %)	-	-
Persistierend	4 (27 %)	-	-
Permanent	2 (13 %)	-	-
Klappeninsuffizienz			
Aortenklappeninsuffizienz	7 (47 %)	6 (40 %)	0,713
Mitralklappeninsuffizienz	10 (67 %)	11 (73 %)	1,000
Pulmonalklappeninsuffizienz	0 (0 %)	0 (0 %)	1,000
Trikuspidalklappeninsuffizienz	6 (40 %)	7 (47 %)	0,713
Klappenstenosen			
Aortenklappenstenose	3 (20 %)	4 (27 %)	1,000
Mitralklappenstenose	0 (0 %)	2 (13 %)	0,483
Pulmonalklappen/ Trikuspidalklappenstenose	0 (0 %)	0 (0 %)	1,000
koronare Herzkrankheit	10 (67 %)	8 (53 %)	0,710

	VF-Gruppe n=15	SR-Gruppe n=15	p-Wert
Bluthochdruck	14 (93 %)	14 (93 %)	1,000

SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern

4.2 Enzymkinetik

Die ROS-Produktion der Herzohrproben wurde indirekt über die Quantifizierung der NOX, XO, SOD und Katalase gemessen. Die NOX und XO sind in der Lage, ROS zu produzieren. Der SOD und Katalase werden antioxidative Eigenschaften zugesprochen.

4.2.1 NOX-Aktivität

In Abb. 3 ist beispielhaft der zeitliche Verlauf der gemessenen OD der Probe A19 bei 550 nm dargestellt. Ein Anstieg der OD über die Zeit ist zu erkennen. In Abb. 4 ist die gemessene NOX-Aktivität in mU/mg der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der Gruppe der Patienten mit VF konnte eine durchschnittliche NOX-Aktivität von $9,6 \pm 0,8$ mU/mg, in der Gruppe der Patienten mit SR von $9,7 \pm 0,7$ mU/mg errechnet werden ($p = 0,934$). Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen.

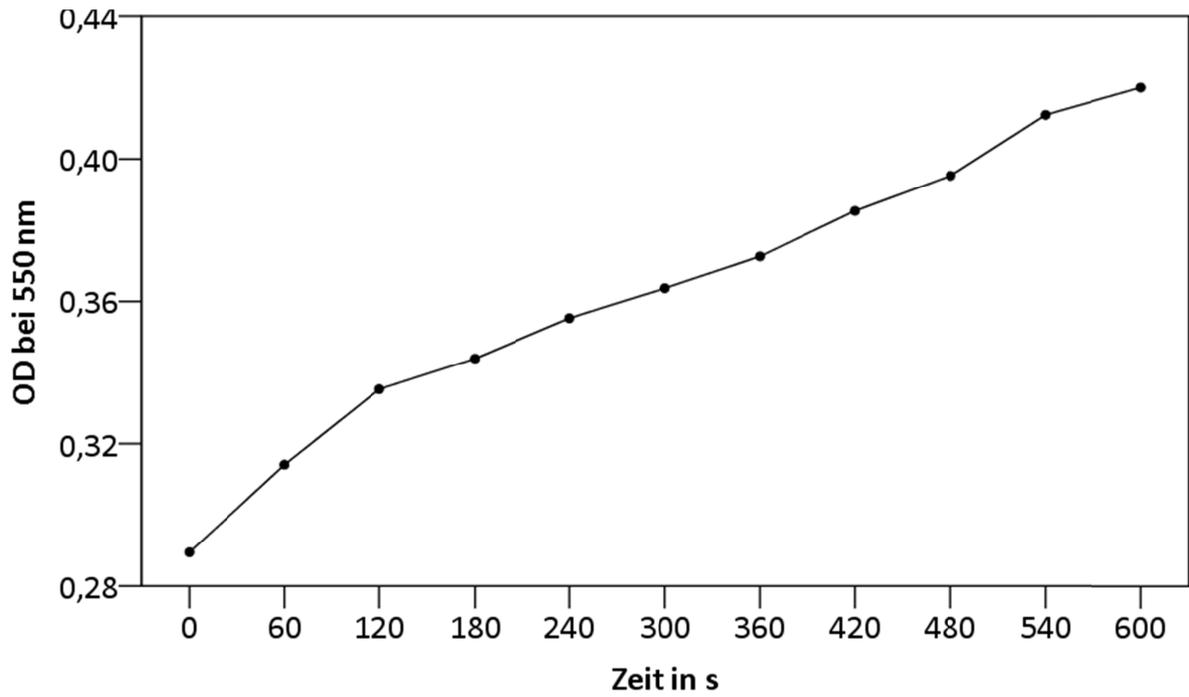


Abb. 3: Exemplarische Messung der NOX-Aktivität bei einer OD von 550 nm der Probe A19

NOX = NADPH-Oxidase, OD = optische Dichte

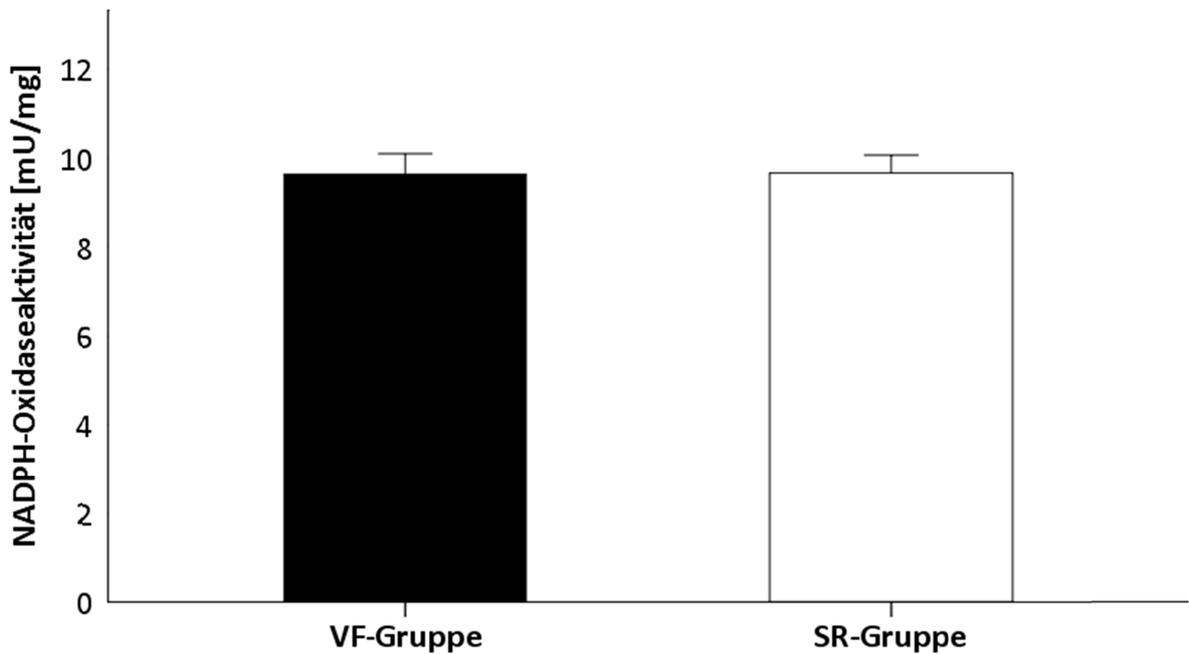


Abb. 4: NOX-Aktivität der Patienten mit VF und SR NOX = NADPH-Oxidase, SR =

Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern

4.2.2 XO-Aktivität

Die XO produziert mithilfe von O_2 , O_2^- und H_2O_2 . In Abb. 5 ist die XO-Aktivität mithilfe einer exemplarischen Kinetikmessung anhand der Probe A19 dargestellt. Die Abb. zeigt den zeitlichen Verlauf der XO-Aktivität der Probe A19 bei 570 nm. Ein Anstieg der XO-Aktivität über die Zeit ist zu erkennen.

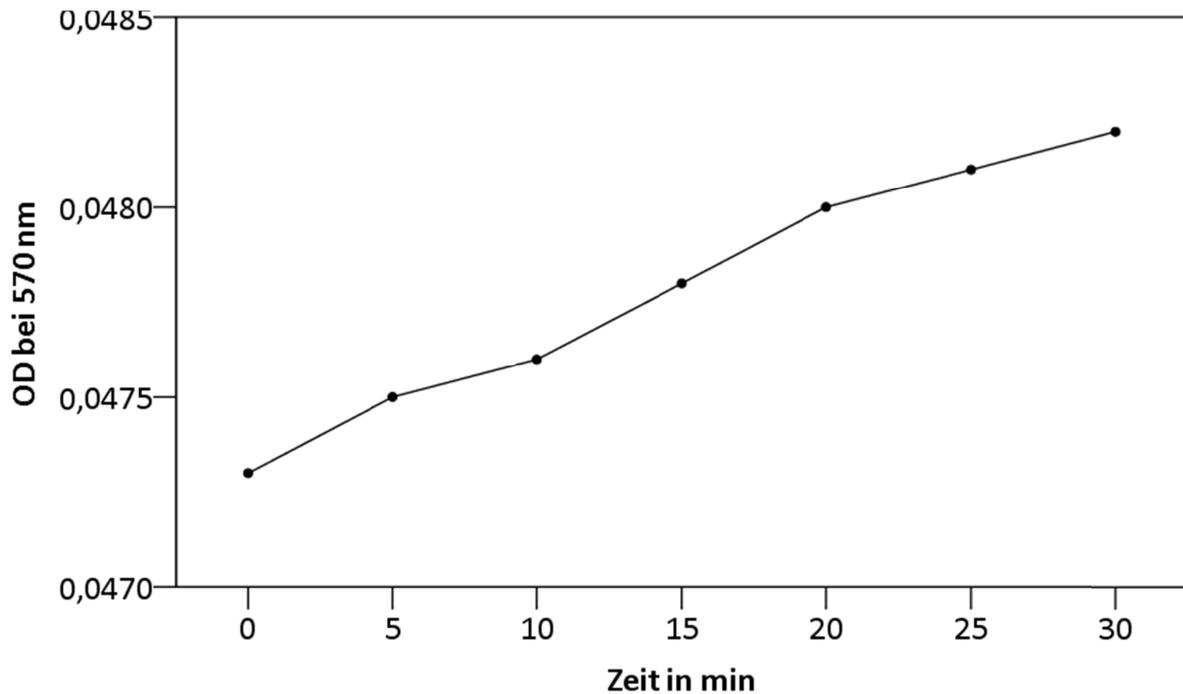


Abb. 5: Exemplarische Messung der XO-Aktivität bei 570 nm Probe A19 OD = optische Dichte, XO = Xanthin-Oxidase

In Abb. 6 ist die gemessene XO-Aktivität der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der VF-Gruppe betrug die durchschnittliche XO-Aktivität $0,35 \pm 0,41$ mU/mg, in der SR-Gruppe $0,16 \pm 0,22$ mU/mg ($p = 0,131$). Die Aktivitätswerte der XO sind in beiden Gruppen miteinander vergleichbar.

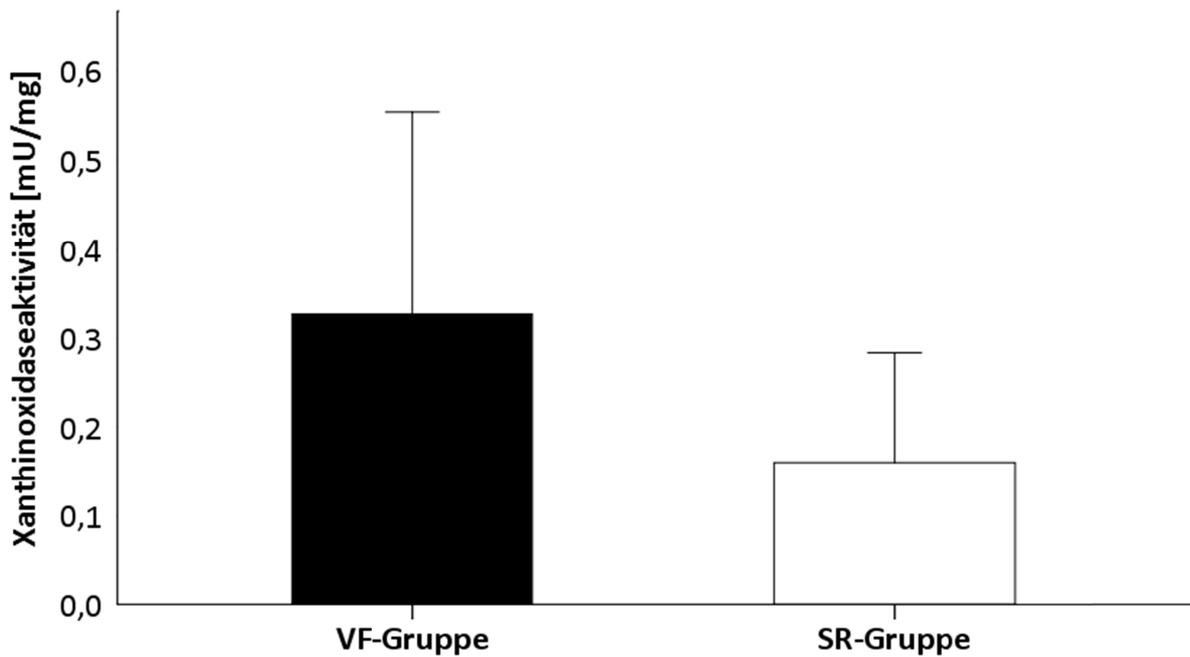


Abb. 6: XO-Aktivität der Patienten mit VF und SR SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern, XO = Xanthin-Oxidase

4.2.3 SOD-Aktivität

Die Messung der SOD-Aktivität gibt Hinweise auf die antioxidative Reaktion der Zelle auf oxidativen Stress. Die Aktivität der SOD ist in Abb. 7 anhand der Probe A19 dargestellt. Die Abb. zeigt beispielhaft den zeitlichen Verlauf der Kinetikmessung der Probe A19 bei 420 nm. Ein Anstieg der SOD-Aktivität über die Zeit ist zu erkennen. Die SOD-Aktivität der VF-Gruppe war mit 666 ± 186 U/mg mit der SOD-Aktivität der SR-Gruppe mit 739 ± 133 U/mg ($p = 0,228$) vergleichbar (Abb. 8).

