

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
DIREKTOR PROF. DR. MED. LARS S. MAIER

MITOCHONDRIALE ADAPTATIONEN IN DER  
PROGRESSIVEN HERZINSUFFIZIENZ UND  
NACH KOMBINierter RAS-/NEP-INHIBITION

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Laura Grois

2017



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
DIREKTOR PROF. DR. MED. LARS S. MAIER

MITOCHONDRIALE ADAPTATIONEN IN DER  
PROGRESSIVEN HERZINSUFFIZIENZ UND  
NACH KOMBINierter RAS-/NEP-INHIBITION

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Laura Grois

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Christoph Birner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2017

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung .....	10
1.1 Herzinsuffizienz .....	10
1.2 Pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz .....	11
1.3 Pharmakologisches Prinzip der kombinierten RAS-/NEP-Inhibition.....	12
1.4 Rolle des Energiemetabolismus in der Herzinsuffizienz.....	13
1.5 Proteomanalyse .....	15
1.6 Offene Fragen und Zielsetzung der Arbeit .....	17
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Material .....	18
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Modell der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz im Kaninchen.....	21
2.2.2 Mitochondrienisolation .....	23
2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts .....	24
2.2.4 Ethanol-fällung.....	25
2.2.5 Kontrolle der Reinheit der Extraktion .....	25
2.2.6 Proteom-Analyse .....	27
2.2.7 Funktionelle Analysen.....	28
2.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse .....	34
3 Ergebnisse .....	35
3.1 Mitochondrienisolation- Methodenoptimierung.....	35
3.2 Proteom-Analyse.....	37
3.2.1 CTRL vs. ELVD .....	38
3.2.2 CTRL vs. CHF .....	44
3.2.3 EVLD vs. CHF .....	49
3.2.4 CHF vs. CHF+VPI .....	54
3.2.5 Zusammenfassung Proteom Analyse .....	60
3.3 Elektronenmikroskopische Analysen.....	61
3.4 Funktionelle Analysen .....	65
3.4.1 Citratsynthase-Aktivität .....	65

---

3.4.2	Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette.....	66
3.4.3	Aktivität des Komplex II der mitochondrialen Atmungskette.....	67
3.4.4	Aktivität des Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette.....	68
3.4.5	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität .....	69
3.4.6	CPT1A-Western Blot .....	70
4	Diskussion .....	72
4.1	Veränderungen des Proteoms in der Progression der Herzinsuffizienz.....	72
4.1.1	Veränderungen des Stoffwechsels .....	72
4.1.2	Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette ....	76
4.1.3	Veränderungen der Intermediärfilamente .....	77
4.2	Veränderungen durch die Behandlung mit einem Vasopeptidaseinhibitor in der manifesten Herzinsuffizienz .....	78
4.2.1	Veränderungen des Stoffwechsels .....	78
4.2.2	Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette ....	80
4.2.3	Veränderungen der Intermediärfilamente .....	81
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick .....	82
	Literatur .....	85
	Eidesstattliche Erklärung.....	95
	Lebenslauf/Vita.....	
	Danksagung .....	

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
CHF	Manifeste Herzinsuffizienz
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CTRL	Kontrolle
ELVD	Frühe linksventrikuläre Dysfunktion
NEP	Neutrale Endopeptidase
NYHA	New York Heart Association
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SRM	Selection Reaction Monitoring
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop
VPI	Vasopeptidase-Inhibitor

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pufferzusammensetzung der Mitochondrienisolation .....	23
Tabelle 2: Antikörper .....	26
Tabelle 3: Sekundärantikörper .....	27
Tabelle 4: Pipettierschema Mastermix für Citratsynthase .....	29
Tabelle 5: Mastermix PDH-Aktivitätsassay.....	30
Tabelle 6: Pipettierschema Reaktionsmedium NADH-Dehydrogenase.....	31
Tabelle 7: Pipettierschema Reaktionsmedium Succinate-Dehydrogenase .....	32
Tabelle 8: Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine.....	37
Tabelle 9: Quantitative Befunde der TEM-Analyse.....	64



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grafische Darstellung des Versuchablaufs.....	21
Abbildung 2: Ablauf der Mitochondrienisolation.....	24
Abbildung 3: Beispiel einer Standarddeichkurve der Proteinbestimmung .....	25
Abbildung 4: Beispielkurve photometrische Bestimmung Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität.....	33
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien, die nach unterschiedlichen Protokollen isoliert wurden .....	36
Abbildung 6: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CTRL vs. ELVD.....	38
Abbildung 7: Stoffwechselproteine, Vergleich CTRL vs. ELVD .....	39
Abbildung 8: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente, Vergleich CTRL vs. ELVD .....	40
Abbildung 9: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CTRL vs. ELVD.....	41
Abbildung 10: Ribosomale Proteine, Vergleich CTRL vs. ELVD .....	42
Abbildung 11: Transportproteine, Vergleich CTRL vs. ELVD .....	43
Abbildung 12: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CTRL vs. CHF .....	44
Abbildung 13: Stoffwechselproteine, Vergleich CTRL vs. CHF .....	45
Abbildung 14: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich CTRL vs. CHF .....	46
Abbildung 15: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CTRL vs. CHF.....	47
Abbildung 16: Ribosomale Proteine, Vergleich CTRL vs. CHF .....	48
Abbildung 17: Transportproteine, Vergleich CTRL vs. CHF .....	48
Abbildung 18: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich ELVD vs. CHF .....	49
Abbildung 19: Stoffwechselproteine, Vergleich ELVD vs. CHF .....	50
Abbildung 20: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich ELVD vs. CHF .....	51
Abbildung 21: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich ELVD vs. CHF.....	52
Abbildung 22: Ribosomale Proteine, Vergleich ELVD vs. CHF .....	53
Abbildung 23: Transportproteine, Vergleich ELVD vs. CHF .....	53
Abbildung 24: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CHF vs. CHF+VPI.....	54
Abbildung 25: Stoffwechselproteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI .....	55
Abbildung 26: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich CHF vs. CHF+VPI .....	56
Abbildung 27: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CHF vs. CHF+VPI...	57

---

Abbildung 28: Ribosomale Proteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI .....	58
Abbildung 29: Transportproteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI .....	59
Abbildung 30: Herzmuskelgewebe mit normalen Mitochondrien.....	61
Abbildung 31: Myelin-artige Strukturen (Pfeile), CHF.....	61
Abbildung 32: Myelin-artige Strukturen (Pfeile), CHF+VPI.....	62
Abbildung 33: Parakristalline Strukturen (Pfeile), CHF.....	62
Abbildung 34: Parakristalline Strukturen (Pfeile), CHF+VPI.....	63
Abbildung 35: Lipidinklusionen, CHF.....	63
Abbildung 36: Lipidinklusionen (Pfeile), CHF+VPI. ....	64
Abbildung 37: Citratsynthase-Aktivität.....	65
Abbildung 38: NADH-Dehydrogenase-Aktivität .....	66
Abbildung 39: Succinat-Dehydrogenase-Aktivität.....	67
Abbildung 40: Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität .....	68
Abbildung 41: Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität .....	69
Abbildung 42: CPT1A- Auswertung Western Blot .....	70
Abbildung 43: Western Blot Banden CPT1A .....	70
Abbildung 44: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Die Definition der Herzinsuffizienz beinhaltet eine funktionelle oder strukturelle Abnormalität des Herzens, welche zu einer Unfähigkeit des Herzens führt, ausreichend Sauerstoff gemäß der Erfordernisse des metabolisierenden Gewebes zur Verfügung zu stellen, trotz eines normalen Füllungsdruckes (1,2). Somit ist das Herz nicht mehr in der Lage, die Auswurfleistung an die Bedürfnisse des Organismus anzupassen.

Der Verlauf der Herzinsuffizienz ist progredient und mündet in einer Dilatation des linken Ventrikels gepaart mit einer Erhöhung der Wandspannung. Anfangs führt die Dilatation gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus noch zu einer Steigerung der Kontraktilität, bei progredienter Dilatation sinkt jedoch die Auswurfleistung. Man unterscheidet die systolische Herzinsuffizienz, bei welcher eine verminderte Kontraktilität und daraus resultierend eine ungenügende Pumpleistung Ausdruck der Herzinsuffizienz ist (sog. HFrEF) von der diastolischen Herzinsuffizienz, welche sich durch eine erschwerte Füllung des Herzens äußert (sog. HFpEF). Die Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) 2016 definieren die Herzinsuffizienz als ein komplexes Syndrom, bestehend aus typischen Symptomen (Dyspnoe, Orthopnoe, Nykturie) und typischen Untersuchungsbefunden (Ödeme, Tachypnoe, pulmonale Rasselgeräusche) als Konsequenz einer funktionellen oder strukturellen Störung (3).

Als Folge der Herzinsuffizienz kann zum einen ein sogenanntes Vorwärtsversagen entstehen, bestehend aus einer Minderperfusion der Organe, welches sich durch Leistungsschwäche, Schwindel und Organbeteiligungen bis –ausfällen äußert. Zum anderen kann ein Rückwärtsversagen durch eine pulmonale Drucksteigerung mit nachfolgender Lungenstauung entstehen, als auch ein venöser Rückstau im systemischen Kreislauf, welcher sich vor allem durch periphere Ödeme bemerkbar macht.

## 1.2 Pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz gehört mit einem Lebenszeitrisiko von 20% (4) zu den bedeutenden Gesundheitsproblemen vor allem der westlichen Nationen. Schon jetzt werden 32 Milliarden Dollar pro Jahr für die Behandlung der Herzinsuffizienz in den Vereinigten Staaten nach Schätzungen der American Heart Association (AHA) benötigt (5). Steigende Inzidenzen (Jahr 2000: 296/100000, Jahr 2007: 390/1000000) (6), hohe Prävalenzen der symptomatischen Herzinsuffizienz von 8,3% in der deutschen Bevölkerung über 45 Jahren (7) und eine immer noch sehr hohe 4 Jahresmortalität von 61,4% (6), welche vergleichbar mit vielen malignen Erkrankungen ist (8), verdeutlichen den Bedarf an neuen pharmakologischen Therapiemodalitäten.