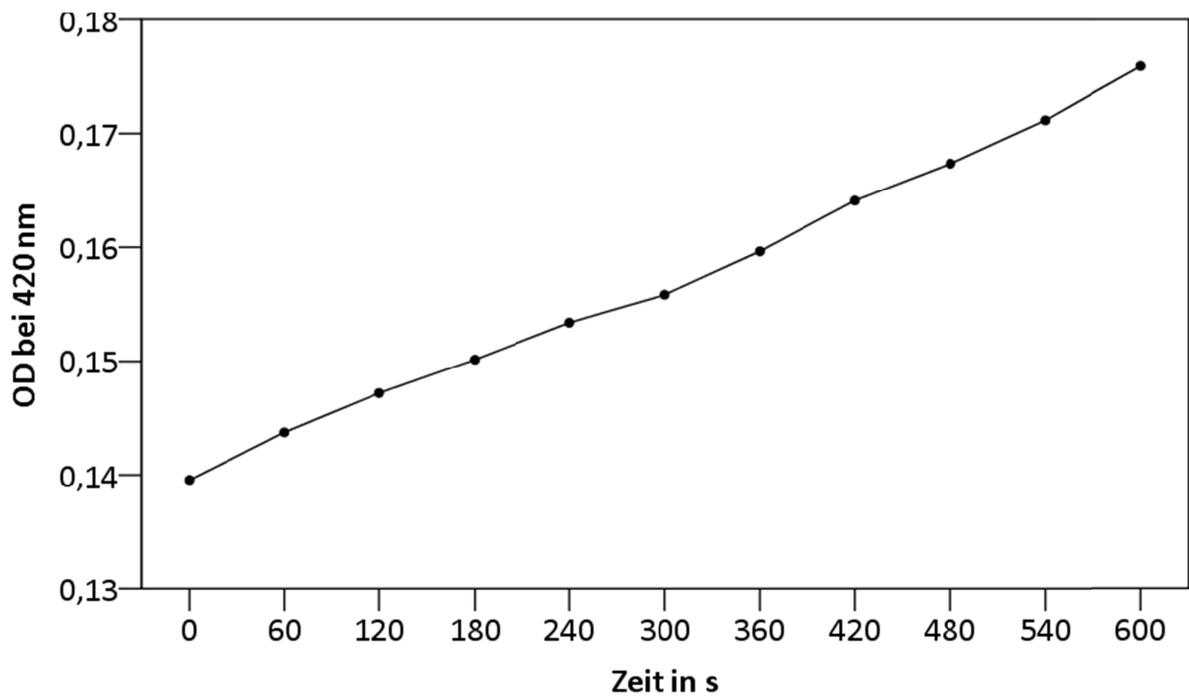


Abb. 7: Exemplarische Messung der SOD-Aktivität bei 420 nm Probe A19 *OD = optische Dichte, SOD = Superoxiddismutase*

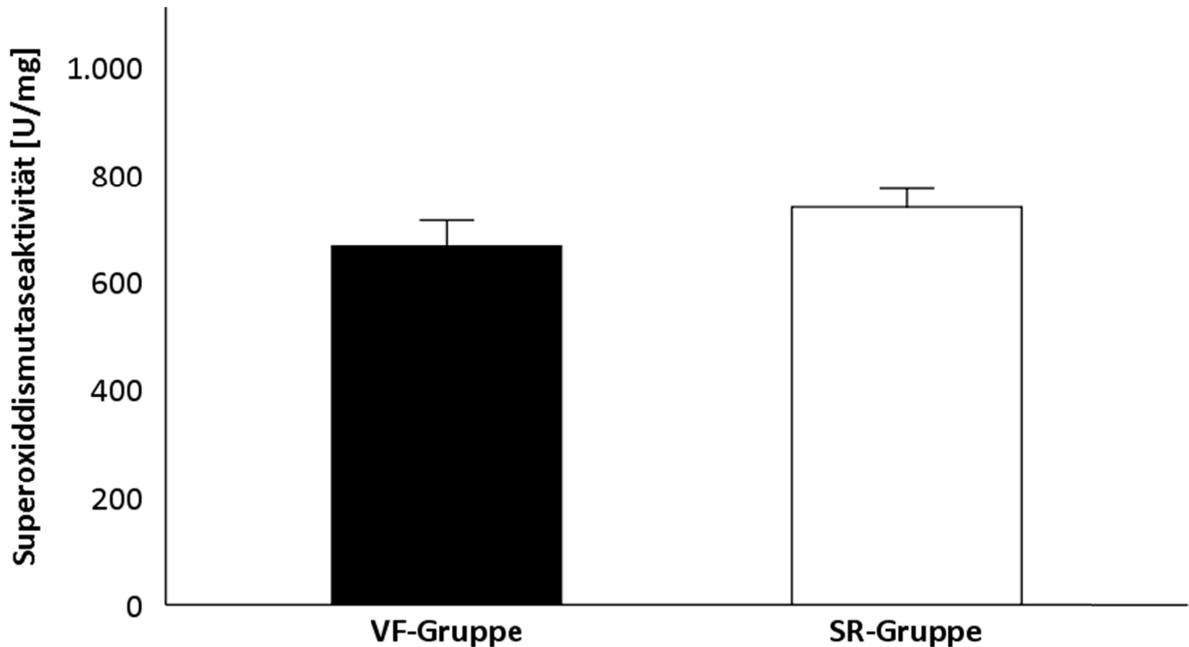


Abb. 8: SOD-Aktivität der Patienten mit VF und SR *SOD = Superoxiddismutase, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern*

4.2.4 Katalase-Aktivität

Die Katalase-Aktivität und damit die Produktion von H_2O und O_2 als antioxidative Reaktion der Zelle ist in Abb. 9 beispielhaft dargestellt. Die Abb. zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der gemessenen OD bei 240 nm. Ein Abfall der OD über die Zeit ist zu erkennen. Dies lässt sich in einem Umsatz von H_2O_2 begründen.

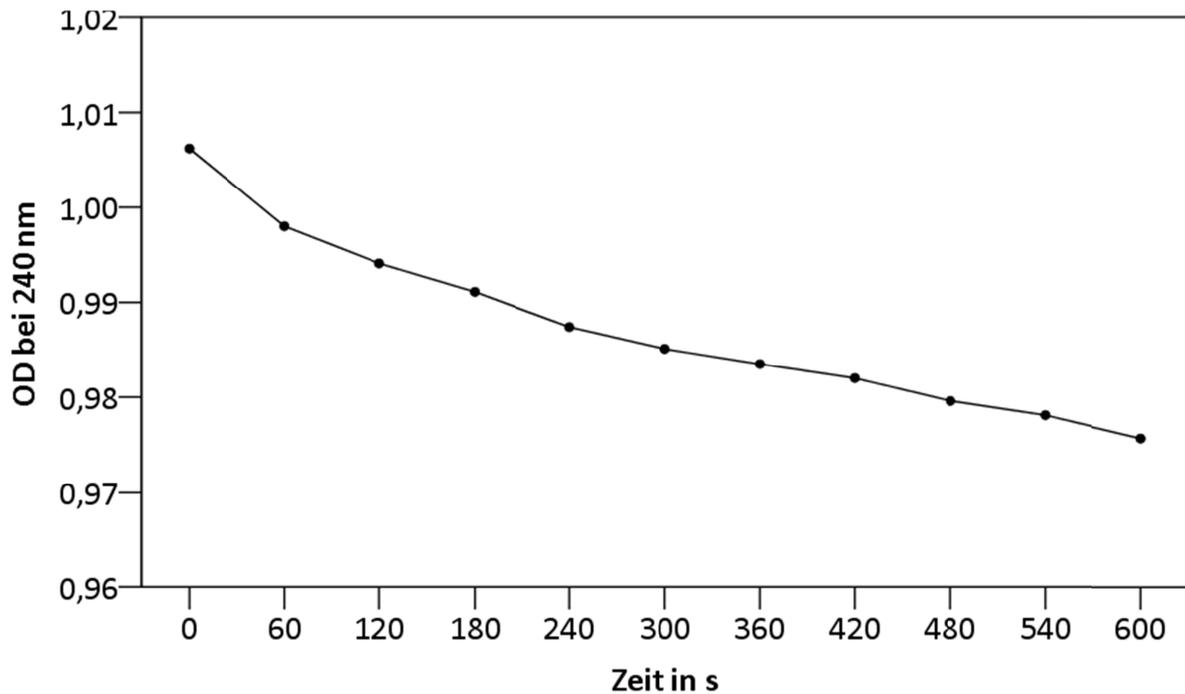


Abb. 9: Exemplarische Messung der Katalase-Aktivität bei 240 nm Probe A19 OD = optische Dichte

In Abb. 10 ist die Katalase-Aktivität der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. In der Patientengruppe mit VF betrug die durchschnittliche Katalase-Aktivität -97 ± 52 U/mg, in der Patientengruppe mit SR -81 ± 31 U/mg ($p = 0,310$).

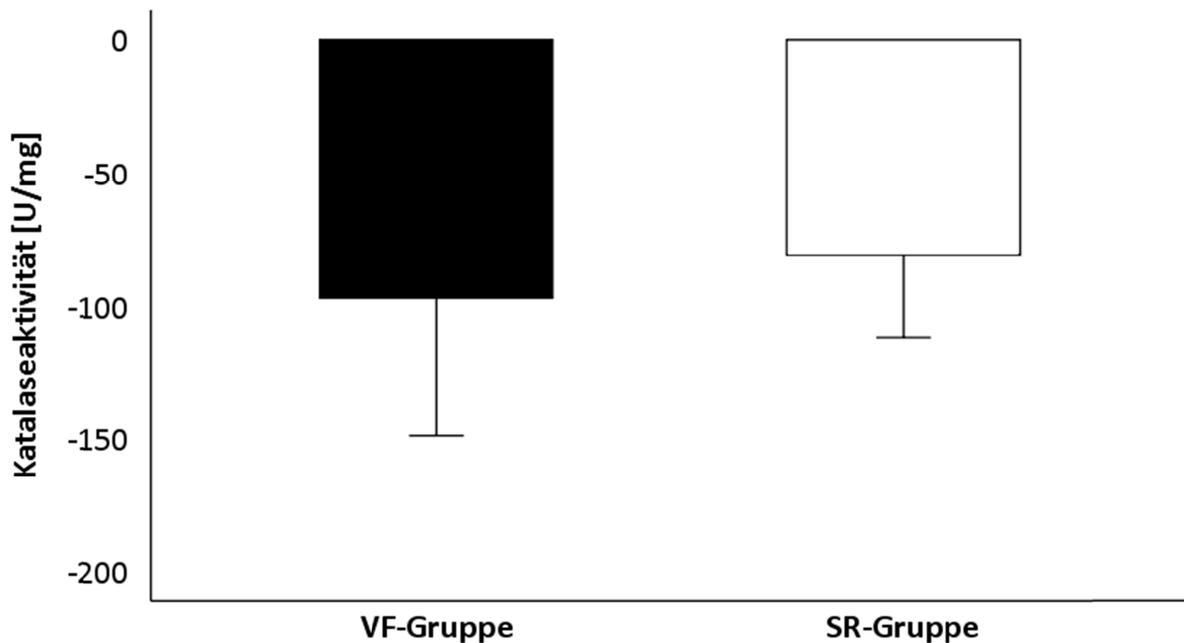


Abb. 10: Katalase-Aktivität der Patienten mit VF und SR SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern

4.3 Quantifizierung der AIF-, Cytochrom C- und HIF-1 α -Konzentrationen mittels ELISA

Um den Grad der Apoptose und die Auswirkungen hypoxischer Effekte bei VF in den Herzohrproben zu erfassen, wurden die Konzentrationen von AIF, Cytochrom C und HIF-1 α ermittelt. Bei der Apoptose und/oder Hypoxie nimmt der oxidative Stress und somit die ROS-Produktion im Gewebe zu.

4.3.1 AIF

Der AIF kann im Zuge der Caspase-unabhängigen Apoptose im Zellkern eine Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der DNA induzieren. Deshalb wurde die AIF Konzentration gemessen, um Aufschluss über den Grad der Apoptose der Zelle zu erhalten. In Abb. 11 ist die gemessene AIF-Konzentration der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der VF-Gruppe betrug die AIF-Konzentration 120 ± 50 ng/ml,

in der SR Gruppe 112 ± 48 ng/ml ($p = 0,680$). Der Grad der induzierten Apoptose ist somit in beiden Patientengruppen miteinander vergleichbar.

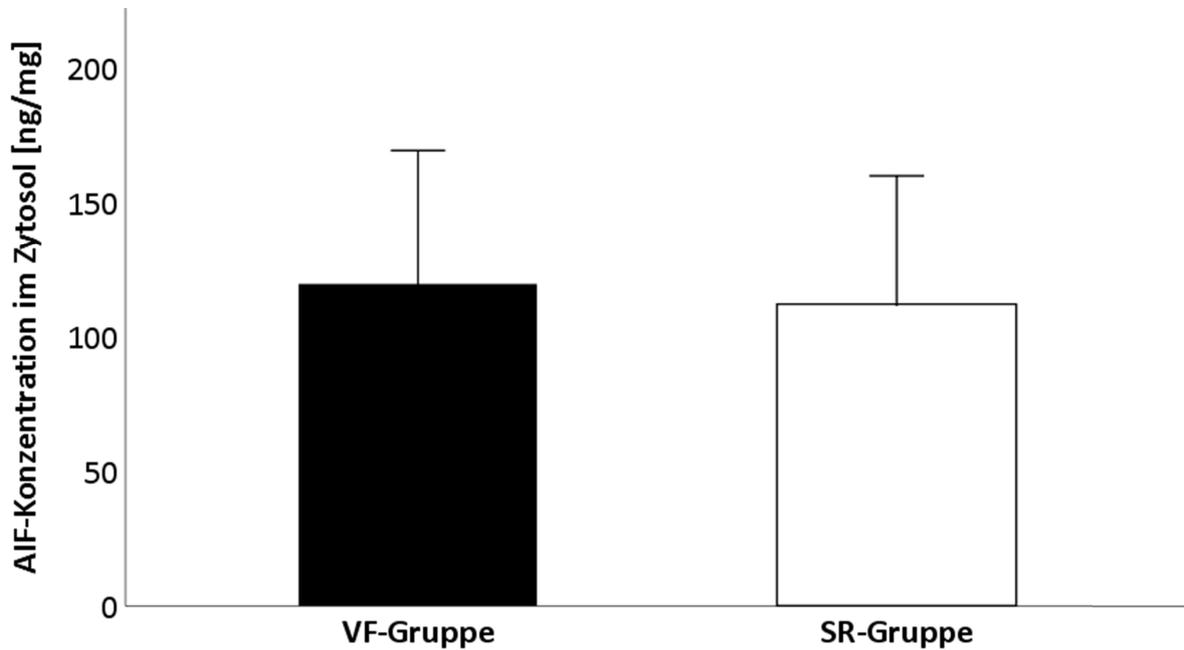


Abb. 11: AIF-Konzentration der Patienten mit VF und SR *AIF = Apoptose induzierender Faktor, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern*

4.3.2 Cytochrom C

Cytochrom C kann als Teil des Apoptosom-Komplexes im Zytosol der Zelle die Apoptose mit initiieren. Um die Initiierung der Apoptose in der Zelle zu ermitteln, wurde die Cytochrom C Konzentration bestimmt. Die gemessene Cytochrom C-Konzentration der Patienten mit VF und der Patienten mit SR kann der Abb. 12 entnommen werden. Die Gruppe der Patienten mit VF wies eine durchschnittliche Cytochrom C-Konzentration von $3,3 \pm 1,3$ ng/ml auf. In der Gruppe der Patienten mit SR betrug die Cytochrom C-Konzentration $2,9 \pm 0,7$ ng/ml ($p = 0,239$) und war damit zwischen beiden Gruppen vergleichbar.

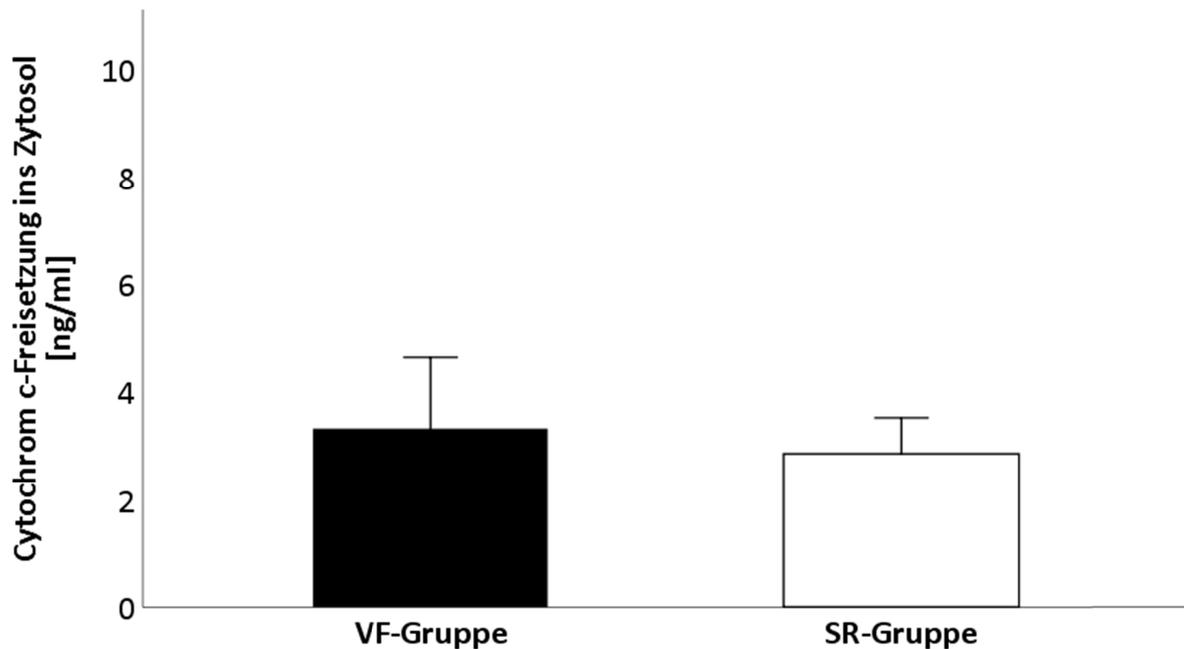


Abb. 12: Cytochrom C-Konzentration der Patienten mit VF und SR SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern

4.3.3 HIF-1 α

Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α vermehrt in den Zellkern der Zelle transloziert, um einen vermehrten O₂-Verlust des Gewebes zu vermeiden. Um eine mögliche Hypoxie der Herzohrproben festzustellen, wurde die HIF-1 α -Konzentration gemessen. In Abb. 13 ist die gemessene HIF-1 α -Konzentration der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der VF-Gruppe betrug die HIF-1 α -Konzentration 2788 ± 738 pg/ml, in der SR-Gruppe 2822 ± 855 pg/ml ($p = 0,909$). Beide Patientengruppen sind hinsichtlich der hypoxischen Schädigung des Gewebes miteinander vergleichbar.

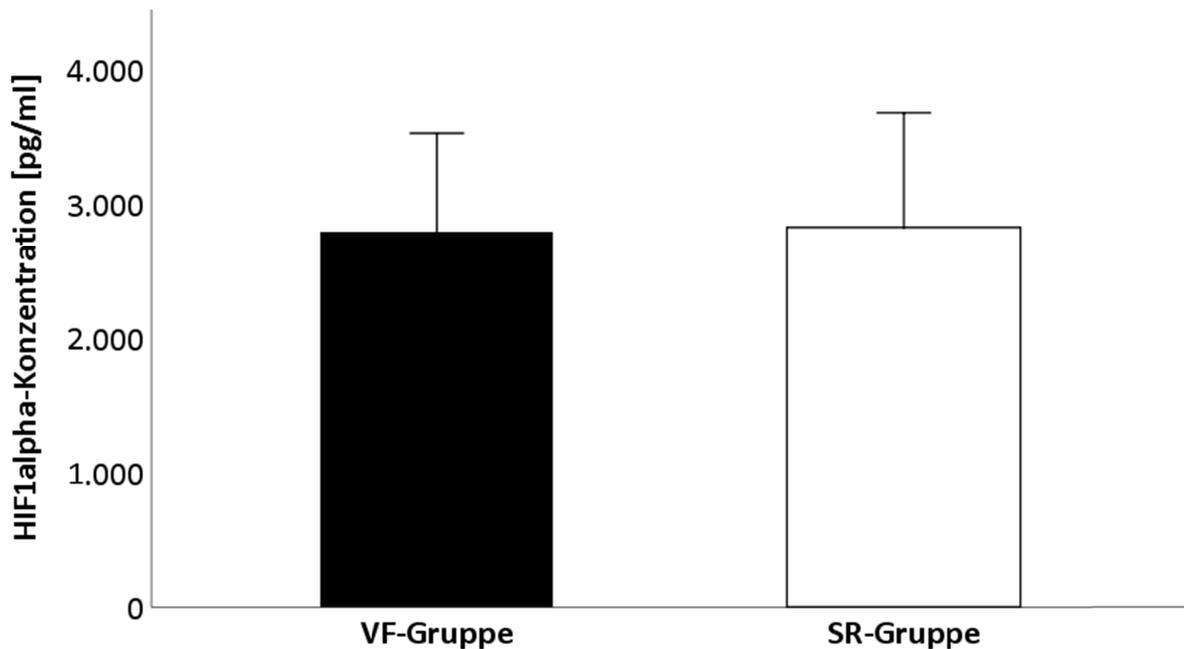


Abb. 13: HIF-1 α -Konzentration der Patienten mit VF und SR *HIF-1 α = Hypoxie induzierender Faktor alpha, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern*

4.4 Nachweis der 4977 bp-Deletion in der humanen mtDNA mittels PCR

Die vermehrte ROS-Produktion während des VF kann zu Schädigungen und Mutationen der DNA und insbesondere der mtDNA führen. Die häufigste Mutation der mtDNA unter oxidativem Stress ist die 4977 bp-Deletion. Abb. 14a zeigt eine schematische Darstellung der humanen mtDNA mit der 4977 bp-Deletion und den jeweiligen, die Deletion flankierenden, Primerkombinationen aus der durchgeführten PCR. Abb. 14b zeigt eine schematische Darstellung der ROS-geschädigten humanen mtDNA. Die 4977 bp-Deletion galt als nachgewiesen, wenn die jeweilige Herzohrgewebeprobe alle drei möglichen Banden mit den Primerkombinationen L5/H4 (802 bp), L6/H4 (667 bp) und L6/H2 (389 bp) (Tab. 12) aufwies. Abb. 15 zeigt exemplarisch die Agarose-Gelelektrophorese einer geschädigten Herzohrgewebeprobe. Diese Probe wurde als Kontrolle für den Nachweis der 4977 bp-Deletion hinzugezogen. Die Kontrolle wies alle benötigten Banden für den Nachweis der 4977 bp-Deletion der mtDNA auf. Es wurde eine Reinheit der mtDNA von 1,05 bis 1,86 errechnet. Der Gehalt der mtDNA schwankte zwischen 3,2 ng/ μ l und 696 ng/ μ l.

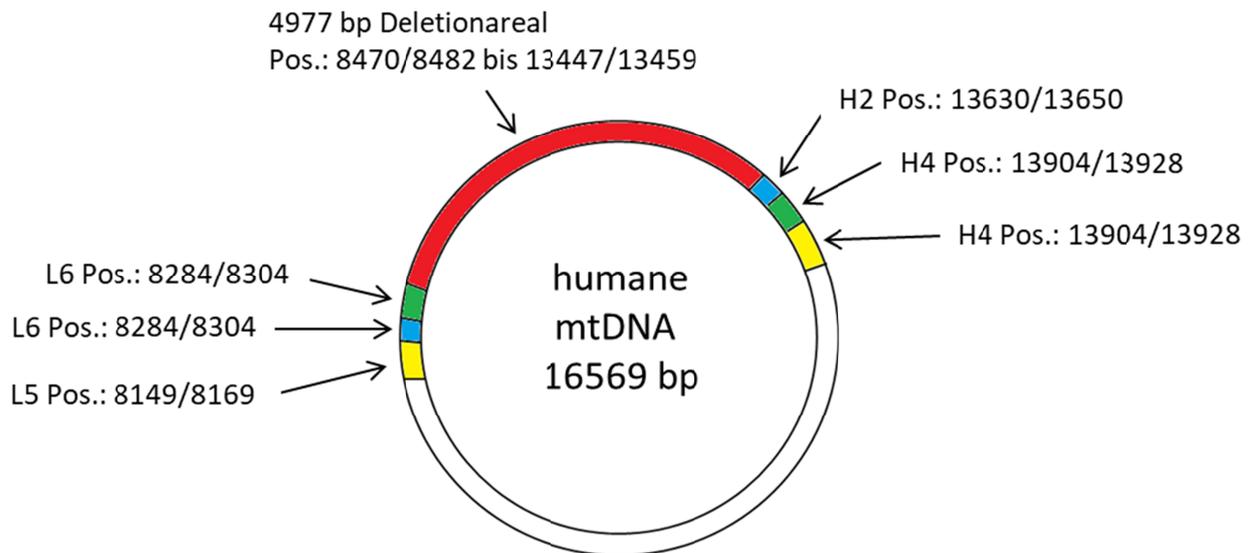


Abb. 14a: Schematische Darstellung der humanen mtDNA *bp = Basenpaare, mtDNA = mitochondriale DNA, Pos.: = Position. Die humane mtDNA ist 16569 bp lang. Die bei oxidativem Stress charakteristisch auftretende 4977 bp-Deletion ist rot gekennzeichnet. Sie wird flankiert von den für die PCR ausgewählten Primerkombinationen L6/H2 (389 bp lang, blau gekennzeichnet), L6/H4 (667 bp lang, grün gekennzeichnet) und L5/H4 (802 bp lang, gelb gekennzeichnet).*

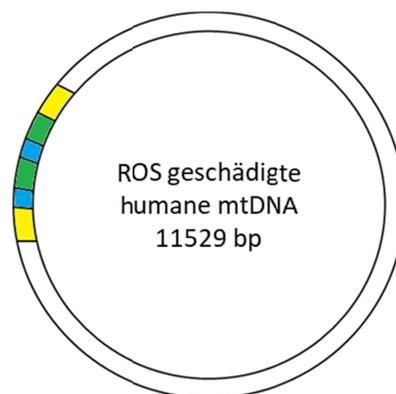


Abb. 14b: Schematische Darstellung der ROS-geschädigten humanen mtDNA *bp = Basenpaare, mtDNA = mitochondriale DNA. Die ROS-geschädigte humane mtDNA ist 11529 bp lang. Die für die PCR ausgewählten Primerkombinationen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. L6/H2 blau, L6/H4 grün und L5/H4 gelb.*

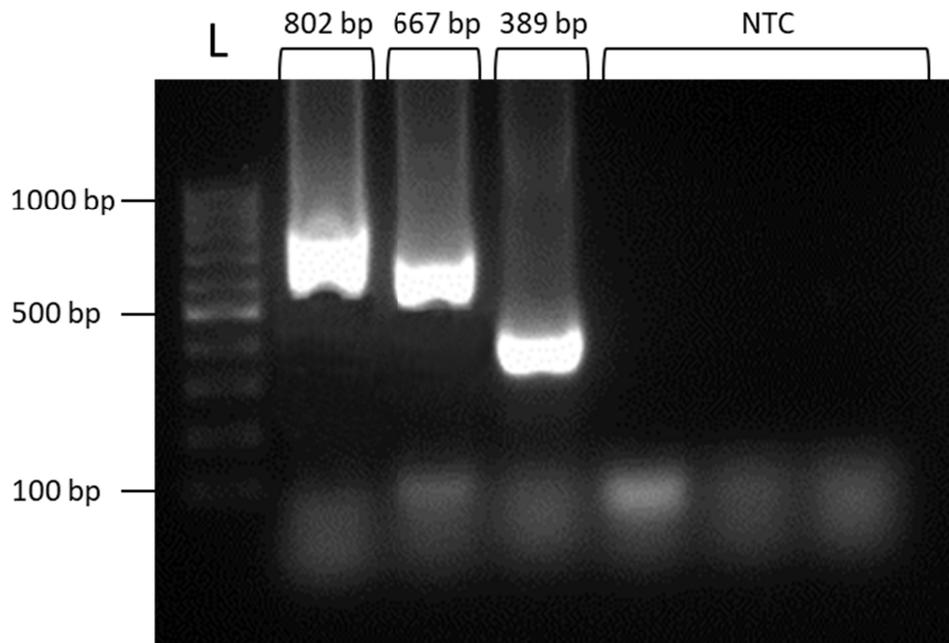


Abb. 15: Exemplarische Gelelektrophorese für den Nachweis der 4977 bp-Deletion $L = 100$ Basenpaar (bp) DNA Ladder. Alle drei Banden zum Nachweis der 4977 bp-Deletion in geschädigter mitochondrialer DNA sind zu erkennen (802 bp mit Primerkombination L5/H4, 667 bp mit L6/H4 und 389 bp mit L6/H2). Die no template control (NTC) aller drei Primerkombinationen zeigten keine Banden.