Die aktuelle leitliniengerechte Therapie der Herzinsuffizienz zielt auf eine Hemmung der im Verlauf der Erkrankung maladaptiven neurohumeralen Antwort ab: ACE-Inhibitoren und AT1-Antagonisten sorgen durch die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms oder der direkten Blockade des Angiotensin-2-Typ-1-Rezeptors für eine verminderte Vasokonstriktion durch Angiotensin II und eine Abnahme des pathologischen Remodelings, haben ihren Angriffspunkt somit am Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Beta-Blocker, als Antagonisten des sympathischen Nervensystems, wirken der pathologischen Downregulation von  $\beta$ 1-Rezeptoren entgegen und erhalten damit die Ansprechbarkeit auf katecholaminerge Reize.

Trotz erwiesenermaßen positiver Effekte dieser Medikamente auf Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten, bleibt die Mortalität der Erkrankung weiterhin inakzeptabel hoch, weswegen das Interesse an neuen Targets der pharmakologischen Therapie in der progressiven Herzinsuffizienz unverändert ist: zum einen rücken kombinierte neurohumorale Pharmakotherapien wie die duale RAAS-/NEP-Inhibition in den Vordergrund, welche im nächsten Abschnitt ausführlich vorgestellt werden und Teil dieser Arbeit sind, zum anderen werden metabolische Enzyme als pharmakologische Targets diskutiert, die hier am Rande erwähnt werden sollten: zum einen die Inhibition der Carnitin-Palmoyltransferase (CPT-

1), welche in ersten experimentellen Studien zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion führten (9), indem sie die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase steigern (10), welche für die Regulation des Glucosestoffwechsels maßgeblich ist. Eine weitere Möglichkeit eines neuen Targets ist Ranolazin, welches neben der Inhibition des späten Natriumstroms auch eine Inhibition der  $\beta$ -Oxidation bedingt, der unter therapeutischen Konzentrationen ebenfalls die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase erhöht (11–13) und damit die Glucoseoxidation stimuliert (11).

Angriffspunkte der pharmakologischen Herzinsuffizienztherapie im Bereich des Fettstoffwechsels können Hemmer der  $\beta$ -Oxidation, CPT-1-Inhibitoren und PPAR- $\gamma$ -Agonisten sein (13). Zusätzlich könnten auch Antioxidantien wirksam sein, welche ihren Angriffspunkt direkt an den Mitochondrien haben, wie MitoQ, das in experimentellen Tierstudien zum einen die LV-Funktion verbesserte (14), zum anderen die LV-Hypertrophie verhinderte (15). Auch SS-31, ein Antioxidans, verminderte in einem Mausmodell das kardiale Remodeling in der Herzinsuffizienz (vor allem Hypertrophie und Fibrose) und die diastolische Dysfunktion (16).

### 1.3 Pharmakologisches Prinzip der kombinierten RAS-/NEP-Inhibition

Die kombinierten RAS-/NEP-Inhibition, wie sie z.B. bei der Medikamentenklasse der Vasopeptidase-Inhibitoren zur Anwendung kommt, setzt zwei pharmakologische Mechanismen in Gang:

Zum einen sorgt sie für eine Hemmung des Angiotension-Converting-Enzyms (ACE). Dies führt zu einer verminderten Bildung von Angiotensin II und einem gehemmten Bradykininabbau (17).

Zum anderen verursacht sie die Hemmung der neutralen Endopeptidase (NEP), eine zinkabhängige membrangebundene Metalloprotease, welche endogene Peptide am Aminoterminus von hydrophoben Peptiden abspaltet (18). Lokalisiert ist die NEP vor allem an Endothelzellen der Niere, aber auch in der Lunge, dem

Herzen, dem Magen, im Gehirn und in den peripheren Gefäßen (19). Sie katalysiert unter anderem die Spaltung der natriuretischen Peptide (ANP, BNP, CNP), Substanz P und Bradykinin (17). Durch die Hemmung der NEP erfolgt ein Anstieg der protektiven natriuretischen Peptide (17,20,21).

Somit konnte die duale RAAS-/NEP-Inhibition im Tiermodell eine Vasodilatation (21), eine verbesserte renale Funktion durch den Anstieg der natriuretischen Peptide (21,22), eine effektive Blutdrucksenkung (21,23,24), eine verminderte Apoptoserate von Kardiomyozyten (25) und einen positiven Effekt auf die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie (21,24,25) und einer Fibrose des Herzmuskelgewebes (21,25) aufweisen.

In klinischen Studien verbessert die Behandlung mit einem Vasopeptidasinhibitor die NYHA-Klasse stärker als eine alleinige ACE-Inhibition. Unter der Behandlung mit Omapatrilat ist das Auftreten kardiovaskulärer unerwünschter Ereignisse vermindert (26). Das pharmakologische Prinzip der Vasopeptidase-Inhibition reduziert das Risiko für kardiovaskulär bedingte Todesfälle (27,28) oder Krankenhausaufenthalte (27,28) und sorgt für eine Verminderung der Symptome und der körperlichen Einschränkungen der Herzinsuffizienz (28). Aufgrund gehäuft auftretender Angioödeme gelangte diese Substanzklasse trotz der erwiesenen positiven Effekte nicht zur klinischen Anwendung. Demgegenüber konnte eine Weiterentwicklung dieses pharmakologischen Prinzips zu den sog. ARNIs (Angiotensinrezeptor-/Nepriylisin-Inhibitoren) erst kürzlich außerordentlich vorteilhafte klinische Effekte nachweisen (28), weswegen diese Substanzklasse auch Eingang in die aktuell gültigen Leitlinien zur Herzinsuffizienz-Therapie gefunden hat.

#### 1.4 Rolle des Energiemetabolismus in der Herzinsuffizienz

Der Mangel an Energieträgern spielt in der Herzinsuffizienz eine große Rolle. Bei einer durchschnittlichen Herzfrequenz von 70/min schlägt das Herz ca. 100.000 mal am Tag und verbraucht für diese Leistung 6 kg ATP (29). In der Herzinsuffizienz finden sich erhebliche Veränderungen im Energiemetabolismus:

Die Substratversorgung des Herzen und die Bereitstellung von Metaboliten für die oxidative Phosphorylierung erfolgt im Herzen über die Glykolyse und die Oxidation von Fettsäuren, welche ihre Intermediärmetaboliten in den Citratzyklus einschleusen. Die Oxidation von Fettsäuren, die primäre Energiequelle des gesunden, kardialen Gewebes, wird in der frühen Herzinsuffizienz gering gesteigert (29), in der manifesten Herzinsuffizienz ist jedoch eine Erniedrigung der Enzyme festzustellen (29–33). Diese Reduktion der Enzyme in der Herzinsuffizienz könnte einen Shift in den fetalen Phänotyp des Energiemetabolismus darstellen (30,32). Die Verbindung von Citratzyklus und Glykolyse durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex ist in der manifesten Herzinsuffizienz vermindert (31,34).

Nicht nur in der Substratnutzung, sondern auch in der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium, welche den Hauptanteil der Energiegewinnung mit mehr als 95% ausmacht (35), ergeben sich in der Herzinsuffizienz bedeutende Veränderungen. Die Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, der NADH-Dehydrogenase, ist deutlich herabgesetzt (31,36). Der Komplex III, die Cytochrom-c-Reduktase, ist vermindert (31,36,37) und die Aktivität des Komplex V, die ATP-Synthase, ist in der manifesten Herzinsuffizienz ebenfalls deutlich reduziert (31,37,38). Diese Reduktion wird zum einen durch eine Antwort des Myozyten auf Stress oder die kardiale Hypertrophie mit einem verminderten Sauerstoffbedarf erklärt (31). Zum anderen sorgen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) für einen Defekt in der mitochondrialen DNA, welche für die Reduktion der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium verantwortlich gemacht wird (36).

Es zeigt sich, dass die Mitochondrien der Kardiomyozyten eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus spielen, Nickel et al. bezeichnet sie als „gatekeepers of life and death“ (9), da sie nicht nur essentiell für die Zelle durch die Bereitstellung von freiem ATP, sondern auch die Hauptquelle für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist und somit für Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten verantwortlich sind.

Diese Veränderungen im Energiemetabolismus spiegeln sich auch ultrastrukturell in den Mitochondrien wider: in der manifesten Herzinsuffizienz finden sich

strukturelle Auffälligkeiten der kardialen Mitochondrien (29,36), eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien sowie eine Zunahme der Größe (36).

Insgesamt lässt sich die kardiale Energetik in der progressiven Herzinsuffizienz mit einer Assoziation zur kardialen Hypertrophie (9), zu einem Zellverlust (Apoptose/Nekrose) (9,29,39,40) und zu oxidativem Stress der Zelle (9,41–44) beschreiben.

## 1.5 Proteomanalyse

Die Proteomanalyse umfasst die Erfassung der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle bezüglich Form, Funktion und Interaktionen, welche im Gegensatz zum Genom, das für jede Zelle das identische Erbgut besitzt, einer großen Flexibilität unterworfen ist. Nahezu alle Prozesse in unserem Organismus beruhen auf der Wirkung und dem Zusammenspiel von Proteinen. Die große Bedeutung der Proteine und des Proteoms liegt in ihrem vielfältigen Aufgabenbereich: z.B. die Stoffwechselproteine, welche für den ständigen Auf- und Abbau aller benötigten oder auch anfallenden Stoffe verantwortlich sind und dadurch für die Energiebereitstellung im Organismus sorgen. Kleine Störungen in diesem komplexen Zusammenspiel können der Ursprung für die Entstehung von Krankheiten sein. So liefert die Zusammensetzung des Proteoms wichtige Information über den Zustand der Zelle bzw. des Gewebes.

Die Proteomik verfolgte bisher zwei grundlegende Strategien: zum einen die gelbasierte Analyse durch zweidimensionale Gelelektrophoresen mit anschließender Identifizierung durch massenspektrometrische Verfahren, auf die hier im Detail nicht eingegangen werden soll und zum anderen die Auftrennung durch chromatografische Verfahren mit massenspektrometrischer Identifizierung.

Die zwei gängigen Analysemethoden in der Proteomik sind die Shotgun-Proteomik und das Selection Reaction Monitoring (SRM). Bei der Shotgun-Proteomik erfolgt eine datenabhängige Erfassung der Proteine. Es werden die fragmentierten Ionenspektren für bestimmte Precursor-Ionen detektiert und die korrespondierenden Proteine in einer Datenbank-gestützten Suche erfasst. Diese Methode ist



die Methode der Wahl für die Entdeckung einer maximalen Anzahl von Proteinen, wobei nur eine sehr limitierte Möglichkeit der Quantifizierung vorhanden ist. Im Gegensatz dazu werden beim Selection Reaction Monitoring eine geringe Anzahl von Proteinen detektiert, aber es ist eine optimale Quantifizierung möglich, limitiert ist dies durch die Analysegeschwindigkeit auf ca. 100 Proteine pro Lauf (45).