27 % der VF-Gruppe und 67 % der SR-Gruppe zeigten eine 802 bp, die 667 bp und die 389 bp große Bande. Die 4977 bp-Deletion der mtDNA wurde in insgesamt 47 % aller Proben nachgewiesen. Die Herzohrgewebebeobachten der Patienten mit SR enthielten die 4977 bp-Deletion häufiger als die Proben der Patienten mit VF ($p = 0,028$). Die ROS-Produktion in den getesteten Herzohrgewebebeobachten ist somit nachgewiesen. In Abb. 16 sind beispielhaft die Proben A10 und A11 dargestellt. A10 zeigt eine 802 bp, 667 bp und 389 bp große Bande. A11 zeigt mit allen drei Primer Kombinationen keine Banden.

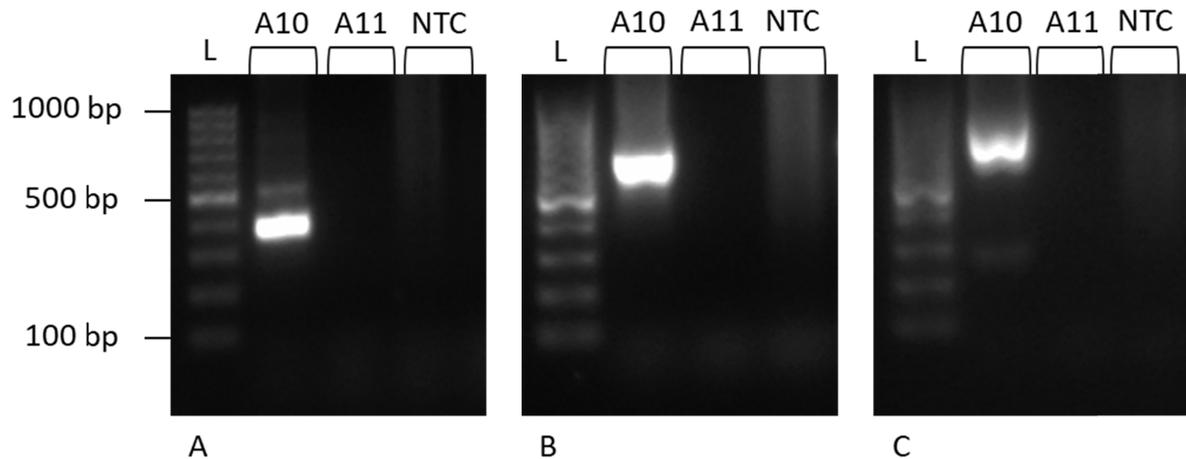


Abb. 16: Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese der Proben A10 und A11 L = 100 Basenpaar (bp) DNA Ladder. Abb. A zeigt eine 389 bp große Bande der Probe A10 (B = Gruppe B) mit der Primerkombination L6/H2. Abb. B zeigt eine 667 bp große Bande der Probe A10 (L6/H4). Abb. C zeigt eine 802 bp große Bande der Probe A10 (L5/H4). Die Probe A11 und die no template control (NTC) aller Primerkombinationen zeigen keine Banden.

4.5 Quantifizierung des relativen mtDNA-Gehaltes mittels RT-PCR

Die durch ROS hervorgerufene Schädigung der mtDNA wurde mithilfe des relativen mtDNA-Gehaltes quantifiziert. Ein verringerter mtDNA-Gehalt kann auf erhöhten oxidativen Stress im Gewebe hinweisen. Es wurde eine durchschnittliche Reinheit der nucDNA von 1,735 erzielt. Der Gehalt der nucDNA schwankte zwischen 5,3 ng/μl und 29,5 ng/μl. Die bereits bestimmte durchschnittliche Reinheit der mtDNA aus der Analyse der PCR betrug 1,45. Der Gehalt der mtDNA schwankte zwischen 3,2 ng/μl und 696 ng/μl. In Abb. 17 sind exemplarisch die Schmelzkurven der mtDNA und der nucDNA dargestellt. Die nucDNA zeigt einen höheren und früheren Schmelzkurvenabfall und Peak des Fluoreszenzsignals als die mtDNA.

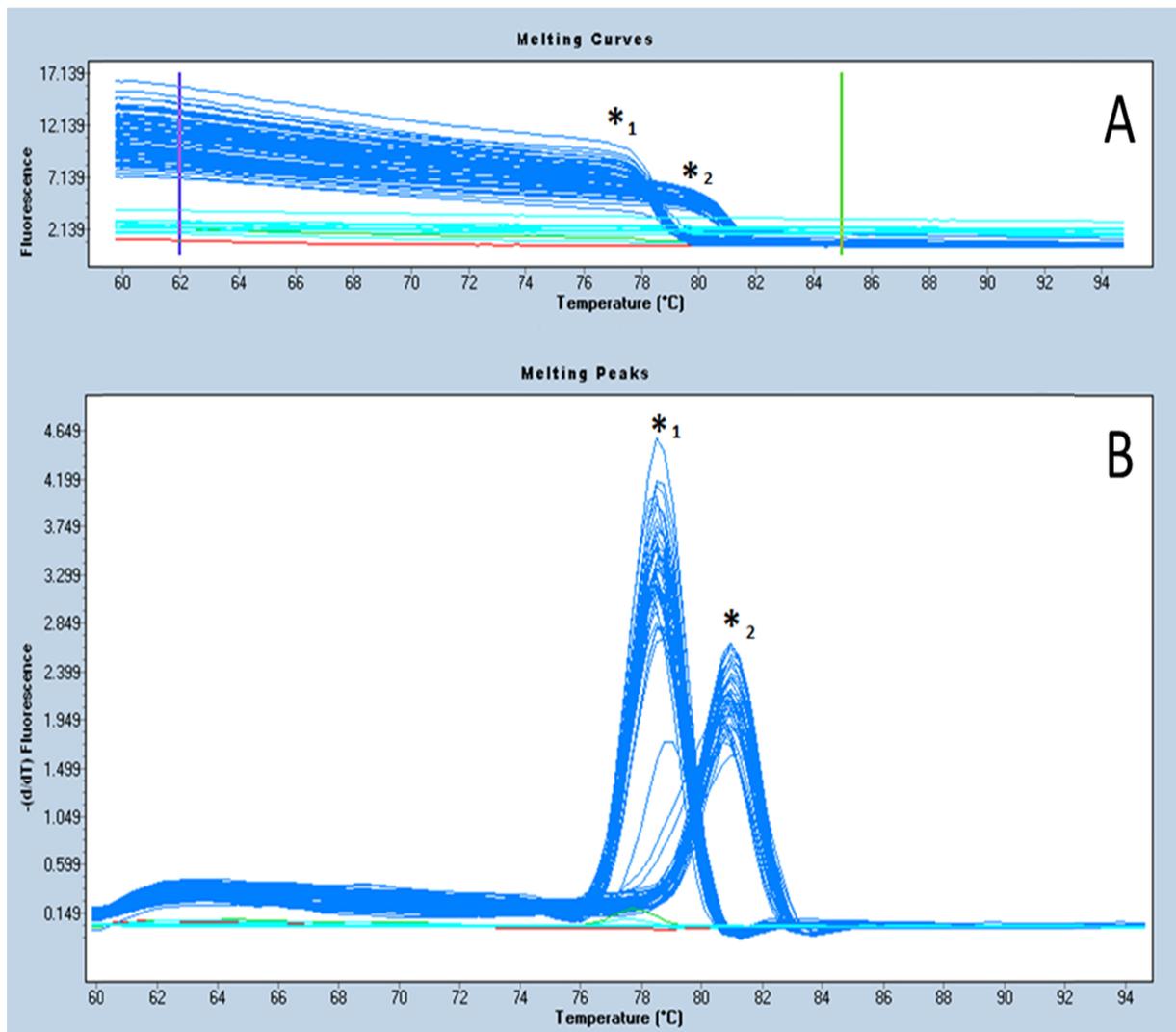


Abb. 17: Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf von mtDNA und nucDNA *₁ = Schmelzkurve der nukleären DNA (nucDNA), *₂ = Schmelzkurve der mitochondrialen DNA (mtDNA). Abb. A zeigt den Schmelzkurvenverlauf der nucDNA bzw. mtDNA, Abb. B zeigt die Höhepunkte (Peaks) der Fluoreszenzsignale der nucDNA und mtDNA

Abb. 18 zeigt den relativen mtDNA-Gehalt der Patienten mit VF und der Patienten mit SR. Die Berechnung des relativen Gehaltes der mtDNA ergab in der VF Gruppe einen MW von 4952 ± 6006 . In der SR Gruppe errechnete sich ein MW von 7434 ± 6771 . Die ROS-Produktion und die Schädigung der mtDNA ist in beiden Patientengruppen miteinander vergleichbar ($p = 0,314$).

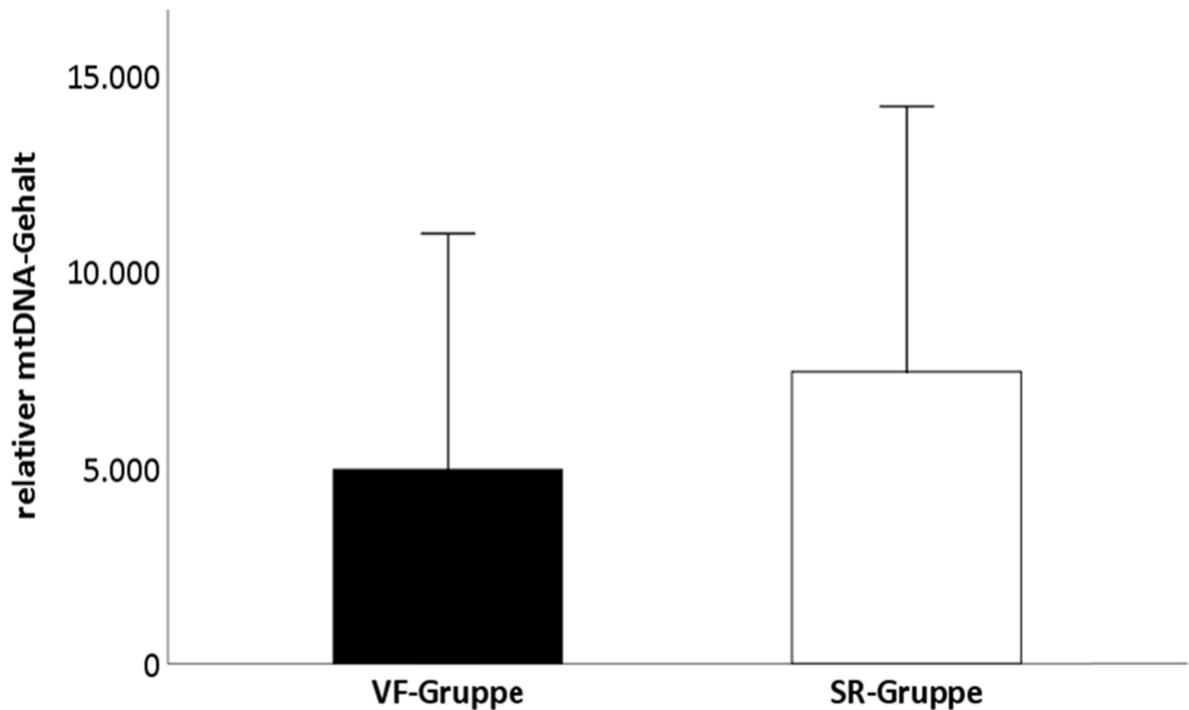


Abb. 18: Relativer mtDNA-Gehalt der Patienten mit VF und SR *mtDNA = mitochondriale DNA, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern*

4.6 Proteinexpressionsmessungen von TRX 1, TXNIP und ITCH mittels Western Blot

4.6.1 TRX1

Über spezifische chemische Reaktionen ist es TRX1 möglich ROS zu reduzieren. Die Analyse der TRX1-Konzentration gibt Hinweise auf die antioxidative Aktivität in den Herzohrgewebeproben. In Abb. 19 ist die gemessene Proteinexpression von TRX1 in Bezug zu GAPDH in arbitrary units (arb. Units = relative Maßeinheit, um Verhältnisse von Größen miteinander zu vergleichen) der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der Gruppe der Patienten mit VF betrug die durchschnittliche TRX1/GAPDH-Expression $0,55 \pm 0,33$ arb. Units, in der Gruppe der Patienten mit SR $0,68 \pm 0,39$ arb. Units. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen ($p = 0,349$).