Das Ziel der Proteomik sollte es aber sein, sowohl eine Identifizierung als auch eine Quantifizierung aller Proteine zu ermöglichen. Dies erfüllt die datenunabhängige SWATH-Analyse mit einer gleichzeitigen Identifizierung und Quantifizierung von detektierbaren Peptiden in einer komplexen Probe (46). Die SWATH-Analyse verknüpft somit den hohen Durchsatz der Shotgun-Proteomik mit der hohen Reproduzierbarkeit der SRM (47).

Bei der SWATH-Analyse wird das Quadrupole-Massenspektrometer verwendet und der Analysebereich (400-1000 Da) in 25 Da Isolationsfenster untergliedert. Die transmittierten Ionen werden alle fragmentiert und die resultierenden Fragmente in dem Time-of-flight Analyzer hochauflösend detektiert. Pro Isolationsfenster benötigt der Scan 100 ms, sodass innerhalb von 2,5 Sekunden der gesamte Analysebereich erfasst werden kann. Durch sequentielle Scans unter Hochauflösung werden Ionenspektren jedes Peptids in der Probe akquiriert. Aufgrund der hohen Auflösung können nach der Erfassung qualitativ hochwertige Ionenchromatogramme erstellt werden (48). Der große Vorteil der SWATH-Analyse besteht darin, dass mehrere Hypothesen getestet werden können, ohne erneute experimentelle Messungen durchführen zu müssen, aufgrund der Tatsache, dass alle detektierbaren Ionen analytisch erfasst werden (46) und eine komplette zweidimensionale Aufnahme aller Fragmentationen-Signale einer Probe erstellt wird (47). Die Identifizierung der Proteine erfolgt durch die relative Fragmentationen-Intensität, die Isotopenpeaks der Peptide Precursor und der spezifischen Retentionszeit der Proteine (46). Die Herausforderung der SWATH-Analyse besteht in der Verfügbarkeit von Proteom-umfassenden Spektralbibliotheken, ohne die eine Identifizierung unmöglich ist (49).

## 1.6 Offene Fragen und Zielsetzung der Arbeit

Trotz der zunehmend erkannten, zentralen Rolle energetischer Prozesse in der Herzinsuffizienz sind die mitochondrialen Adaptationen noch immer unzureichend charakterisiert. Weiterhin ist unklar, inwiefern die kombinierte Inhibition des Renin-Angiotensin-Systems und der neutralen Endopeptidase Veränderungen in mitochondrialen Stoffwechselwegen bedingt. Es sind daher die Ziele dieser Arbeit

- Veränderungen des mitochondrialen Proteoms und die ultrastrukturellen Auffälligkeiten der Mitochondrien in der Progression der experimentellen Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz zu charakterisieren
- Es soll die Hypothese überprüft werden, dass eine kombinierte Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und der neutralen Endopeptidase sich positiv auf den kardialen Energiemetabolismus in der experimentellen Herzinsuffizienz auswirkt

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Versuchstiere:

- Chinchilla Bastard Kaninchen, Charles River, Sulzfeld, Deutschland

Chemikalien:

- Antikörper:
  - Anti-GAPDH antibody (ab8245), Abcam, Cambridge, England
  - Anti-beta Actin antibody (ab8226), Abcam, Cambridge, England
  - Anti-VDAC2 antibody (ab37985), Abcam, Cambridge, England
  - Anti-Cytochrome C antibody (ab13575), Abcam, Cambridge, England
  - Anti-TOMM70A antibody (ab89624), Abcam, Cambridge, England
  - Anti-VDAC1 antibody (sc 32063), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
  - Anti-CPT1A antibody (PA5-29995), Thermo Scientific, Waltham, USA
- Sekundärantikörper:
  - Dnk pAb to Ms IgG Dylight 650 (ab98797), Abcam, Cambridge, England
  - Dkn pAb to Ms IgG Dylight 550 (ab98795), Abcam, Cambridge, England
  - Dnk pAb to Goat IgG Dylight 650 (ab96938), Abcam, Cambridge, England
- Standard:
  - Precision Plus Protein Western C Standards, BioRad (#161-0376), Hercules, USA
  - PeqLab Proteinmarker IV, PeqLab (27-2110), PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- TBS (A5001,1000), Appli Chem GmbH, Darmstadt, Germany
- SDS (L6026), Sigma Aldrich, St.Louis, USA
- Laemmli Sample Buffer, BioRad (#161-0737), Hercules, USA
- Tween 20, Art.9127.1, Carl Roth GmbH&Co Kg, Karlsruhe, Deutschland
- Sucrose (S7903), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- HEPES sodium salt (H3784), Sigma Aldrich, St. Louis, USA

- EDTA (E5134), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Trypsin (T9201), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Trypsininhibitor (T9128), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Acetyl CoA (A2181), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- DTNB (D8130), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Triton X100 (T9284), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Oxalacetate acid (O4126), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Citrate Synthase from porcine heart (C3260), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Karnovsky-Fixativ, EM-Labor Uni Regensburg
- 2D Quant Kit, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England

#### Geräte:

- ChemiDoc MP Imaging System, BioRad, Hercules, USA
- TransBlot Turbo Transfer System, BioRad, Hercules, USA
- Zentrifuge "Centrifuge R", Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Thermomixer comfort compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Schüttler „Reax top“, Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Horizontalschüttler GFL 3005, GFL, Burgwedel, Deutschland
- Electrophoresis Power Supply-EPS 601, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England
- Mini Protean 3 Cell, BioRad, Hercules, USA
- Multipette plus 4780, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipetus akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
- Pipette Gilson 2,10,20,100,200,1000µl, Gilson, Middleton, USA
- Infinite M200 pro, Tecan, Maennedorf, Schweiz
- Nano Drop 2000c, Thermo Scientific, Waltham, USA
- Triple TOF 5600+, ABSciex, Darmstadt, Deutschland
- nano-HPLC "ultimate 3000", Dionex, Sunnyvale, USA
- Stereomikroskop Wild M3Z, Leica, Wetzlar, Deutschland
- LYNX-Einbettautomat, Leica, Wien, Österreich
- LEO 912AB Transmissionselektronenmikroskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 2k\*2k CCD-Kamera

Verbrauchsmaterialien:

- Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25ml; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Falcon 15, 50ml; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Combitips advanced 5ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Microtest Plate 96-well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- UV-Küvette mikro 70µl, Plastibrand, Brand GmbH &Co KG, Wertheim, Deutschland
- Einmalskalpelle, Feather, Osaka, Japan
- Pipettenspitzen „Premium Tips“ 10, 20, 100, 200, 1000µl; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Pipettenspitzen „Safeseal SurPhob“ 10, 1000µl; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Reaktionsgefäße „Safelock“ 0,5ml, 1,5ml, 2ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Reaktionsröhrchen 5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Mini PROTEAN TGX, stainfree gel, BioRad (#456-8125), Hercules, USA
- Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs, BioRad (#170-4156), Hercules, USA

Software:

- Image Lab Software für ChemiDoc MP
- Nano Drop 2000
- I-control 1.10
- Analyst 1.6TF
- ProteinPilot 4.5
- PeakView 1.2
- MarkerView 1.2
- OSIS-Software iTEM

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Modell der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz im Kaninchen

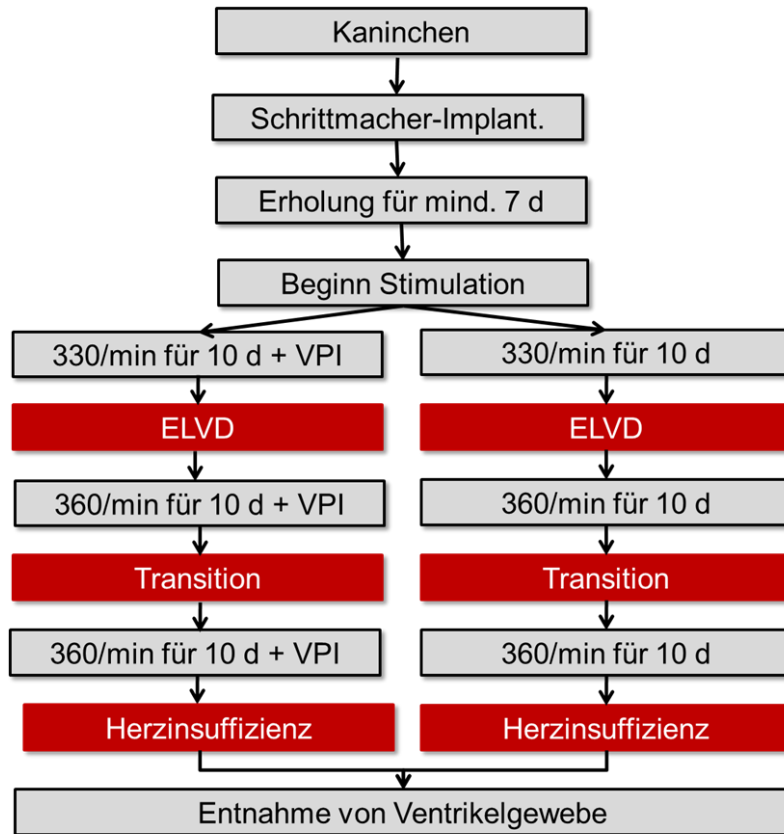


Abbildung 1: Grafische Darstellung des Versuchablaufs, VPI=Vasopeptidaseinhibition, ELVD=frühe linksventrikuläre Dysfunktion

Für das Kaninchenmodell der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz wurden Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard eingesetzt. Fünfzehn Kaninchen erhielten einen programmierbaren Herzschrittmacher der Firma Medtronic (Medtronic Minix 8340, Minneapolis, MN). Der Herzschrittmacher wurde unter Anästhesie mit Ketamin 60 mg/kg KG und Xylazine 5 mg/kg i.m. implantiert. Hierzu wurde die rechte innere Jugularvene mit einem einlumigen zentralen Venenkatheter (Braun, Deutschland) kanüliert und der Katheter unter fluoroskopischer Kontrolle in den rechten Ventrikel vorgebracht. Über den zentralen Venenkatheter wurde die Schrittmachersonde der Größe 2 French in den Apex des rechten Ventrikels

vorgeschoben und endokardial verankert. Das Schrittmacheraggregat wurde subkutan im rechten Abdomen der Kaninchen eingesetzt und mit der Schrittmachersonde durch eine Hautuntertunnelung verbunden.