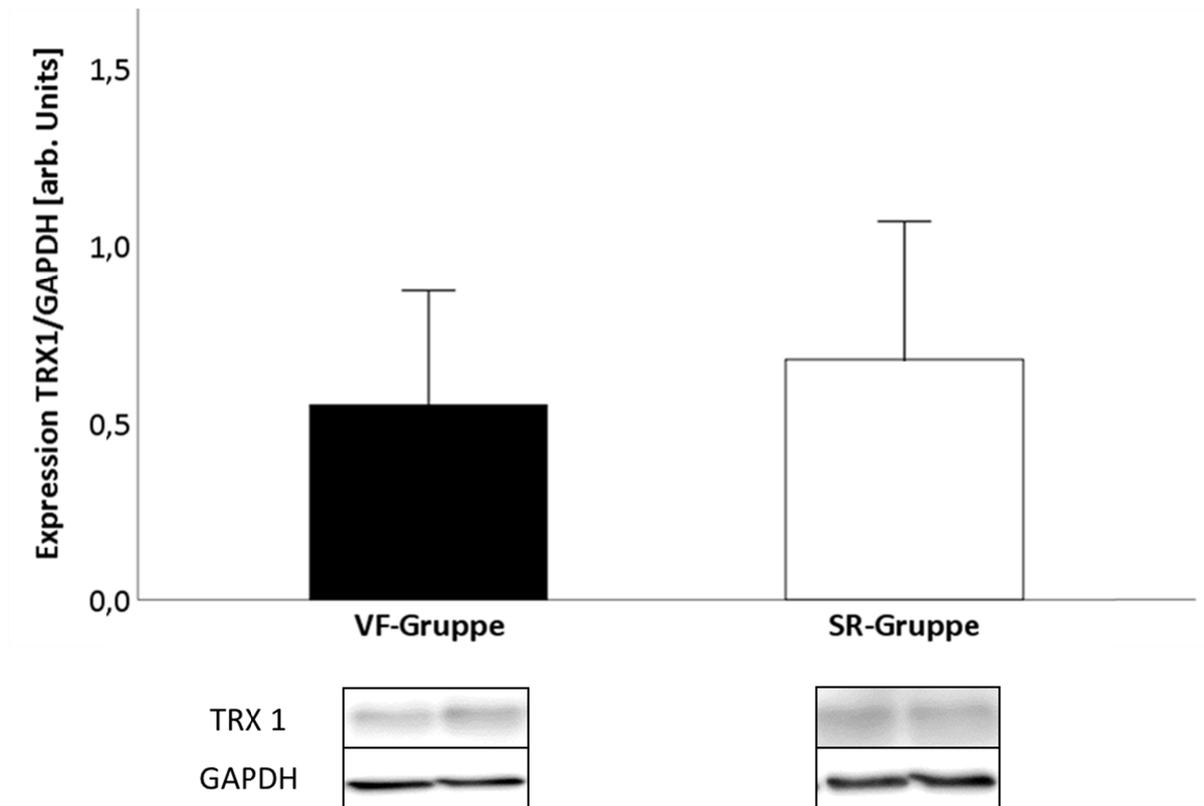


Abb. 19: Proteinexpression TRX 1/GAPDH in arb. Units der Patienten mit VF und SR arb. Units = arbitrary units (relative Maßeinheit, um Verhältnisse von Größen miteinander zu vergleichen), SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern. Unterhalb des Boxplots sind exemplarische Banden der jeweiligen Gruppe von Thioredoxin 1 (TRX 1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dargestellt.

4.6.2 TXNIP

TXNIP hemmt die antioxidative Funktion von TRX1. Die Analyse der Proteinexpression von TXNIP gibt Aufschluss über die Aktivität des Enzyms. In Abb. 20 ist die gemessene Proteinexpression von TXNIP in Bezug zu GAPDH in arb. Units der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der VF-Gruppe betrug die durchschnittliche TXNIP/GAPDH Expression $0,24 \pm 0,11$ arb. Units, in der SR-Gruppe $0,27 \pm 0,16$ arb. Units ($p = 0,568$). Eine vermehrte Aktivität von TXNIP in der VF-Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

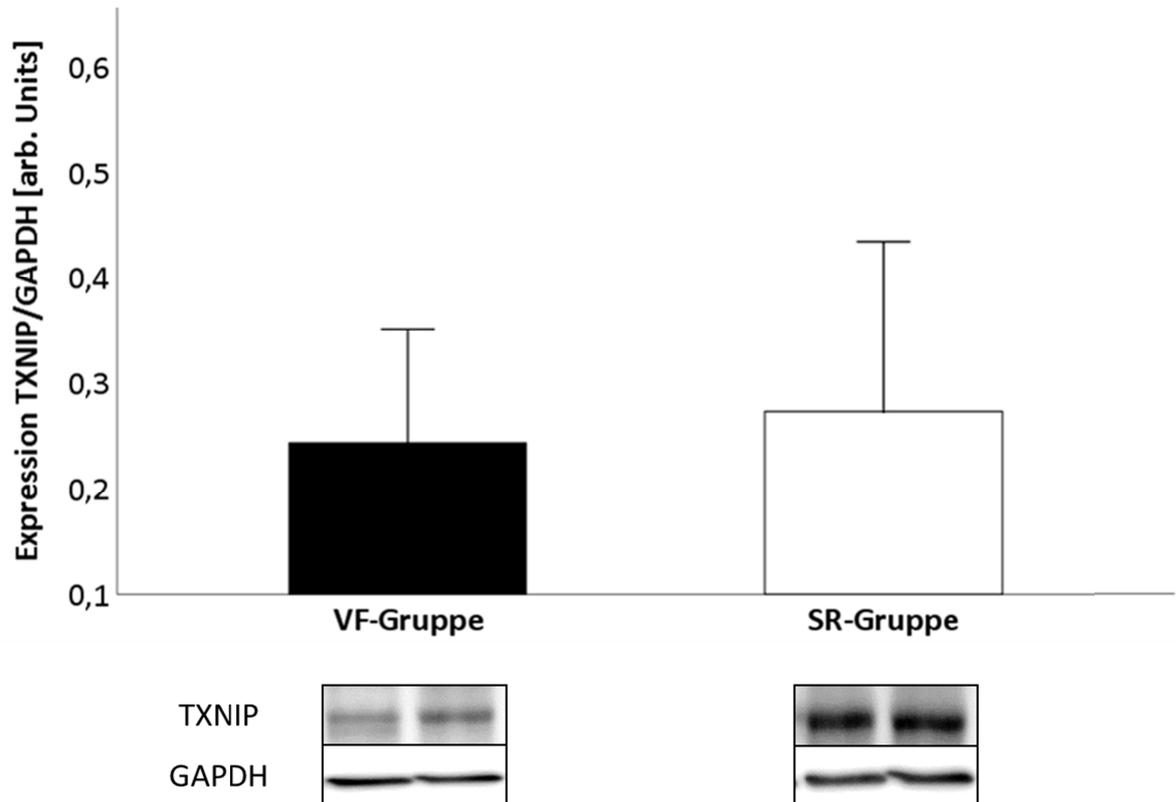


Abb. 20: Proteinexpression der TXNIP/GAPDH bei Patienten mit VF und SR *arb. Units = arbitrary units, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern. Unterhalb des Boxplots sind exemplarisch Banden der jeweiligen Gruppe des Thioredoxin interagierendem Protein (TXNIP) und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dargestellt.*

4.6.3 ITCH

Erhöhter oxidativer Stress im Gewebe kann zu einer Überexpression von ITCH führen. Eine Überexpression von ITCH führt zum Abbau des TXNIP. In Abb. 21 ist die gemessene Proteinexpression von ITCH in Bezug zu GAPDH der Patienten mit VF und der Patienten mit SR dargestellt. In der Gruppe der Patienten mit VF betrug die ITCH/GAPDH-Expression $0,23 \pm 0,24$ arb. Units. In der Gruppe der Patienten mit SR errechnete sich eine ITCH/GAPDH-Expression von $0,25 \pm 0,14$ arb. Units. Beide Patientengruppen sind im Hinblick auf die ITCH-Expression und der oxidativen Stressbelastung miteinander vergleichbar ($p = 0,846$).

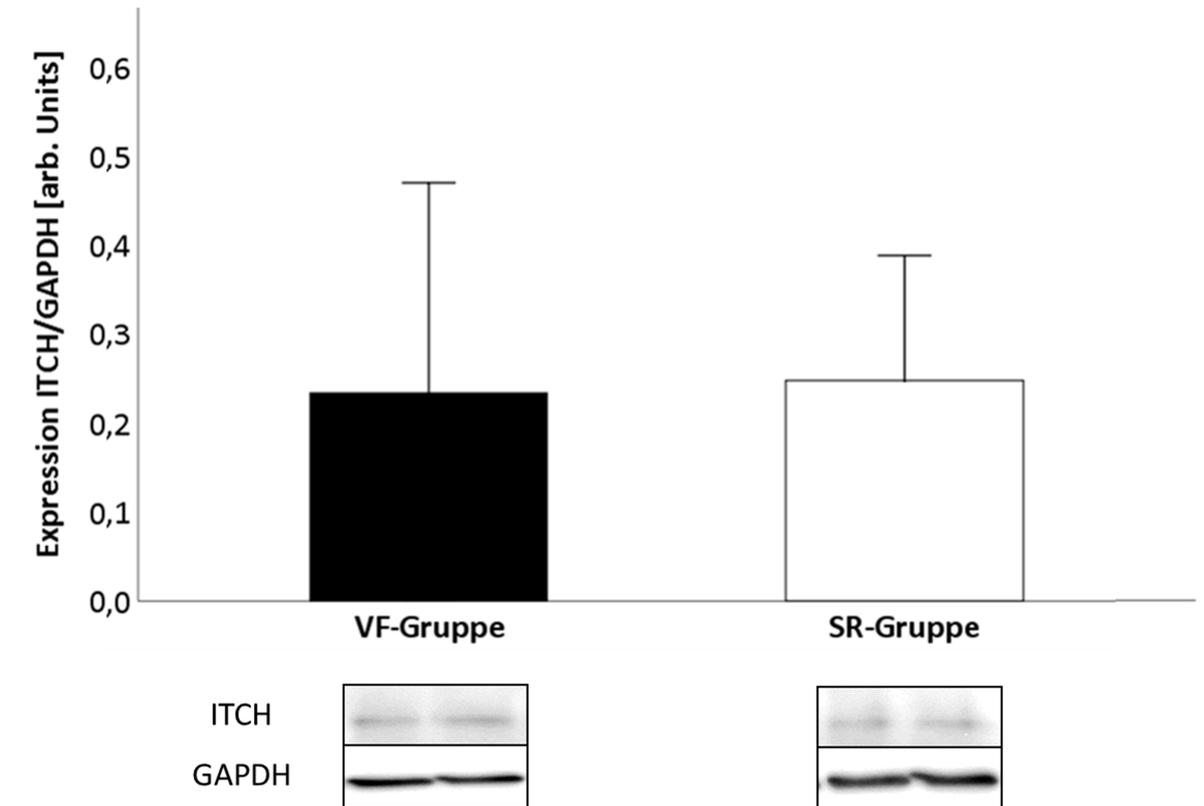


Abb. 21: Proteinexpression der ITCH/GAPDH bei Patienten mit VF und SR

arb. Units = arbitrary units, SR = Sinusrhythmus, VF = Vorhofflimmern. Unterhalb des Boxplots sind exemplarisch Banden der jeweiligen Gruppe von Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase (ITCH) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dargestellt.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die ROS-Produktion sowie ROS-induzierte und -assoziierte zelluläre Mechanismen bei Patienten mit VF im Vergleich zu Patienten mit SR analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob das TRX-System ein neuer Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie darstellen könnte. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind deshalb relevant, da die pathophysiologischen Vorgänge des VF nicht vollständig verstanden sind, und somit eine adäquate Therapie der Erkrankung sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin noch nicht möglich ist.

Es wurden humane linke Herzohrgewebeproben von 15 Patienten mit VF und von 15 Patienten mit SR (Kontrollgruppe) analysiert und miteinander verglichen. Der Anteil der männlichen Patienten in der VF-Gruppe war größer als der Anteil der weiblichen Patienten. Diese Verteilung entspricht vorangegangenen Berichten, dass VF häufiger bei Männern auftritt (BENJAMIN et al. 1994; KIRCHHOF et al. 2017; BUKOWSKA et al. 2008). In der Veterinärmedizin gibt es wenige Aussagen über die Geschlechterverteilung des VF bei den verschiedenen Tierarten. Es ist zum Beispiel bekannt, dass VF bei männlichen Katzen vermehrt auftritt (CÔTE et al. 2004).

Das durchschnittliche Alter der VF- und SR-Patienten war vergleichbar. BENJAMIN et al. (1994) berichteten im Rahmen der Framingham Herz-Studie von einem erhöhtem Risiko mit zunehmendem Alter, an VF zu erkranken. Bei Rennpferden geht man ab 4 Jahren von einem erhöhtem Risiko, an VF zu erkranken, aus (OHMURA et al. 2003). Dies ist im Vergleich zu humanen Patienten erstaunlich früh und könnte in Verbindung mit der hohen körperlichen Leistung stehen, die Rennpferde erbringen müssen. Die körperliche Aktivität, der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten, war nicht in den medizinischen Akten vermerkt, sodass diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden können.

Als kardiovaskuläre Nebenerkrankungen wurden in dieser Arbeit Bluthochdruck, Klappeninsuffizienzen, Klappenstenosen und die koronare Herzkrankheit berücksichtigt. In einer der größten Studien zur Erkrankung des VF, der Framingham Herz-Studie, wurden diese Begleitdiagnosen als Risiken für die Entstehung des VF genannt (BENJAMIN et al. 1994). In der Veterinärmedizin wurde das VF vor allem im Zusammenhang mit einem kongestiven Herzversagen beschrieben. Risikofaktoren wie der Konsum von Tabak spielen in

der Veterinärmedizin keine Rolle. Jedoch ist die passive Aufnahme hiervon, z.B. bei Katzen in Raucherhaushalten, nicht untersucht.

Weder die Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme NOX und XO, noch die antioxidativ wirkenden Enzyme SOD und Katalase unterschieden sich zwischen Patienten mit und ohne VF. Die Messung der Enzymaktivität der NOX erfolgte anhand der Produktion von O_2^- , die in der Lage sind, Cytochrom C zu reduzieren. Entgegen einer Studie am Schweinemodell konnten im humanen Gewebe keine Unterschiede der NOX-Enzymaktivität bei VF im Vergleich zu SR gefunden werden (DUDLEY et al. 2005). Es zeigte sich, dass im humanen Gewebe deutlich höhere NOX-Aktivitäten gemessen werden konnten. Das Auftreten der statistischen Signifikanz der NOX-Aktivität in der Studie von DUDLEY et al. (2005) und das Nichtauftreten in dieser Arbeit lässt sich anhand der Versuchsaufbauten erklären: In dieser Arbeit stammten alle entnommenen Herzohrgewebeproben von Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung. Die Patienten aus der SR-Gruppe wiesen kein VF auf, allerdings war das atriale Gewebe dieser Patienten anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. Herzklappeninsuffizienzen oder Stenosen ausgesetzt, bei denen eine erhöhte ROS-Aktivität bekannt ist (GREENBERG et al. 2021; HAGLER et al. 2013; HEISTADT et al. 2009). Dies könnte die ROS-Produktion der Patienten mit SR und damit die NOX-Aktivität beeinflussen. Die Studie am Tiermodell von DUDLEY et al. (2005) hingegen erfolgte an gesunden Schweinen. Des Weiteren konnte im Tiermodell der Ziege ein signifikanter Anstieg der NOX-Aktivität nach 2 Wochen mit der Erkrankung des VF im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit SR nachgewiesen werden (REILLY et al. 2011). Nach 6 Monaten allerdings war der Anstieg der NOX-Aktivität nicht mehr erkennbar. Dies könnte ein Hinweis auf eine vermehrte ROS-Produktion in der Anfangsphase des VF sein. In derselben Studie wurden bei humanen Patienten mit permanentem VF keine Veränderungen in der Expression der Isoformen NOX 2, NOX 4 und NOX 5 detektiert (REILLY et al. 2011). Eine Unterscheidung der NOX-Isoformen konnte innerhalb dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Die in der vorliegenden Arbeit inkludierten Patienten wiesen alle 3 Kategorien (paroxysmal, persistierend, permanent) des VF auf. Die exakte Dauer der Erkrankung war unbekannt. Dies könnte die ähnliche NOX-Aktivität der Patienten mit VF und SR erklären.

In dieser Arbeit ergab sich im Gegensatz zur Studie von DUDLEY et al. (2005) kein signifikanter Unterschied der XO-Aktivität in den linken Herzohren zwischen der VF- und SR-

Gruppe. Eine vermehrte Aktivität der XO in der Gruppe der VF hätte die Theorie der vermehrten ROS-Produktion in durch VF geschädigtem atrialen Gewebe unterstützt. Anhand der vorliegenden Daten kann diese Theorie jedoch nicht bestätigt werden. DUDLEY et al. (2005) konnten im Tiermodell Schwein mithilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie erhöhte XO-Aktivitäten bei VF nachweisen.

Die Aktivität der antioxidativ wirkenden SOD erfolgte nach dem Prinzip von MARKLUND und MARKLUND (1974), bei dem die, durch die SOD katalysierte, Inhibition der Autooxidation von Pyrogallol photometrisch erfasst wurde. Dieses schnelle und praktikable Verfahren zur Quantifizierung der SOD-Aktivität lässt eine maximale Inhibition der Autooxidation von Pyrogallol von 97,5 % zu (MARKLUND und MARKLUND 1974). Eine Unterscheidung der SOD-Isoformen wurde nicht vorgenommen. DUDLEY et al. (2005) konnten die SOD-Aktivität basierend auf der Inhibition der Rate der XO-vermittelten Reduktion von Cytochrom C analysieren. Die Methode nach SPITZ und OBERLEY (1989) ist ähnlich sensitiv wie die Methode nach MARKLUND und MARKLUND (1974) und basiert auf der Fähigkeit der SOD, O_2^- -abhängige Reaktionen zu hemmen. KIM et al. (2003) konnten mithilfe von radioaktiven komplementären DNA-Microarrays die Genexpression der SOD bei humanen Patienten mit permanentem VF analysieren. Eine genaue Aussage über die Aktivität der SOD konnte jedoch nicht getroffen werden. DUDLEY et al. (2005) konnten im Tiermodell Schwein die SOD-Aktivität basierend auf der Inhibition der Rate der XO-vermittelten Reduktion von Cytochrom C analysieren. Die Aktivität der SR-Gruppe betrug ca. 36 U/mg. Eine statistisch erhöhte Aktivität der SOD in der VF-Gruppe konnte weder in dieser Arbeit noch in der Studie von DUDLEY et al. (2005) nachgewiesen werden. Es konnte aber auch in einer Humanstudie eine vermehrt aktive SOD bei Patienten mit VF nachgewiesen werden (KÖROĞLU et al. 2012). Allerdings verwendete KÖROĞLU et al. (2012) Blutproben für die Analyse der SOD-Aktivität. Dies könnte ein Grund für die abweichenden Ergebnisse der hier untersuchten Herzohrgewebeproben sein.

Die Messung der Katalase-Aktivität war im Vergleich zu den anderen, in dieser Arbeit durchgeführten Enzymaktivitätsmessungen, die am schnellsten durchführbare und praktikabelste Methode. KÖROĞLU et al. (2012) wendeten den Beutler-Test an, um die Katalase-Aktivität zu bestimmen und fanden vergleichbare Katalase-Aktivitäten bei VF-

Patienten und einer Kontrollgruppe. Damit unterstützen die Ergebnisse der Studie aus dem Jahr 2012 die in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Sowohl die ermittelte SOD- als auch die Katalase-Aktivität in unserer Studie geben Hinweise auf eine hohe antioxidative Aktivität in allen gemessenen Proben. Dies könnte ein Hinweis auf die bei allen untersuchten Patienten zugrunde liegenden kardiovaskulären Erkrankungen geben. Nicht nur im Rahmen der Erkrankung des VF besteht antioxidative Aktivität des Gewebes, sondern auch bei einer Vielzahl weiterer kardialer Erkrankungen (PASTORI et al. 2016).

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden der Aktivitätsbestimmung der ROS-produzierenden oder antioxidativ wirkenden Enzyme erlaubten eine zeitsparende und kosteneffiziente Analyse. Es gibt Studien, die Analysen dieser Enzyme per Western Blot durchführen (DUDLEY et al. 2005; GOETTE et al. 2009). Dabei ist zu beachten, dass mittels Western Blot Enzyme oder deren aktive Formen quantifiziert werden können, in der Regel aber nicht die Enzymaktivität bestimmt werden kann. Dieser Punkt muss beim Vergleich verschiedener Studienergebnisse immer in Betracht gezogen werden. Des Weiteren erfolgt nach einem Western Blot eine z.T. subjektive Bandenauswertung, die der hohen Genauigkeit der photometrischen Absorptionsmessung gegenüber steht.

Neben der Quantifizierung von ROS-produzierenden und ROS-abbauenden Enzymen kann der Nachweis der 4977 bp-Deletion in der mitochondrialen DNA in Herzohrproben Aufschluss darüber geben, wie hoch der Grad der Schädigung im Herzohr bzw. Vorhof ist. Das Auftreten der 4977 bp-Deletion in der mitochondrialen DNA ist ein organ- und gewebeübergreifender Marker für einen voranschreitenden Alterungsprozess und eine progressive Organdysfunktion (LAI et al. 2003). In der vorliegenden Studie war die 4977 bp-Deletion seltener bei VF-Patienten als bei SR-Patienten nachweisbar. Das häufigere Auftreten der 4977 bp-Deletion in der SR-Gruppe dieser Arbeit könnte dem Umstand der im Allgemeinen in die Studie inkludierten kranken Patienten geschuldet sein. Bei den Patienten mit SR wurden Aorten-, Mitral- und Triskuspidalklappen-Insuffizienzen nachgewiesen. Außerdem wiesen einige Patienten der SR-Gruppe Aorten- und Mitralklappenstenosen auf, und fast alle Patienten litten an Bluthochdruck. In Studien, die keinen Unterschied im Anteil der Patienten mit 4977 bp-Deletion feststellen konnten, waren entweder keine genaueren

Angaben bezüglich der Vorerkrankungen der SR-Patienten gemacht worden (LIN et al. 2003), oder es zeigte sich, dass Patienten der VF-Gruppe vermehrt an Bluthochdruck litten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine ausbalancierte Verteilung von Nebendiagnosen, wie sie in der vorliegenden Studie vorlag, einen wesentlichen Einfluss auf Studienergebnisse haben kann. Darüber ist beim Vergleich von Messwerten aus verschiedenen Studien zu beachten, in welchem Gewebe die Messungen vorgenommen wurden. Bei Studien zum VF werden viele Untersuchungen im Blut der Patienten durchgeführt. Einige Studien, so wie die Vorliegende, untersuchten Parameter im Herzgewebe der Patienten. In Bezug auf die Analyse der 4977 bp-Deletion können Messungen in verschiedenen Geweben (Blut oder Herzgewebe) sehr deutliche Unterschiede ergeben. Daher sind die Analysen der mitochondrialen 4977 bp-Deletion in Blutproben von VF-Patienten durch LEE et al. (2015) nicht mit den Analysen im Herzohrgewebe vergleichbar.

Der relative mtDNA-Gehalt wurde nach GONZALEZ-HUNT et al. (2016) bestimmt. Die Primer der nucDNA (β 2-Microglobulin) und der mtDNA (tRNA_Leucin) waren spezifisch für das jeweilige Genom und konnten, wie von GONZALEZ-HUNT et al. (2016) angegeben, verwendet werden. LIN et al. (2003) quantifizierten den Gehalt an mtDNA relativ zur nucDNA durch eine Slot-Blot-Hybridisierung. Der relative Gehalt an mtDNA wurde hierbei als Ratio aus der mtDNA und nucDNA angegeben. Die semiquantitative Auswertung der Slot-Blot Hybridisierung zeigt die erhöhte Fehleranfälligkeit der Methode. Die Berechnung des relativen mtDNA-Gehaltes nach GONZALEZ-HUNT et al. (2016) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der VF- und der SR-Gruppe. LIN et al. (2003) konnten mithilfe einer Slot-Blot Hybridisierung den relativen mtDNA-Gehalt als Ratio aus der mtDNA/nucDNA in beiden Gruppen analysieren. Dabei stellten sie einen statistisch signifikant höheren mtDNA-Gehalt in der VF-Gruppe im Vergleich zur SR-Gruppe fest. ZHANG et al. (2017) konnten anhand von peripheren Blutproben von humanen Patienten mit postoperativem VF einen erhöhten relativen mtDNA-Gehalt im Vergleich zu Proben von Patienten ohne postoperatives VF feststellen. Die Wahl der Methode, der Proben, sowie die Auswahl der inkludierten Patienten in die Studien könnten eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liefern. Bei den Proben in dieser Studie handelte es sich um linke Herzohren, während sich LIN et al. (2003) mit rechten Herzohren und ZHANG et al. (2017) mit peripheren Blutproben beschäftigten. Über die in die Studie von LIN et al. (2003)

inkludierten Patienten sind keine Daten bezüglich Vorerkrankungen und Behandlungen mit Antiarrhythmika bekannt. Beide Faktoren können Auswirkungen auf den Gehalt der mtDNA haben. Die in die Studie von ZHANG et al. (2017) inkludierten Patienten sind alle entweder mit β -Blockern, ACE-Hemmern oder Statinen behandelt. Die Patienten in dieser Arbeit wurden nicht mit Antiarrhythmika vorbehandelt. Die Studie von ZHANG et al. (2017) ist aufgrund der großen Anzahl von 384 Patienten in der SR-Gruppe und 101 Patienten in der VF-Gruppe als sehr aussagekräftig zu bewerten.

Die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α wurde als indirekter Marker für hypoxischen Stress quantifiziert. Je ausgeprägter hypoxischer Stress ist, umso höher ist die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α . VF-Patienten zeigten keine erhöhten HIF-1 α -Konzentrationen im Herzhohlgewebe, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme hypoxischer Stress keine bedeutende Rolle gespielt hat. Neben der Bestimmung des Gesamtgehaltes an HIF-1 α in Gewebeproben, wie es in dieser Studie vorgenommen wurde, gibt es die Möglichkeit, die zytosolischen und nukleären Konzentrationen von HIF-1 α zu bestimmen. Da sich HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert und vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor agiert, kann eine Bestimmung von nukleärem HIF-1 α zusätzliche Aussagen über die Aktivierung dieses Moleküls geben. Eine solche Analyse wurde von GRAMLEY et al. (2010) immunhistochemisch durchgeführt, und die Gruppe konnte zeigen, dass VF-Patienten im Vergleich zu SR-Patienten eine höhere zytosolische HIF-1 α -Expression in rechten Herzohren aufwiesen. Allerdings konnte kein Unterschied in der nukleären HIF-1 α -Konzentration ermittelt werden. Demzufolge konnte auch die Arbeit von GRAMLEY et al. (2010) nicht abschließend nachweisen, dass hypoxischer Stress in VF-Patienten eine relevante Rolle spielt. Die Quantifizierung der HIF-1 α -Expression in der Arbeit von GRAMLEY et al. (2010) bezieht sich allerdings auf den Anteil HIF-1 α -positiv gefärbter Zellen in histologischen Gewebeschnitten und kann von der tatsächlichen, absoluten HIF-1 α -Menge abweichen.

Die zytosolische Freisetzung des Apoptosefaktors AIF und von Cytochrom C wurden ermittelt, um das Ausmaß des zellulären und mitochondrialen Stresses und mögliche proapoptische Prozesse in den Zellen beurteilen zu können. Sowohl AIF als auch Cytochrom C sind bifunktionale Proteine, die eine Oxidoreduktase-Funktion besitzen und darüber hinaus Funktionen in apoptotischen Prozessen übernehmen (GRANVILLE et al.

2001). Beide Moleküle werden bei mitochondrialem Stress von den Mitochondrien freigesetzt. AIF wird im Zuge der Caspase-unabhängigen Apoptose in den Zellkern transloziert und induziert dort eine Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (KAR et al. 2010; LORENZO et al. 1999; SUSIN et al. 1999). Cytochrom C, ein Protein der mitochondrialen Atmungskette (GREEN und REED 1998), bildet im Zuge der Caspase-abhängigen Apoptose, zusammen mit dem Apaf-1, dATP und der Procaspase-9, das Apoptosom im Zytosol der Zelle (KAR et al. 2010). Das Apoptosom initiiert die Autokatalyse der Procaspase-9 zur Caspase-9 und aktiviert weitere Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3). Dies veranlasst die Apoptose der Zelle (LÖFFLER et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit war die zytosolische Freisetzung von AIF und Cytochrom C bei VF- und SR-Patienten vergleichbar. Daher kann geschlussfolgert werden, dass der zelluläre Stress, der mitochondrialen Stress und damit apoptotische Prozesse in Gang setzen kann, in beiden Patientengruppen gleich hoch war. In einer Literaturrecherche, im Rahmen dieser Arbeit, konnten keine Studien gefunden werden, die den Apoptosemarker AIF und Cytochrom C im Zusammenhang mit der Erkrankung des VF analysierten. Als vergleichbare Literatur wurden Studien herangezogen, die sich mit der Protease Calpain und Caspase-3 im Rahmen des VF beschäftigen (BRUNDEL et al. 2002; GOETTE et al. 2002; AIMÉ-SEMPÉ et al. 1999). Eine Überexpression von Calpain kann die Freisetzung von proapoptotische Faktoren wie z.B. AIF und Cytochrom C initiieren. Die Autoren beider Studien konnten eine signifikant erhöhte Expression bzw. Aktivität der Protease Calpain in rechten Herzohren von humanen Patienten mit VF im Vergleich zu rechten Herzohren von Patienten mit SR nachweisen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sowohl pro- als auch aktivierte Formen der Caspase-3 in rechten Herzohren von VF-Patienten im Vergleich zur einer Kontrollgruppe stärker exprimiert waren (AIMÉ-SEMPÉ et al. 1999). Die Ergebnisse dieser drei Studien stehen zumindest teilweise im Gegensatz zu den, in dieser Arbeit, erzielten Ergebnisse.