Nach einer Erholungsphase von 10 Tagen wurde der Herzschrittmacher bei einer Frequenz von 330 Schlägen/min gestartet und nach einem Intervall von 10 Tagen auf eine Frequenz von 360 Schlägen/min erhöht. Aufgrund ausgeprägt hypotoner Effekte des zu überprüfenden Medikamentes wurde die Stimulationsfrequenz nicht, wie bei diesem Modell üblich, auf 380/min gesteigert, sondern bei 360/min belassen. Sechs Kaninchen erhielten eine pharmakologische Therapie mit Omapatrilat bei einer Tagesdosis von 50 mg/kg KG ab Beginn der Herzschrittmacherstimulation. Die Medikamentenaufnahme erfolgte durch die tägliche Trinkwassermenge.

Nach 30 Tagen wurden die Kaninchen euthanasiert und die Herzen entnommen. Das Gewebe des linken Ventrikels wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und für die weitere Gewebeaufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Mitochondrienisolation

Für die Isolation der Mitochondrien wurde eine Modifikation des Verfahrens nach Schaeffer et al. durchgeführt (50). Das Gewebe des linken Ventrikels (ca. 200-300 mg) wurde, gefroren auf Eis, in 3ml des Mitochondrienisolationsmediums (MIM) gewaschen und mit einem Einmalskalpell zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Trypsinlösung (0,45mg Trypsin T9201 (Sigma) in 3ml MIM) für exakt 10 Minuten für den Andau der Myofibrillen und eine bessere Ausbeute der mitochondrialen Isolation. Nach 10 Minuten wurde der Enzymverdau durch die Trypsininhibitorlösung (1,95mg Trypsininhibitor T9128 (Sigma) in 3ml MIM+BSA) gestoppt. Der komplette Enzymverdau wurde auf Eis durchgeführt.

Tabelle 1: Pufferzusammensetzung der Mitochondrienisolation

<b>MIM</b>	<b>MIM+BSA</b>
300mM Succrose	300mM Succrose
10mM Na-HEPES	10mM Na-HEPES
0,2mM EDTA	0,2mM EDTA
	1mg/ml BSA
pH=7,4	pH=7,4

Im Anschluss daran erfolgte die Abnahme des Überstandes der Probe und eine Überführung des Gewebes in einen Douncehomogenisator, in welchem die Homogenisierung auf Eis unter Zugabe von 2ml MIM+BSA stattfand. Das komplette Homogenisat wurde in ein Eppendorf Cup gegeben und in der Zentrifuge für 10 Minuten bei 4°C und 600g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Pipettieren in ein neues Cup gegeben und dieses bei 4°C und 8000g für weitere 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis aufbewahrt. Nach dieser erneuten Zentrifugation erhielt man das mitochondriale Pellet, welches nach Abnahme des Überstandes und einer Zugabe von 2ml MIM+BSA nochmals bei 4°C und 8000g für 15 Minuten zentrifugiert wurde, um eine Aufreinigung der Mitochondrien zu erzielen. Das resultierende Pellet wurde in 100-150µl MIM (je nach Größe des mitochondrialen Pellets) resuspendiert und auf Eis gelagert.



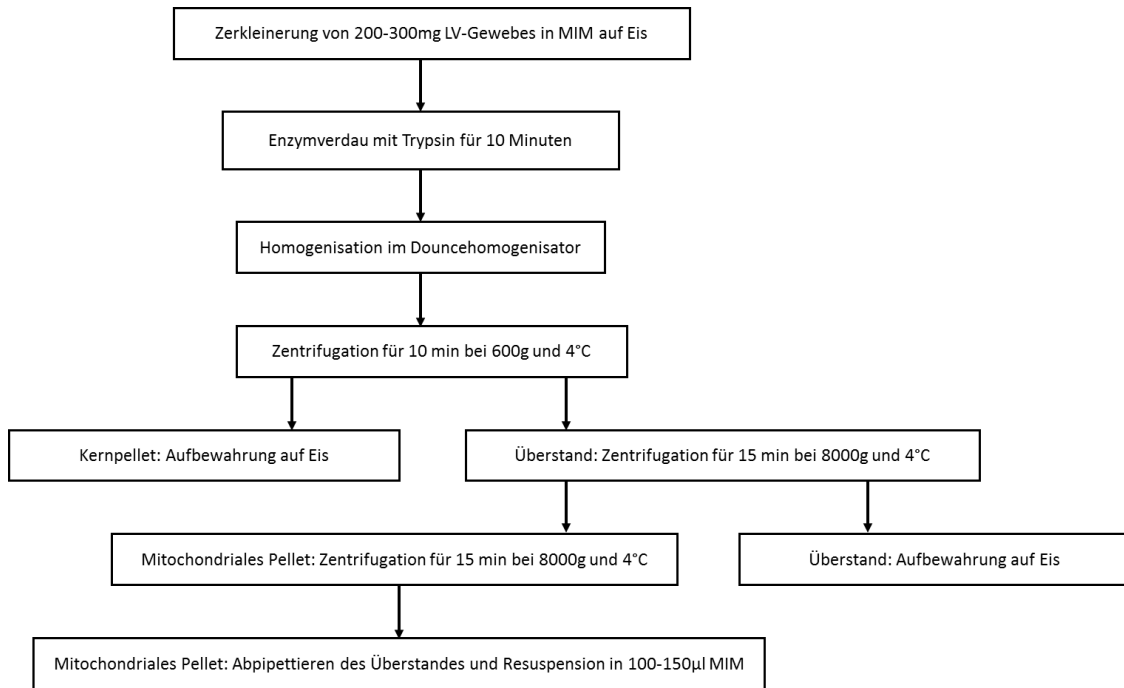


Abbildung 2: Ablauf der Mitochondrienisolation

### 2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung der Mitochondrienisolate erfolgte durch den kommerziell erhältlichen Kit „2D Quant“ von GE Healthcare Life Sciences. Der Kit beruht auf einer quantitativen Präzipitierung von Proteinen durch ein „Precipitant“ und ein „Coprecipitant“, während mögliche Kontaminationen gelöst in der Probe verbleiben.

Die präzipitierenden Proteine wurden durch eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10.000g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vom erhaltenen Pellet abgenommen. Das Pellet wurde resuspendiert in einer alkalischen Lösung von Kupferionen, welche sich an das Peptidrückgrat sämtlicher Proteine binden. Danach erfolgte die Zugabe eines Farbreagenzes, das eine Bindung mit allen ungebundenen Kupferionen eingeht. Die Farbintensität korreliert invers mit der Proteinmenge in der Probe und kann mithilfe einer photometrischen Bestimmung bei 485nm gegen Luft gemessen werden. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer Standarddeichkurve mit Rinderserumalbumin abgelesen werden.

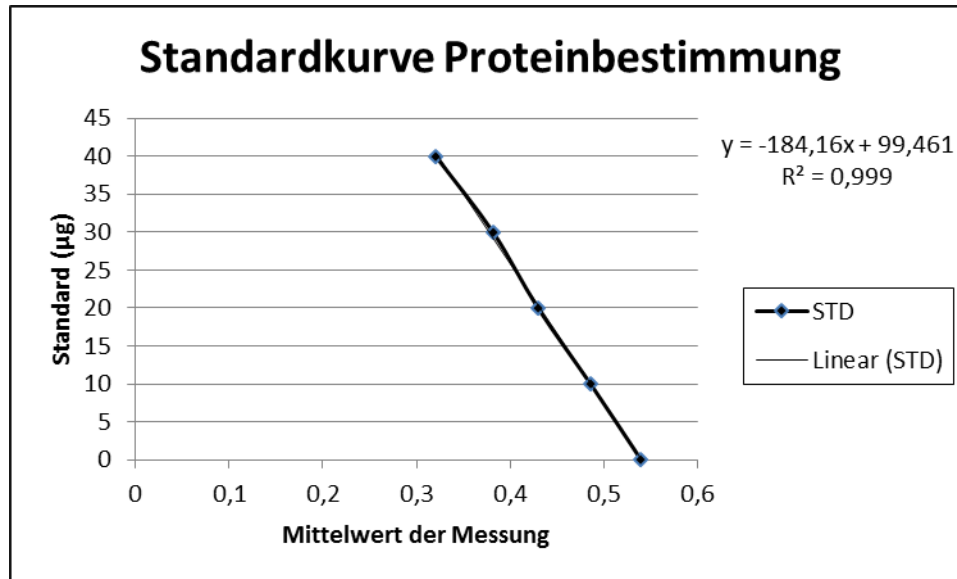


Abbildung 3: Beispiel einer Standarddeichkurve der Proteinbestimmung

#### 2.2.4 Ethanolfällung

Die nachfolgende SWATH-Analyse der Mitochondrienisolate macht eine Ethanolfällung erforderlich, da die Sucrose bei der Analyse ein Hindernis darstellt. Daher wurden 120µg des Mitochondrienisolates in absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert, um eine Elimination der Sucrose zu ermöglichen, welche sich im Gegensatz zu den mitochondrialen Proteinen in dem absoluten Ethanol löst. Danach wurde die Probe bei 4°C und 13.000g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 70%igen Ethanol für einen Waschvorgang resuspendiert und nochmals bei 4°C und 13000g für 5 Minuten zentrifugiert, wobei dieser Vorgang zweimal wiederholt wurde. Das resultierende Pellet wurde an der Luft getrocknet und bei -20°C für die SWATH-Analyse aufbewahrt.

#### 2.2.5 Kontrolle der Reinheit der Extraktion

Nach der Isolation der Mitochondrien erfolgte zur Kontrolle der Isolationsmethode exemplarische Reinheitskontrollen mithilfe von Western Blots und elektronenmikroskopischen Analysen.

Für die Western Blot Analyse wurden 25µg des Mitochondrienisolates in 10µl des MIM gelöst bzw. 10µl des jeweiligen Überstandes der Mitochondrienisolation verwendet, jeder Probe wurden 10µl Laemmli Ladebuffer (versetzt mit β-Mercaptoethanol) zugefügt und das Gemisch im Thermomixer für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis und Befüllung der Gelkammer mit 1%SDS wurden die Standards (Peqlab Proteinmarker IV (5µl) und BioRad Protein Western C Standard (3µl)) und die Proben auf das Mini PROTEAN® TGX stainfree Gel geladen und die Kammer an den Electrophoresis Power Supply bei 100V und 35mA angeschlossen. Danach wurde das Gel für 2,5 Minuten im BioRad ChemiDoc mit UV-Licht aktiviert. Anschließend an die Aktivierung wurde das Gel mit einem Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Pack im TransBlot Turbo Transfer System geblottet bei 2,5A bis 25V für 3 Minuten. Die Kontrolle der Membran und des Gels erfolgte nach dem Blotten im BioRad ChemiDoc, bevor die Membran in 3% BSA in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert wurde. Die Blotmembran wurde nach der Blockierung mit BSA zweimal mit TBST für 10 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C in 1,5% BSA in TBST inkubiert. Darauf folgend wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper begonnen wurde.

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Funktion
<b>VDAC2</b>	1:500	spannungsabhängiger Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran (30-32kDa)
<b>TOMM70</b>	1:500	Translokase an der äußeren Mitochondrienmembran (67kDa)
<b>Cytochrom c</b>	1:1000	Komplex der Atmungskette, Sitz im Intermembranraum an der inneren Mitochondrienmembran (12kDa)
<b>B-Actin</b>	1:2000	zytosolisches Protein (42kDa)
<b>IMMT</b>	1:500	Translokase an der inneren Mitochondrienmembran (kDa)

<b>CPT1A</b>	1:1000	Essentieller Schritt in der $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren
--------------	--------	---

Der Sekundärantikörper wurde in 1%BSA in TBST verdünnt und nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur dreimal mit TBST und einmal in TBS für jeweils 10 Minuten gewaschen, um einen Blot frei von Verunreinigungen und Rückständen für die Aufnahme im BioRad ChemiDoc zu erhalten.

Tabelle 3: Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Dnk pAb to Ms IgG Dylight 650</b>	1:20000
<b>Dnk pAb to Ms IgG Dylight 550</b>	1:20000
<b>Dnk pAb to Goat IgG Dylight 650</b>	1:20000

### 2.2.6 Proteom-Analyse

Die Proteom-Analyse wurde in Kooperation mit PD Dr. Reinders am Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg durchgeführt.

Die Vorbereitung der Proben für die Proteom-Analyse erfolgte mit dem Rapid ACN Protokoll (51).

Hierfür wurden die Mitochondrienisolate zur Lyse mit Ammoniumbikarbonat versetzt. Die Suspension wurde im FastPrep-24 homogenisiert und anschließend bei 4°C und 16000g für 5 Minuten zentrifugiert, welches insgesamt zweimal durchgeführt wurde. Der Überstand wurde jeweils in einem neuen Eppendorf Cup aufbewahrt.

Anschließend an die Lyse der Proben wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, nach welcher die Proben auf eine Konzentration von 2 $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt wurden. Zu jeder Probe (25 $\mu$ l) wurden 25 $\mu$ l Acetonitril hinzugefügt und das Gemisch

nach einer Mischung im Vortexer zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Proben mithilfe von DTT und TCEP reduziert und die Cysteinreste der Proteine mit Iodoacetamid alkyliert, wodurch die Enzyme inaktiviert wurden. Trypsin wurde in einem Verhältnis von Enzym zu Protein von 1:40 den Proben zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde die identische Menge Trypsin erneut dem Proteingemisch zugesetzt und es folgte wiederholt eine Inkubation über Nacht bei 37°C.

Das Proteingemisch wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und resuspendiert in 50µl 5% Acetonitril/ 0,1% Hydrocarbonsäure. Die Proteinsuspension wurde auf eine Filtereinheit aufgebracht und zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Durchfluss des Filters aliquotiert und die darin enthaltenen Proteinfragmente bei -80°C aufbewahrt.

Die Analyse wurde an einem „TripleTOF 5600+“, einem Quadruple-Time-of-flight-Massenspektrometer in Verbindung mit einer nano HPLC (high performance liquid chromatography) „ultimate 3000“ durchgeführt. Steuersoftware für die Analyse war „Analyst 1.6TF“, die Auswertung erfolgte mit den Programmen "ProteinPilot 4.5", "PeakView 1.2" und "MarkerView 1.2".

### 2.2.7 Funktionelle Analysen

#### Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Citratsynthase erfolgte nach dem Prinzip von Srere (52). Die bei der Reaktion von Oxalacetat mit Acetyl-CoA freiwerdenden Thiolgruppen reagieren stöchiometrisch mit DTNB und bilden das gelbliche TNB, welches photometrisch bei 412nm detektiert werden kann. Durch die Zugabe des Tensids Triton X100 werden alle mitochondrialen Membranen zerstört und man kann die gesamte Aktivität der Citratsynthase messen. Ohne Zusatz von Triton lässt sich lediglich die Aktivität der destruierten Mitochondrien detektieren. Daher eignet sich die Citratsynthase neben ihrer Eigenschaft als globaler Marker für die Abschätzung der oxidativen Kapazität der Mitochondrien auch als Marker für die Integrität der Mitochondrien.

Zu jedem Mastermix wurde eine 1:4 Verdünnung der Mitochondrienisolate in 0,1M Tris HCl zugefügt und auf 30°C erwärmt. Pro Mitochondrienisolat wurde sowohl eine Probe mit Triton als auch ohne Triton vorbereitet. In jede Küvette wurden 25µl einer 10mM Oxalacetate acid Lösung vorgelegt, der Mastermix samt Probe nachgelegt und sofort gemischt. Im Anschluss an die Zugabe wurde die photometrische Messung bei 412nm über 200 Sekunden in Zeitintervallen von 10 Sekunden gestartet. Als Kontrolle wurde Citrate Synthase des Schweineherzens verwendet (Sigma C3260).

Tabelle 4: Pipettierschema Mastermix für Citratsynthase

Substanz	Menge pro Probe (+)	Menge pro Probe (-)
<b>12,2mM Acetyl-CoA</b>	12,5µl	12,5µl
<b>1mM DTNB</b>	50µl	50µl
<b>Triton X100 10%</b>	12,5µl	0
<b>Aqua destillatum</b>	400µl	412,5µl

#### Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase wurde mithilfe des PDH Assay Science cell gemessen. Die isolierten Mitochondrien wurden in Assay Puffer aufgenommen und mit 2µl 10% Dodecylmaltosid versetzt. In einer 96 well Platte wurden jeweils 10µl der Positivkontrolle, der Mitochondrienisolate und Assaypuffer vorgelegt und mit 90µl Mastermix vermischt. Die Messung wurde sofort bei 440nm gestartet über einen Zeitraum von 60 min bei einem Messintervall von 5 Minuten.

Tabelle 5: Mastermix PDH-Aktivitätsassay

Reagenz	Menge pro Probe
Assaypuffer	22µl
Developer solution 1x	10µl
NAD	20µl
WST Solution	5µl
Substrat	16µl
Cofactor	17µl

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$PDH \left( \frac{U}{ml} \right) = \frac{\left[ \left( \frac{\Delta OD}{min} - BLANK \right) * 100\mu l * Probenverdünnung \right]}{(1,94 mM^{-1} * 10\mu l)}$$

#### Bestimmung der Aktivität der NADH-Dehydrogenase (Komplex I)

Die Aktivität der NADH-Dehydrogenase wurde nach dem Prinzip von Kramer et al. (53) bestimmt. Die NADH-Dehydrogenase überträgt Elektronen von NADH auf Ubichinon und oxidiert simultan NADH zu NAD<sup>+</sup>.

Das Photometer wurde auf 340nm und 415nm eingestellt sowie auf 37°C erwärmt. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte gegen Luft. 800µl des Reaktionsmediums und 19µl des Mitochondrienisolats (0,5mg/ml) wurden in eine Küvette vorgelegt und für 10 sec. bei 37°C inkubiert. Für jedes Mitochondrienisolat wurde sowohl eine Probe mit Rotenone als auch ohne Rotenone vorbereitet. Rotenone sorgt für eine Hemmung der NADH-Dehydrogenase und ermöglicht somit die Differenzierung zwischen der Aktivität des Komplexes I und Störfaktoren durch andere Enzyme. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 17µl 10mM NADH (bei Raumtemperatur) gestartet und die Extinktion über 3 min in einem Zeitintervall von 10 sec gemessen.

Die Berechnung der Aktivität erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Aktivität/mg Protein} = \frac{\left[ (\Delta OD / \Delta t) * (\text{dilution factor}) * \varepsilon^{-1} * \left( \frac{1}{0,6 \text{ cm}} \right) * (1000 \mu\text{g/mg}) \right]}{\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \text{ Protein}}$$

Tabelle 6: Pipettierschema Reaktionsmedium NADH-Dehydrogenase

Lösung	Arbeitskonzentration	Menge Probe (+)	pro Menge pro Probe (-)
<b>500mM Phosphatpuffer pH=7,5</b>	27mM	54µl	54µl
<b>BSA</b>	2,66mg/ml	2,5µl	2,5µl
<b>1M MgCl<sub>2</sub></b>	5mM	5µl	5µl
<b>100mM KCN</b>	2mM	20µl	20µl
<b>10mM Decylubiquinone</b>	0,1065mM	10,5µl	10,5µl
<b>Antimycin A</b>	0,002 mg/ml	0,8µl	0,8µl
<b>1mM Rotenone</b>	39,9µM	40µl	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>		867µl	907µl

#### Bestimmung der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)

Nach Kalibrierung und Einstellung des vorgewärmten (37°C) Photometers auf 600nm wurden 976µl des Reaktionsmediums pro Mitochondrienisolat in einem 2ml Cup vorgelegt und im 37°C Wärmeblock vorgewärmt. 20µl des Mitochondrienisolates wurden in die Küvette vorgelegt und das erwärmte Reaktionsmedium hinzugegeben und durchmischt. Dieser Ansatz wurde über 5 Minuten bei einem Zeitintervall von 15 Sekunden gemessen. Anschließend wurden 500µl des Reaktionsgemisches aus der Küvette entnommen und mit 4µl 25mM Decylubiquinone vermischt. Dieses Gemisch wurde zurückgegeben in die Küvette



und eine erneute Messung über 5 Minuten bei einem 15 Sekunden Intervall gestartet.

Tabelle 7: Pipettierschema Reaktionsmedium Succinate-Dehydrogenase

Lösung	Menge pro Probe
500mM Phosphatpuffer pH=7,5	50µl
50mg/ml BSA	40µl
200mM Succinate	100µl
5mM DCPIP	10µl
10mM KCN	100µl
10mM ATP	10µl
H <sub>2</sub> O	666µl

Folgende Formel wurde für die Berechnung der Aktivität verwendet:

$$(U/mg) = \frac{\Delta OD(1-60s)_{\text{Reaktionsmessung}} - \Delta OD(1-60s)_{\text{Baselinemessung}}}{19,2 * \text{Gesamtprotein}(mg)}$$

#### Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Die Cytochrom-c-Oxidase katalysiert den letzten Schritt der mitochondrialen Atmungskette und reduziert Sauerstoff durch Cytochrom c.