Da oxidativer Stress als einer der wesentlichen Promotoren für VF gilt (SOVARI et al. 2012), wurde das TRX-System, das in der antioxidativen Abwehr der Zelle eine wichtige Rolle spielt, untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die TRX-System-Komponenten TRX1, TXNIP und ITCH untersucht. Bei einem gestörten TRX-System kommt es zur einer Reduktion der Proteinexpression von ITCH und TRX1 sowie einer gesteigerten Proteinexpression von TXNIP (NEIDHARDT et al. 2019). Keine der untersuchten Komponenten des TRX-Systems war

bei einem Vergleich zwischen VF- und SR-Patienten verändert. Diese Daten sind vergleichbar mit einer Studie von KISHIMOTO et al. (2001), in der die TRX-Konzentration im Humanserum von DCM-Patienten mit und ohne VF mithilfe eines ELISA analysiert wurden. Weder die TRX1-Analyse, noch die Analyse von TXNIP und ITCH ergaben statistisch signifikante Unterschiede zwischen der VF- und SR-Gruppe. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das TRX-System in VF-Patienten nicht gestört bzw. wesentlich verändert ist und demzufolge nicht von veränderten antioxidativen Prozessen im Herzohrgewebe von VF-Patienten ausgegangen werden kann. Angemerkt werden soll an dieser Stelle die Studie von AOTA et al. (1996), in der im Tiermodell Ratte das Potential von TRX1, Reperfusion-induzierte Arrhythmien zu hemmen, nachgewiesen wurden. Die TRX-1-Konzentration im Gewebe der Ratten war jedoch künstlich zugeführt worden, sodass keine Aussage über die Expression von TRX1 bei Reperfusion-induzierten Arrhythmien getroffen werden kann.

Folgende Limitationen sind für diese Arbeit zu nennen: Erstens ist die untersuchte Gruppengröße zunächst ausreichend. Für eine Absicherung der Ergebnisse und eine zuverlässigere statistische Aussage könnte eine höhere Patientenzahl von Vorteil sein. Außerdem fanden Faktoren wie der Body-Mass-Index oder nicht-kardiovaskuläre Erkrankungen, die einen Einfluss auf die Entstehung von VF haben können, in der vorliegenden Studie keine Berücksichtigung. Zweitens wurden linke Herzohren für die Analysen verwendet. Obwohl es für diese Studie geplant war, sowohl linke als auch rechte Herzohren zu analysieren und miteinander zu vergleichen, konnte keine ausreichend große Zahl an Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die einer Entnahme beider Herzohren zustimmten. Der Vergleich linker und rechter Herzohren ist aus wissenschaftlicher Sicht sehr interessant, allerdings bedarf dies der ausdrücklichen Zustimmung der Patienten. In diesem Zusammenhang kann auch die Untersuchung von Herzohrgewebe gesunder Probanden angesprochen werden, die wissenschaftlich zwar denkbar ist, aus ethischen Gründen aber nicht in Betracht gezogen werden kann. Drittens wurden in diese Studie Patienten mit paroxysmale, persistierendem und permanentem VF eingeschlossen. Eine Subanalyse der Untersuchungen hinsichtlich der verschiedenen Formen des VFs wäre von Interesse, da eine länger anhaltende Schädigung des Herzohrgewebes Auswirkungen eine höhere ROS-Bildung und ROS-induzierte Effekte zur Folge haben könnte. Aufgrund der geringen Fallzahl von Patienten mit permanentem und persistierendem VF

(beide < 5) konnte eine solche Subanalyse nicht durchgeführt werden. Für die Veterinärmedizin könnte es außerdem interessant sein, die reversible paroxysmale Form des VF zu untersuchen, da diese für die Spezies Pferd berichtet wurde (AMADA und KURITA 1975). Viertens wurden keine direkten sondern nur indirekte ROS-Messungen durchgeführt. Eine direkte Messung von ROS würde bezüglich der Bewertung des Vorhandenseins von ROS mehr Sicherheit geben.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit kein Unterschied von ROS-induzierten Effekten sowie der mitochondrialen Schädigung zwischen Patienten mit und ohne VF festgestellt werden. Auch eine Veränderung der Expression von Komponenten des TRX-Systems war nicht nachweisbar. Daher scheint die Entwicklung neuer Therapien mit ROS-Scavengern nicht sehr vielversprechend, um die durch VF hervorgerufenen zellulären Veränderungen zu behandeln. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag auf der Suche nach einer adäquaten Therapie der Erkrankung sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin, denn es konnte gezeigt werden, dass ROS-induzierte und -assoziierte zelluläre Mechanismen vermutlich keine große Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankung spielen.

6 Zusammenfassung

Dorina Schwach

Untersuchung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der mitochondrialen Integrität bei Vorhofflimmern

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig in Kooperation mit dem Herzzentrum Leipzig der Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2022

74 Seiten, 21 Abbildungen, 21 Tabellen, 140 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Vorhofflimmern, ROS, NOX, Apoptose, mtDNA, Thioredoxin System

Einleitung: Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin ist das Vorhofflimmern (VF) eine der am häufigsten vorkommenden, klinisch signifikanten Arrhythmien. Die Folgen und Auswirkungen der Erkrankung sind vielfältig und für die Behandlung entscheidend. Die auf molekularbiologischer Ebene ablaufenden Mechanismen sind trotz jahrelanger Forschung noch weitgehend unbekannt. Studien an menschlichem Gewebe sind selten. Vergleichende Aspekte zwischen Tier und Mensch sind in der Literatur nicht beschrieben.

Ziel der Untersuchung: Ziel der Arbeit war es, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie ROS-induzierte und -assoziierte zelluläre Mechanismen bei Patienten mit VF zu analysieren. ROS werden sowohl während des physiologischen oxidativen Metabolismus der Mitochondrien als auch in zellulärer Reaktion auf pathogene Agenzien gebildet. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Thioredoxin-System (TRX-System), das als ROS-Scavenger fungiert, ein neuer Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie sein könnte. Bereits vorhandene tierexperimentelle und humane Studien zum atrialen Remodeling (AR) und VF wurden besonders berücksichtigt und hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit, sowie Vergleichbarkeit zwischen Tier und Mensch diskutiert.

Material und Methoden: Im Rahmen der Arbeit wurden 30 linke Herzohrgewebeproben von humanen Patienten mit VF (n = 15) und von Patienten mit Sinusrhythmus (SR) (n = 15) untersucht. Die Enzymaktivitäten der NADPH-Oxidase (NOX), Xanthin-Oxidase (XO), Superoxiddismutase (SOD) und Katalase wurden mithilfe von photometrischen

Absorptionsmessungen und die mitochondriale Schädigung anhand des Auftretens einer 4977 Basenpaardeletion (bp-Deletion) untersucht. Die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) und von Cytochrom C ins Zytosol sowie die Veränderungen des TRX-Systems wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blot analysiert. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen wurde mithilfe des T-Tests bei unabhängigen Stichproben analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ definiert. Der Levene-Test wurde angewandt, um Varianzgleichheiten zu prüfen.

Ergebnisse: Der Anteil der männlichen Patienten in der VF-Gruppe war größer als der Anteil der weiblichen Patienten (11 von 15 Patienten). Das durchschnittliche Alter der VF- und SR-Patienten war vergleichbar (65,9 Jahre). Weder die Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme NOX und XO, noch die antioxidativ wirkenden Enzyme SOD und Katalase unterschieden sich signifikant zwischen Patienten mit und ohne VF. Die Literaturrecherche ergab insbesondere in von VF geschädigten Herzohren vom Schwein erhöhte Enzymaktivitäten der NOX und XO. Die zytosolische Freisetzung von AIF und Cytochrom C bei VF- und SR-Patienten waren ebenso wie das TRX-System vergleichbar. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den VF- und SR-Patienten konnte nicht nachgewiesen werden. Die in dieser Studie untersuchte 4977 bp-Deletion war seltener bei VF-Patienten als bei SR-Patienten nachweisbar ($p = 0,028$). Das statistisch signifikante, häufigere Auftreten der 4977 bp-Deletion in der SR-Gruppe könnte dem Umstand der im Allgemeinen in die Studie inkludierten kranken Patienten geschuldet sein.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag auf der Suche nach einer adäquaten Therapie der Erkrankung des VF sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin, denn es konnte gezeigt werden, dass ROS-induzierte und -assoziierte zelluläre Mechanismen vermutlich keine große Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankung spielen. Nichtsdestotrotz sind sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin weitere Studien nötig, um eine adäquate Behandlung des VF zu gewährleisten und die Lebensqualität Betroffener zu verbessern.

7 Summary

Dorina Schwach

Examination of reactive oxygen species production and mitochondrial integrity in atrial fibrillation

Veterinary-Physiological-Chemical Institute, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig in cooperation with the Heart Center Leipzig, University of Leipzig

Submitted in January 2022

74 pages, 21 figures, 21 tables, 140 references

Keywords: Atrial fibrillation, ROS, NOX, Apoptosis, mtDNA, Thioredoxin System

Introduction: In both human and veterinary medicine, atrial fibrillation (AF) is one of the most common clinically significant arrhythmias. The consequences and effects of the disease are varied and crucial for therapy. The molecular-biological mechanisms are still largely unknown despite years of research. Studies on human tissue are rare. Comparative aspects between animals and humans are not described in the literature.

Aim of study: The aim of the work was to analyze the Production of reactive oxygen species (ROS) as well as ROS-induced and –associated cellular mechanisms in patients with AF. ROS are formed both during the physiological oxidative metabolism of the mitochondria and in cellular response to pathogenic agents. In addition, it should be investigated whether the Thioredoxin-System (TRX-System), which acts as a ROS-Scavenger, could be a new starting point for drug therapy. Existing animal and human studies on atrial remodeling (AR) and AF were particularly considered and discussed with regard to their transferability and comparability between animals and humans.

Material and methods: As part of the work, 30 left atrial appendage tissue samples from human patients with AF (n = 15) and from patients with sinus rhythm (SR) (n = 15) were examined. The enzyme activities of NADPH oxidase (NOX), xanthine oxidase (XO), superoxide dismutase (SOD) and catalase were investigated using photometric absorption measurements and the mitochondrial damage using the occurrence of a 4977 base pair deletion (bp deletion). The release of the apoptosis-inducing factor (AIF) and of cytochrome

C into the cytosol, as well as the changes in the TRX system, were analyzed by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western blot. The significance of differences between the experimental groups was analyzed using the T-test in independent samples. A p-value of $\leq 0,05$ was defined as the significance level. The Levene test was used to check for equality of variance.

Results: The proportion of male patients in the AF group was greater than the proportion of female patients (11 out of 15 patients). The mean ages of the AF and SR patients were comparable (65,9 years). Neither the activity of the ROS-producing enzymes NOX and XO, nor the antioxidant enzymes SOD and catalase, differed significant between patients with and without AF. The literature search revealed increased NOX and XO enzyme activities, particularly in porcine auricles damaged by AF. The cytosolic release of AIF and cytochrome C in VF and SR patients, as well as the TRX system, were comparable. A statistically significant difference between the AF and SR patients could not be demonstrated. The 4977 bp deletion investigated in this study was detectable less frequently in AF patients than in SR patients ($p = 0,028$). The statistically significant, more frequent occurrence of the 4977 bp deletion in the SR group could be due to the fact that the patients generally included in the study were ill.

Conclusion: The results of this work are an important contribution in search for an adequate therapy of the disease of AF in veterinary medicine as well as in human medicine, because it could be shown that ROS-induced and -associated cellular mechanisms probably do not play a major role in the pathophysiology of this disease. Nonetheless, further studies are needed in both human and veterinary medicine to ensure adequate treatment of VF and improve the quality of life of the affected.

8 Literaturverzeichnis

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak in Heart Failure. *Circ. Res.* 2005;1314–22.

Aimé-Sempé C, Folliguet T, Rücker-Martin C, Krajewska M, Krajewski S, Heimbürger M, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1577–86.

Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2002;54:230–46.

Amada A, Kurita H. Five Cases of Paroxysmal Atrial Fibrillation in the Racehorse. *Exp Rep Equine Hlth Lab.* 1975;100:89–100.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290:457–65.

Anzai K, Ogawa K, Kuniyasu A, Ozawa T, Yamamoto H, Nakayama H. Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:938–42.

Aota M, Matsuda K, Isowa N, Wada H, Yodoi J, Ban T. Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27:727–32.

Arrigo M, Bettex D, Rudiger A. Behandlung von Vorhofflimmern in der Intensiv- und Notfallmedizin. *Medizinische Klin - Intensivmed und Notfallmedizin.* 2015;110:614–20.

Ausma J, Wijffels M, Thoné F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation.* 1997;96:3157–63.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971;44:276–87.

Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245–313.

Benjamin E J, Levy D, Vaziri S M, D'Agostino R B, Belanger A J, Wolf P A. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort The Framingham Heart Study. *Jama*. 1994;271:840-844.

Berezewicz A, Horackova M. Alterations in electrical and contractile behavior of isolated cardiomyocytes by hydrogen peroxide: possible ionic mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:899-918.

Boldt A. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart*. 2004;90:400-5.

Bosch RF, Seipel L, Kühlkamp V. Remodeling bei Vorhofflimmern. *Herz*. 2002;27:312-21.

Bosch, R; Zeng, X; Grammer, J B; Popovic, K; Mewis, C; Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44:121-31.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Bruce AF, Rothery S, Dupont E, Severs NJ. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc Res*. 2008;77:757-65.

Brundel BJJM, Ausma J, Van Gelder IC, Van Der Want JJJ, Van Gilst WH, Crijns HJGM, et al. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54:380-9.

Bukowska A, Lendeckel U, Bode-Böger SM, Goette A. Physiologic and Pathophysiologic Role of Calpain: Implications for the Occurrence of Atrial Fibrillation. *Cardiovasc Ther*. 2012;30:115-27.

Bukowska A, Schild L, Keilhoff G, Hirte D, Neumann M, Gardemann A, et al. Mitochondrial Dysfunction and Redox Signaling in Atrial Tachyarrhythmia. *Exp Biol Med*. 2008;233:558-74.

Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, et al. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res*. 2009;105:1213-22.

Cai H, Harrison DG. The Role of Oxidant Stress. *Blood Press*. 2000;840–4.

Calvert CA, Pickus CW, Jacobs GJ, Brown J. Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*. 1997;11:323–6.