Die Mitochondrienisolate wurden mit dem Enzymdilutionspuffer (10mM TRIS HCl pH=7,0; 250mM Succrose) auf einen Proteingehalt von 0,5µg/µl verdünnt und 20µl dieser Verdünnung für den Assay eingesetzt. Vor der eigentlichen Messung erfolgte eine Kontrollmessung, um die vollständige Reduktion des Cytochrom c durch DTT zu bestätigen und somit die nachfolgende Reaktion zu ermöglichen. Hierzu wurde die Cytochrom-c-Lösung (2,7mg/ml) mit 5µl 1M DTT versetzt und bei 550nm und 565nm im Photometer gemessen. Die Ratio 550nm/565nm sollte

für reduziertes Cytochrom c zwischen 10 und 20 liegen. Pro Mitochondrienisolat wurde eine Probe mit und ohne Laurylmaltoside vorbereitet. In die Cups wurden 950µl des Assaypuffers (10mM TRIS HCl pH=7,0; 120mM KCl) und 80µl des Enzymdilutionspuffers (+/- Laurylmaltoside) vorgelegt und bei 30°C im Heizblock erwärmt. Kurz vor der photometrischen Messung wurde in die Cups 20µl des verdünnten Mitochondrienisolates hinzugefügt und gemischt. Vor jeder Messung wurde ein BLANK, bestehend aus 950µl Assaypuffer, 100µl Enzymdilutionspuffer und 50µl Cytochrom c gemessen, um einen Kontrollwert für die Menge des reduzierten Cytochrom c zu erhalten. Für die Messung wurden 50µl reduziertes Cytochrom c in die Küvetten vorgelegt und der Ansatz der Cups wurde hinzupipetiert. Die Messung erfolgt bei 550nm mit einem Intervall von 5 Sekunden über die Dauer von einer Minute.

Mittels folgender Formel wurde die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase berechnet:

$$U/ml = \frac{\left[ \frac{\Delta OD}{\Delta t} * dilution\ factor * 1,1 \right]}{Probenvolumen(ml) * 21,84}$$

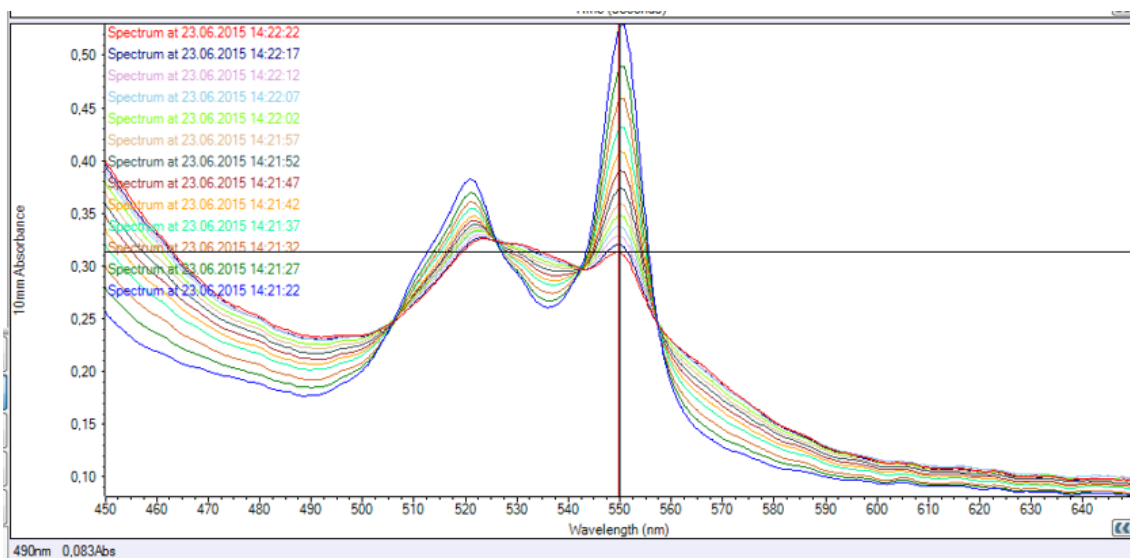


Abbildung 4: Beispielkurve photometrische Bestimmung Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität

### 2.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse

Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Schröder vom zentralen EM-Labor des Instituts für Pathologie an der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg durchgeführt.

Die Fixation des Herzmuskelgewebes erfolgte in Karnovsky-Fixativ (2,5% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer). Anschließend wurden die Proben unter dem Stereomikroskop Wild M3Z (Leica, Wetzlar) zu einer Größe von 1-2mm<sup>3</sup> zugeschnitten und in einem LYNX-Einbettautomat (Leica, Wien) weiter prozessiert: nach 2 Stunden Osmierung wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und infiltriert mit dem flüssigem EPON-Einbettmedium EMBED 812 (Science Services, München). Die prozessierten Proben wurden zur Auspolymerisierung im Wärmeschrank für 2 Tage aufbewahrt.

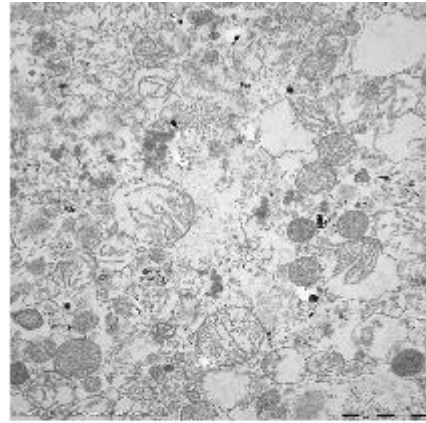
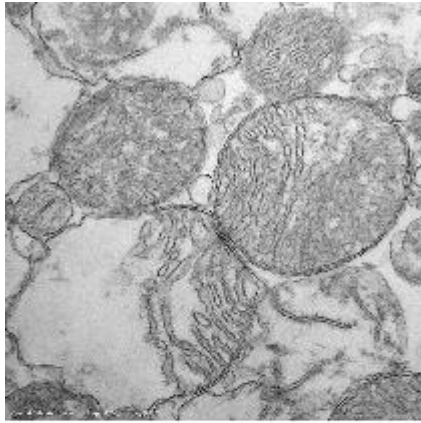
Zunächst wurden von den Proben lichtmikroskopisch auswertbare Orientierungsschnitte (Semidünnschnitte, Doppelfärbung mit Toluidinblau und basisch Fuchsin) mit dem Ultramikrotom mit einer Dicke von 0,75µm angefertigt. Nach Auswertung der Orientierungsschnitte wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70nm erzeugt, welche auf ein EM-Trägernetz (Kupfer-Grid) aufgezogen wurden. Anschließend an die Trocknung wurden die Grids mit Uranylacetat und Bleicitrat für jeweils 10 Minuten kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit einem LEO 912AB Transmissionselektronenmikroskop bei 100kV, die Bilddokumentation mit einer seitlich montierten 2k\*2k CCD-Kamera mit der OSIS-Software i-TEM.

## 3 Ergebnisse

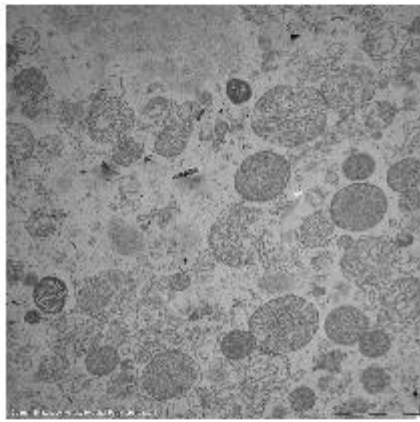
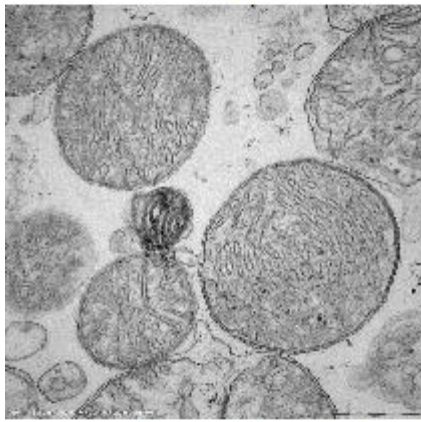
### 3.1 Mitochondrienisolation- Methodenoptimierung

Das Herz eines Kaninchens wiegt im Durchschnitt 1,95 g/kg Körpergewicht (54). Für die hier vorliegenden Arbeit wurde bei der Mitochondrienisolation nur der linke Ventrikel verwendet, welcher mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,29 g/kg Körpergewicht (54) eine begrenzte und erschöpfliche Probenquelle darstellt. Umso wichtiger war die Etablierung einer Methode zur Mitochondrienisolation, die mit einer geringen Menge Probenmaterial eine maximale Ausbeute an Mitochondrien ermöglicht, gleichzeitig aber schonend genug sein muss, dass der Großteil der Mitochondrien intakt bleibt, da sonst Aktivitätsmessungen und auch die Detektion von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran nicht möglich sind. Dieses Gleichgewicht in der Isolation zu finden, war Teil der vorliegenden Arbeit.

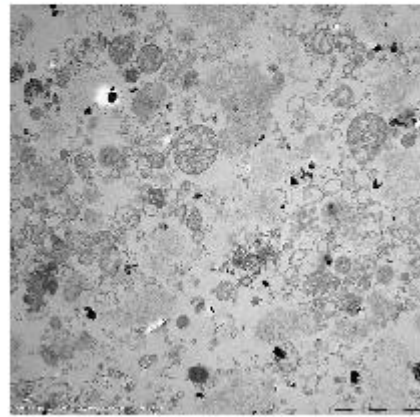
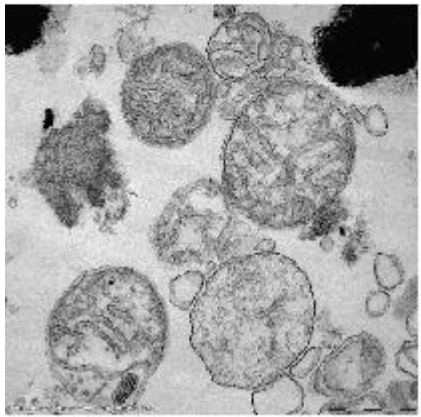
Der Erfolg der Optimierung wurde einerseits durch elektronenmikroskopische Analysen des mitochondrialen Pellets, zum anderen durch Western Blots mit Antikörpern gegen integrative Bestandteile der inneren (Cytochrom C, IMMT) und äußeren Mitochondrienmembran (VDAC2, TOMM70) kontrolliert.



Extraktion nach Palmer et al. (Rattenherz)



Extraktion modifiziert nach Kelly et al. (Rattenherz)



Extraktion modifiziert nach Kelly et al. (Kaninchenherz)

Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien, die nach unterschiedlichen Protokollen isoliert wurden. Übersichtsaufnahme jeweils rechts (Vergrößerung 1250-fach), Detailaufnahme jeweils links (Vergrößerung 5000-fach). Protokolle siehe Kelly et al nach Böhm (55). und Palmer et al. (56)

## 3.2 Proteom-Analyse

In der Proteomanalyse mit dem SWATH-Ansatz wurde für die verschiedenen Vergleiche ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Alle folgenden Vergleiche der Proteine sind signifikant ( $p < 0,05$ ) reguliert, daher wird in den einzelnen Verweisen nicht gesondert darauf hingewiesen. Die Proteine wurden mithilfe der NCBI Datenbank identifiziert und ihre Funktion anhand der UniProt Datenbank ermittelt. Daraufhin wurden die Proteine in sechs verschiedene Stoffwechselgruppen eingeteilt: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Proteine des Stoffwechsels, Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente, Proteine des Fettstoffwechsels, ribosomale Proteine und Transportproteine. Für die Vergleiche ergaben sich jeweils unterschiedliche Proteinzahlen, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 8: Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine. CTRL: Kontrolle, ELVD: frühe linksventrikuläre Dysfunktion (early left ventricular dysfunction), CHF: manifeste Herzinsuffizienz (congestive heart failure), VPI: Vasopeptidase-Inhibitor.

Vergleich	Signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine
CTRL vs. ELVD	199
CTRL vs. CHF	99
ELVD vs. CHF	106
CHF vs. CHF+VPI	223

## 3.2.1 CTRL vs. ELVD

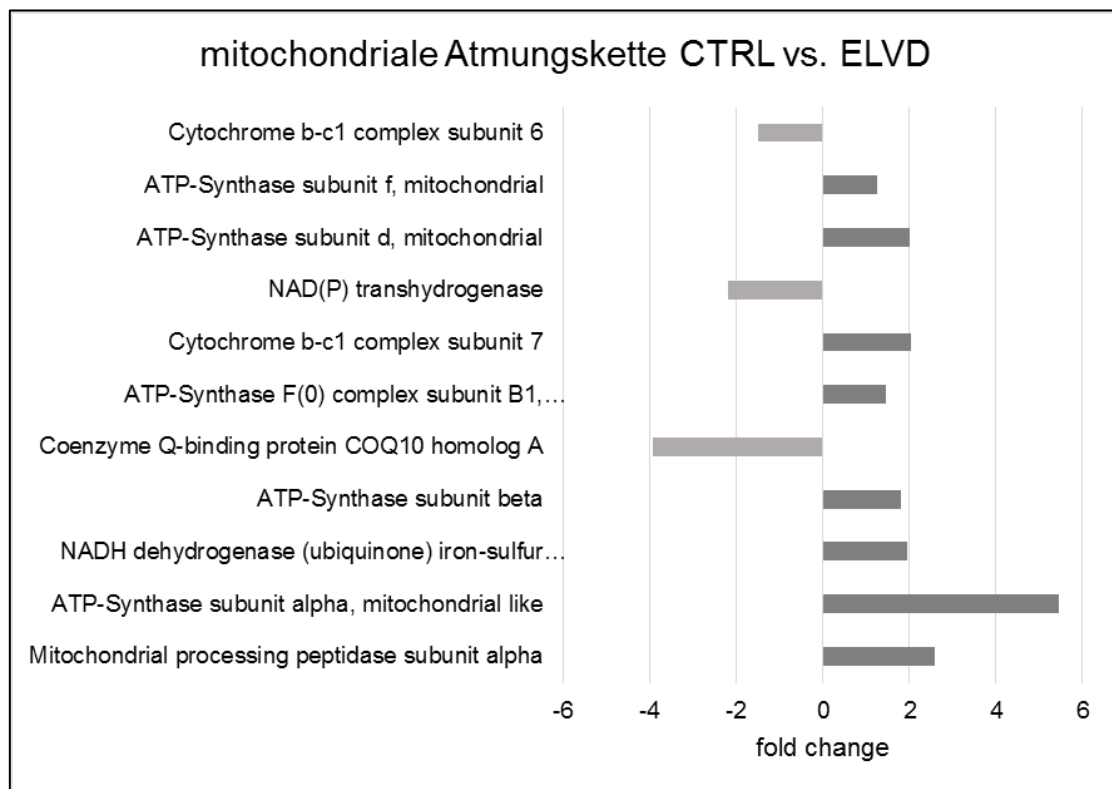


Abbildung 6: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CTRL vs. ELVD

Im Vergleich der Kontrolltiere zu den Tieren mit einer frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD) zeigt sich bei letzteren in der Expression der Proteine der mitochondrialen Atmungskette eine signifikante Hochregulierung der Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V). Zudem liegt eine deutliche Erniedrigung der Expression des Coenzyme Q-binding protein COQ10 vor, welches für die Funktion des Coenzym Q in der mitochondrialen Atmungskette essentiell ist.

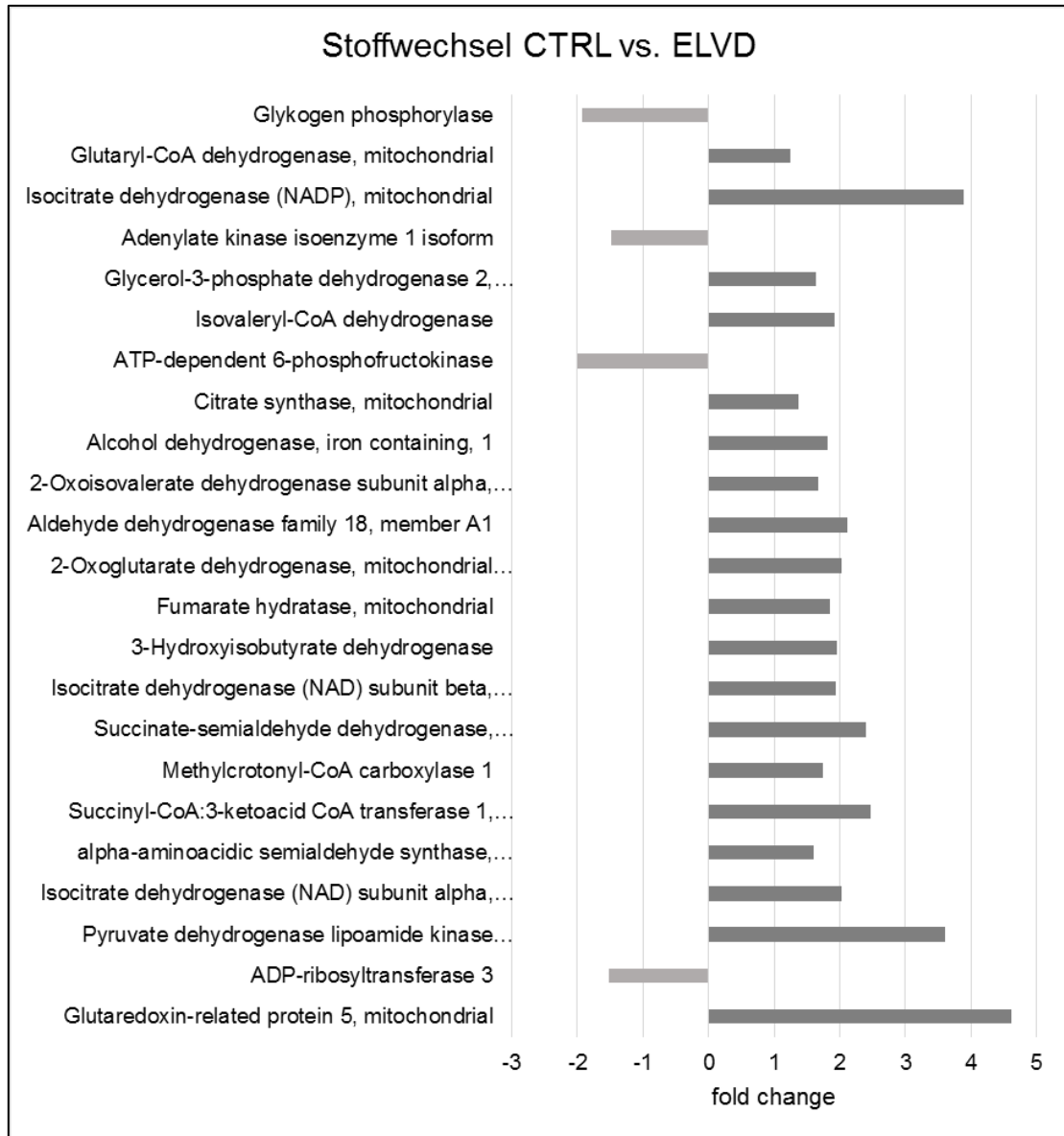


Abbildung 7: Stoffwechselproteine, Vergleich CTRL vs. ELVD

Die Enzyme des Citratzyklus (Isocitrat-Dehydrogenase, Citratsynthase, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, Fumarat-Hydratase) sind in den Tieren mit einer frühen ventrikulären Dysfunktion (ELVD) im Gegensatz zu den Kontrolltieren signifikant erhöht. Die ATP-abhängige 6-Phosphofructokinase, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse katalysiert, ist im Stadium der linksventrikulären Dysfunktion um das 2-fache erniedrigt. Eine Expressionserhöhung



in der ELVD ist auch bei der Pyruvat-Dehydrogenase, als wichtiges Verbindungsenzym der Glykolyse und des Citratzyklus, mit einem fold change von 3,6 signifikant zu erkennen.