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet*. 1992;2:324–9.

Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. *JAMA*. 1991;266:1812–6.

Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:6927–33.

Côté E, Harpster N, Laste N, MacDonald K, Kittleson M, Bond B, Barrett K, Ettinger S, Atkins C. Atrial fibrillation in cats: 50 cases (1979–2002). *J Am Vet Med Assoc*. 2004;225:256–260

Cui A, Ye Q, Sarria R, Nakamura S, Guzman J, Costabel U. N-acetylcysteine inhibits TNF- α , sTNFR , and TGF- β 1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro. *Official Journal of WASOG* 2009;147–54.

Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, et al. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation*. 1996;94:1600–6.

Daoud EG, Marcovitz P, Knight BP, Goyal R, Man KC, Strickberger S a, et al. Short-term effect of atrial fibrillation on atrial contractile function in humans. *Circulation*. 1999;99:3024–7.

de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Wilde AA, Coronel R, Becker AE, et al. Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. *Circulation*. 1988;77:589–606.

Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011;51:1289–301.

Domanjko-Petrič A, Stabej P, Žemva A, Dilated cardiomyopathy in the Dobermann dog: survival, causes of death and a pedigree review in a related line. *J Vet Cardiol*. 2002;4:17-24.

Dong Z, Lin C, Liu Y, Jin H, Wu H, Li Z, et al. Upregulation of sestrins protect atriums against oxidative damage and fibrosis in human and experimental atrial fibrillation. *Sci Rep*. 2017;7:1–13.

Dudley SC, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: Role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 2005;112:1266–73.

Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Häggström J. Proposed Guidelines for the Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Vet Cardiol*. 2003;5:7–19.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8:871–4.

Epe B, Mützel P, Adam W. DNA damage by oxygen radicals and excited state species: A comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem Biol Interact*. 1988;67:149–65.

Erickson R, Langel-Peveri P, Traynor- A. Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. *J Biol Chem*. 1999;274:22243–50.

Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*. 1995 Mar 13;155:469–73.

Gasparova I, Kubatka P, Opatrilova R, Caprnda M, Filipova S, Rodrigo L, et al. Perspectives and challenges of antioxidant therapy for atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2017;390:1–14.

Gehlen H. Vorhofflimmern beim Warmblutpferd - Echokardiographie , Therapie , Prognose und Verlauf in 72 Fällen. *Pferdeheilkunde* 2002;18:530–6.

Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby J V., et al. Prevalence of Diagnosed Atrial Fibrillation in Adults. *Jama*. 2001;285:2370.

Goette A, Arndt M, Röcken C, Staack T, Bechtloff R, Reinhold D, et al. Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;283:H264–72. A

Goette A, Bukowska A, Dobrev D, Pfeiffenberger J, Morawietz H, Strugala D, et al. Acute atrial tachyarrhythmia induces angiotensin II type 1 receptor-mediated oxidative stress and microvascular flow abnormalities in the ventricles. *Eur Heart J*. 2009;30:1411–20.

Goette A, Hammwöhner M, Bukowska A. Upstream-Therapie bei Vorhofflimmern. *Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie*. 2014;25:33–40.

Goette A, Lendeckel U. Molekularbiologie der Herzvorhöfe. *Z Kardiologie*. 2004;877:864–77.

Goette A, Lendeckel U. Morphologisches remodeling bei Vorhofflimmern. *Herz*. 2006;31:101–7.

Goette A, Lendeckel U. Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther*. 2004;102:17–36.

Goette A, Staack T, Röcken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1669–77.

Gonzalez-Hunt CP, Rooney JP, Ryde IT, Anbalagan C, Joglekar R, Meyer JN. PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Curr Protoc Toxicol*. 2016;67:20.11.1-20.11.25.

Gossiau A, Rensing L. Oxidativer stress, altersabhängige zellschädigungen und antioxidative mechanismen. *Z Gerontol Geriatr*. 2002;35:139–50.

Gramley F, Lorenzen J, Jedamzik B, Gatter K, Koellensperger E, Munzel T, et al. Atrial fibrillation is associated with cardiac hypoxia. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:102–11.

Granville DJ, Cassidy BA, Ruehlmann DO, Choy JC, Brenner C, Kroemer G et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol*. 2001;159(3):305-11.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309–12.

Greenberg HZE, Zhao G, Shah AM, Zhang M. Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications. *Cardiovasc Res*. 2021; cvab142, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab142>.

Greijer AE, Van Der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004;57:1009–14.

Hagler MA, Hadley TM, Zhang H, Mehra K, Roos CM, Schaff HV et al. TGF- β signalling and reactive oxygen species drive fibrosis and matrix remodelling in myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Res*. 2013;99:175-84.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1147–50. Avail

Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009;73:201-207.

Herold G, *Innere Medizin*. Köln: Herold; 2017

Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411:366–74.

Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative real-time-pcr (qrt-pcr). Methoden und anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit*. 2007;37:120–6.

Hwang J, Suh HW, Jeon YH o., Hwang E, Nguyen LT, Yeom J, et al. The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein. *Nat Commun*. 2014;5:2958.

Jeong E-M, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese ST, Sovari AA, et al. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:454–63. A

Johansson LH, Borg L a. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem*. 1988;174:331–6.

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:5667–72.

Kar P, Samanta K, Shaikh S, Chowdhury A, Chakraborti T, Chakraborti S. Mitochondrial calpain system: An overview. *Arch Biochem Biophys*. 2010;495:1–7.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70:1469–80. Ava

Kim YH, Lim DS, Lee JH, Lim D-S, Shim WJ, Ro YM, et al. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*. 2003;35:336–49.

Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, et al. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res*. 2005;97:629–36.

Kirchhof P, Benussi S, Zamorano JL, Aboyans V, Achenbach S, Agewall S, et al. 2016 ESC guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Russ J Cardiol*. 2017;147:7–86.

Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Nakayama Y, Yodoi J, Sasayama S. Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure. *Jpn Circ J*. 2001;65:491–4.

Koehler U, Hildebrandt O, Krönig J, Grimm W, Otto J, Hildebrandt W, et al. Chronic hypoxia and cardiovascular risk: Clinical significance of different forms of hypoxia. *Herz*. 2018;43:291–7.

Koppenol WH, van Buuren KJ, Butler J, Braams R. The kinetics of the reduction of cytochrome c by the superoxide anion radical. *Biochim Biophys Acta*. 1976;449:157–68.

Korantzopoulos P, Kolettis TM, Galaris D, Goudevenos JA. The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2007;115:135–43.

Köroğlu S, Tuncer C, Acar G, Akçay A, Sökmen G, Yalçıntaş S, et al. Relation of inflammatory and oxidative markers to the occurrence and recurrence of persistent atrial fibrillation. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2012;40:499–504.

Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet*. 2006;38:518–20.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.

Lai L-P, Tsai C-C, Su M-J, Lin J-L, Chen Y-S, Tseng Y-Z, et al. Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. *Chest*. 2003;123:539–44.

Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1226:37–43.

Lee JS, Ko YG, Shin KJ, Kim SK, Park JH, Hwang KC, et al. Mitochondrial DNA 4977bp deletion mutation in peripheral blood reflects atrial remodeling in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Yonsei Med J*. 2015;56:53–61.

Leistad E, Aksnes G, Verburg E, Christensen G. Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*. 1996;93:1747–54.

Letsas KP, Korantzopoulos P, Filippatos GS, Mihas CC, Markou V, Gavrielatos G, et al. Uric acid elevation in atrial fibrillation. *Hellenic J Cardiol*. 51:209–13.

Li D, Fareh S, Leung T, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs. *Circulation*. 1999;100:87–95.

Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH. Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1310–8.

Lin Y-K, Lai M-S, Chen Y-C, Cheng C-C, Huang J-H, Chen S-A, et al. Hypoxia and reoxygenation modulate the arrhythmogenic activity of the pulmonary vein and atrium. *Clin Sci*. 2012;122:121–32.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl. Heidelberg: Springer; 2007

Logan WF, Rowlands DJ, Howitt G, Holmes AM. Left atrial Activity following Cardioversion. *Lancet*. 1965;2:471–3.

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): A phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6:516–24.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. The folin by oliver. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47:469–474.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049–55.

Mcewan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon J. Differential Effects of Angiotensin II on Cardiac Cell. *Animals.* 1998;1–7.

Menzies-Gow N. ECG interpretation in the horse. *In Pract.* 2001;23:454–9.

Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation.* 2001;104:174–80.

Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res.* 2007;101:755–8.

Mitten LA. Cardiovascular Causes of Exercise Intolerance. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1996;12:473–94.

Mohamed SA, Hanke T, Erasmi AW, Bechtel MJF, Scharfschwerdt M, Meissner C, et al. Mitochondrial DNA deletions and the aging heart. *Exp Gerontol.* 2006;41:508–17.

Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation.* 1995;91:1588–95.

Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002;415:219–26.

Neidhardt S, Garbade J, Emrich F, Klaeske K, Borger MA, Lehmann S et al. Ischemic Cardiomyopathy Affects the Thioredoxin System in the Human Myocardium. *J Card Fail.* 2019;25(2):204-212.

Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Mizushima J, Hori H, Iwasaki T, et al. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem Soc Trans.* 1997;25:783-6.

Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlén P, Orrenius S, et al. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15:1857-64.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1287-312.

Ohmura H, Hiraga A, Takahashi T, Kai M, Jones JH. Risk factors for atrial fibrillation during racing in slow-finishing horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2003;223:84-8.

Ono N, Hayashi H, Kawase A, Lin S, Li H, Weiss JN, et al. Spontaneous Atrial Fibrillation Initiated by Triggered Activity Near the Pulmonary Veins in Aged Rats Subjected to Glycolytic Inhibition. *American Journals of Physiology.* 2006;1-36.

Pastori D, Pignatelli P, Farcomeni A, Menichelli D, Nocella C, Carnevale R, et al. Aging-Related Decline of Glutathione Peroxidase 3 and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc.* 2016;1-9.

Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation.* 1991;46:181-6.

Qu Z, Weiss JN, Karagueuzian HS. Suppression of Re-Entrant and Late Sodium Current Blocker Ranolazine. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57.

Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24:981-90.

Reilly SN, Jayaram R, Nahar K, Antoniadis C, Verheule S, Channon KM, et al. Atrial sources of reactive oxygen species vary with the duration and substrate of atrial fibrillation: Implications for the antiarrhythmic effect of statins. *Circulation*. 2011;124:1107–17.

Ren X, Wang X, Yuan M, Tian C, Li H, Yang X, et al. Mechanisms and Treatments of Oxidative Stress in Atrial Fibrillation. *Curr Pharm Des*. 2018;24:3062–71.

Russell WMS, Burch RL, *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen and Co Ltd.; 1959

Ryan N, Marr CM, McGladdery J. Survey of cardiac arrhythmias during submaximal and maximal exercise in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J*. 2005;37:265–8.

Sakabe M, Fujiki A, Sakamoto T, Nakatani Y, Mizumaki K, Inoue H. Xanthine Oxidase Inhibition Prevents Atrial Fibrillation in a Canine Model of Atrial Pacing-Induced left Ventricular Dysfunction. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012;23:1130–5.

Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:993–8.

Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000;5:415–8.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76–85.

Sovari AA. Cellular and Molecular Mechanisms of Arrhythmia by Oxidative Stress. *Cardiol Res Pract*. 2016;9656078.

Sovari AA, Dudley SC Jr. Reactive oxygen species-targeted therapeutic interventions for atrial fibrillation. *Front Physiol*. 2012;3:311.

Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1989;179:8–18.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441–6.

Thomas GP, Sims SM, Cook MA, Karmazyn M. Hydrogen Peroxide-Induced Stimulation of L-Type Calcium Current in Guinea Pig Ventricular Myocytes and Its Inhibition by Adenosine A1 Receptor Activation 1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998;286:1208–14.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76:4350–4.

Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Tomikura Y, Takeda S, et al. Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:489–96.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5510–4.

Wei Y-H. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res*. 1992;275:145–55.

Wess G, Schulze A, Butz V, Simak J, Killich M, Keller LJM, et al. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *J Vet Intern Med*. 2010;24:533–8.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995;92:1954–68.

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The framingham study. *Stroke*. 1991;22:983–8.

Xie W, Santulli G, Reiken SR, Yuan Q, Osborne BW, Chen BX, et al. Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Sci Rep*. 2015;5:1–11.

Yang X, An N, Zhong C, Guan M, Jiang Y, Li X, et al. Enhanced cardiomyocyte reactive oxygen species signaling promotes ibrutinib-induced atrial fibrillation. *Redox Biol*. 2020;30:101432.

Yang Y, Shi W, Cui N, Wu Z, Jiang C. Oxidative stress inhibits vascular K(ATP) channels by S-glutathionylation. *J Biol Chem*. 2010;285:38641–8.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74:139–62.

Yu WC, Chen SA, Lee SH, Tai CT, Feng AN, Kuo BIT, et al. Tachycardia-induced change of atrial refractory period in humans: Rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation*. 1998;97:2331–7.

Zhang J, Xu S, Xu Y, Liu Y, Li Z, Zhang Y, et al. Relation of Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood to Postoperative Atrial Fibrillation After Isolated Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Am J Cardiol*. 2017;119:473–7.

Zhang M, Perino A, Ghigo A, Hirsch E, Shah AM. NADPH Oxidases in Heart Failure: Poachers or Gamekeepers? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1024–41.

Zhang P, Wang C, Gao K, Wang D, Mao J, An J, et al. The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J Biol Chem*. 2010;285:8869–79.

Danksagung

Schlussendlich möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich im Entwicklungsprozess dieser Arbeit fachlich, finanziell, seelisch und moralisch unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. vet. Almuth Einspanier und Herrn Prof. Michael A. Borger MD PhD für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei den Mitarbeitern des Forschungslabors im Herzzentrum Leipzig. Insbesondere bei Frau Dr. rer. nat. Maja Dieterlen. Eure fachliche Expertise, die angeregten Diskussionen und der nie endende Humor gaben mir stets einen Ausweg aus dem wissenschaftlichen Dickicht.

Das wohl größte Dankeschön gebührt meinen Eltern Birgit und Matthias Schwach, die mich finanziell, aber noch viel wichtiger seelisch und moralisch durch das gesamte Studium und die Anfertigung der Dissertation begleiteten. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei Felicia Möller und Jan Golin für die guten Tipps und Anregungen während des Schreibprozess. Verliert nie eure gute Laune und eure Geduld mit mir.