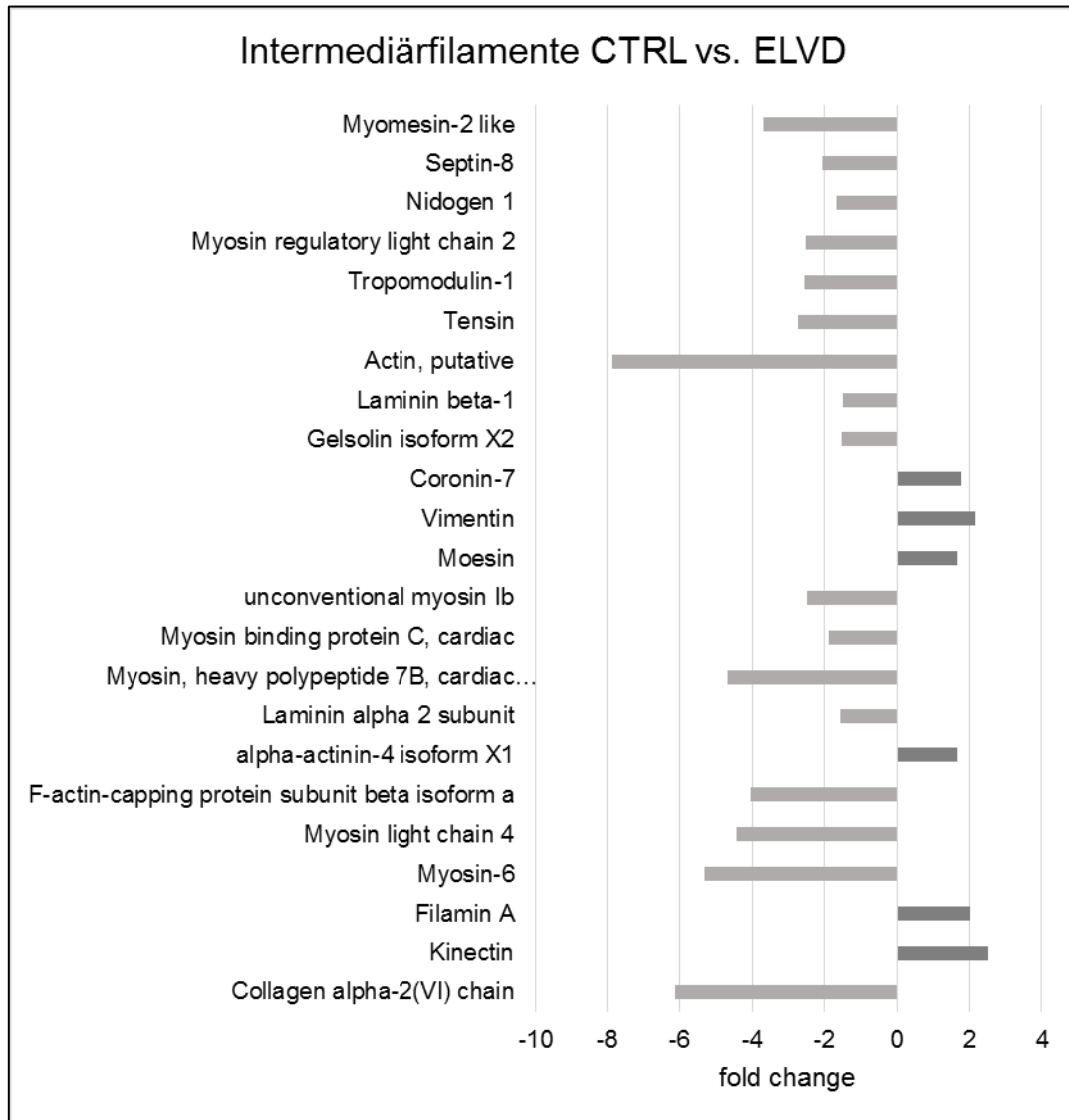


Abbildung 8: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente, Vergleich CTRL vs. ELVD

Im Verlauf der frühen ventrikulären Dysfunktion (ELVD) kommt es zu einer signifikanten Erniedrigung der Expression der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente mit einem fold change zwischen -1 und -7,6. Gegenätzlich ist unter anderem Filamin A reguliert, verantwortlich für die Quervernetzung der

Aktinfilamente, mit einer Expressionserhöhung in der ELVD um das 2-fache, wie auch Vimentin.

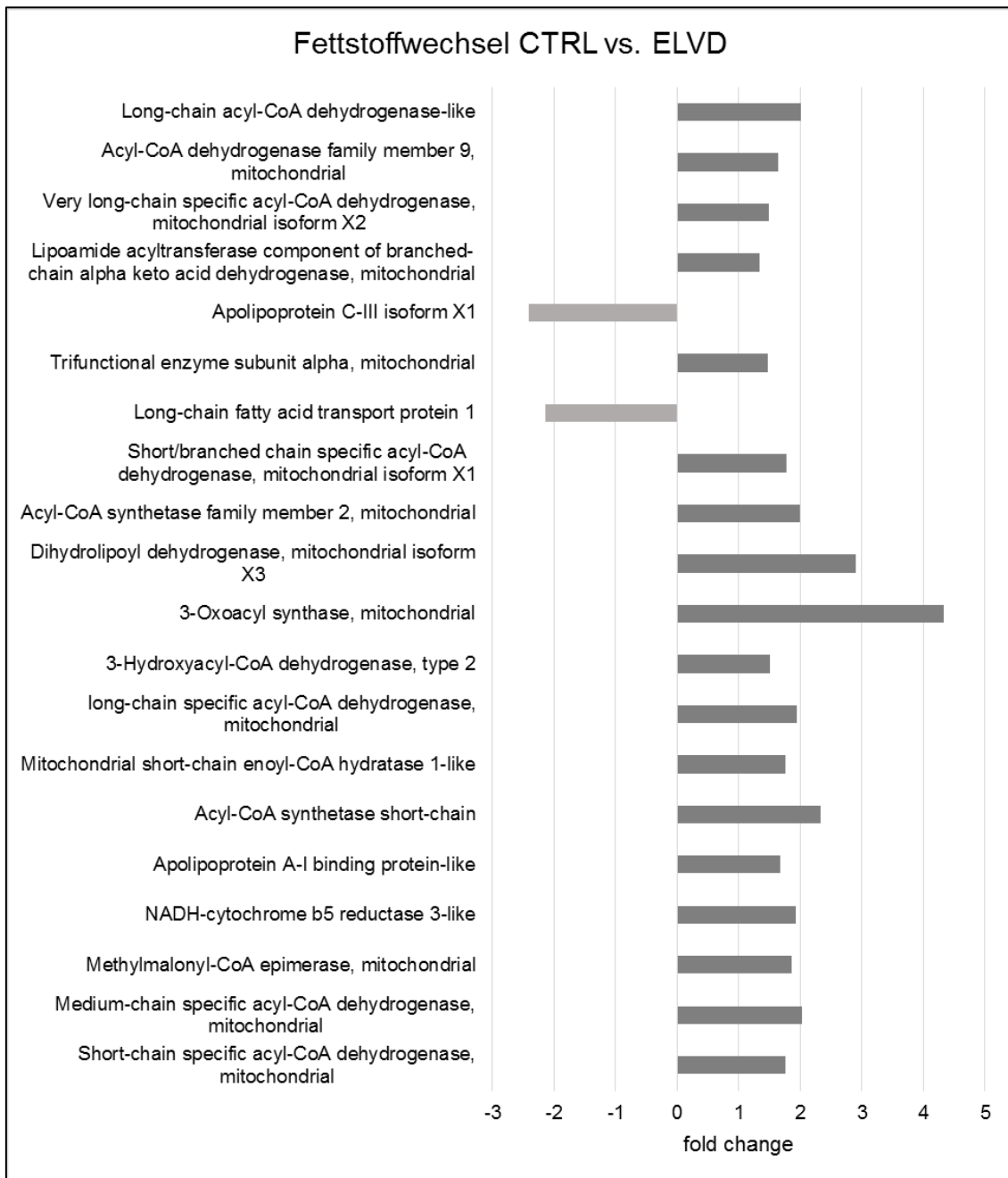


Abbildung 9: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CTRL vs. ELVD

Sowohl Proteine der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Acyl-CoA-Dehydrogenasen), als auch Proteine der Synthese von aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoA-Synthetasen) sind in der frühen linksventrikulären Dysfunktion deutlich um das 1-4,2fache nach oben exprimiert.

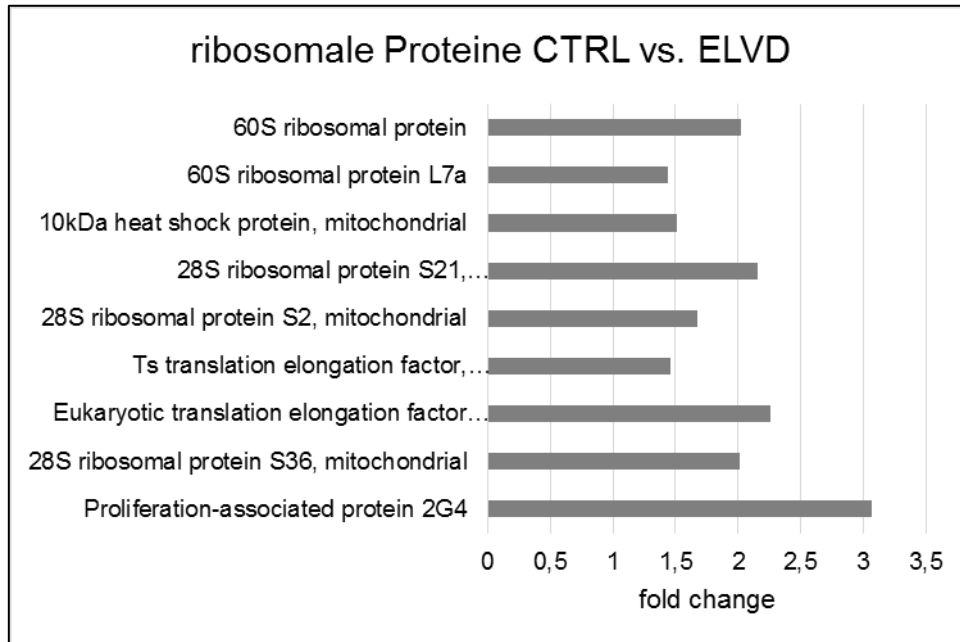


Abbildung 10: Ribosomale Proteine, Vergleich CTRL vs. ELVD

Im Stadium der frühen linksventrikulären Dysfunktion sind die ribosomalen Proteine der großen Untereinheit (60S) 1,3-2-fach in ihrer Expression signifikant erhöht, die Proteine der kleinen Untereinheit (28S) weisen eine Erhöhung um das 1,7-2,2-fache auf.

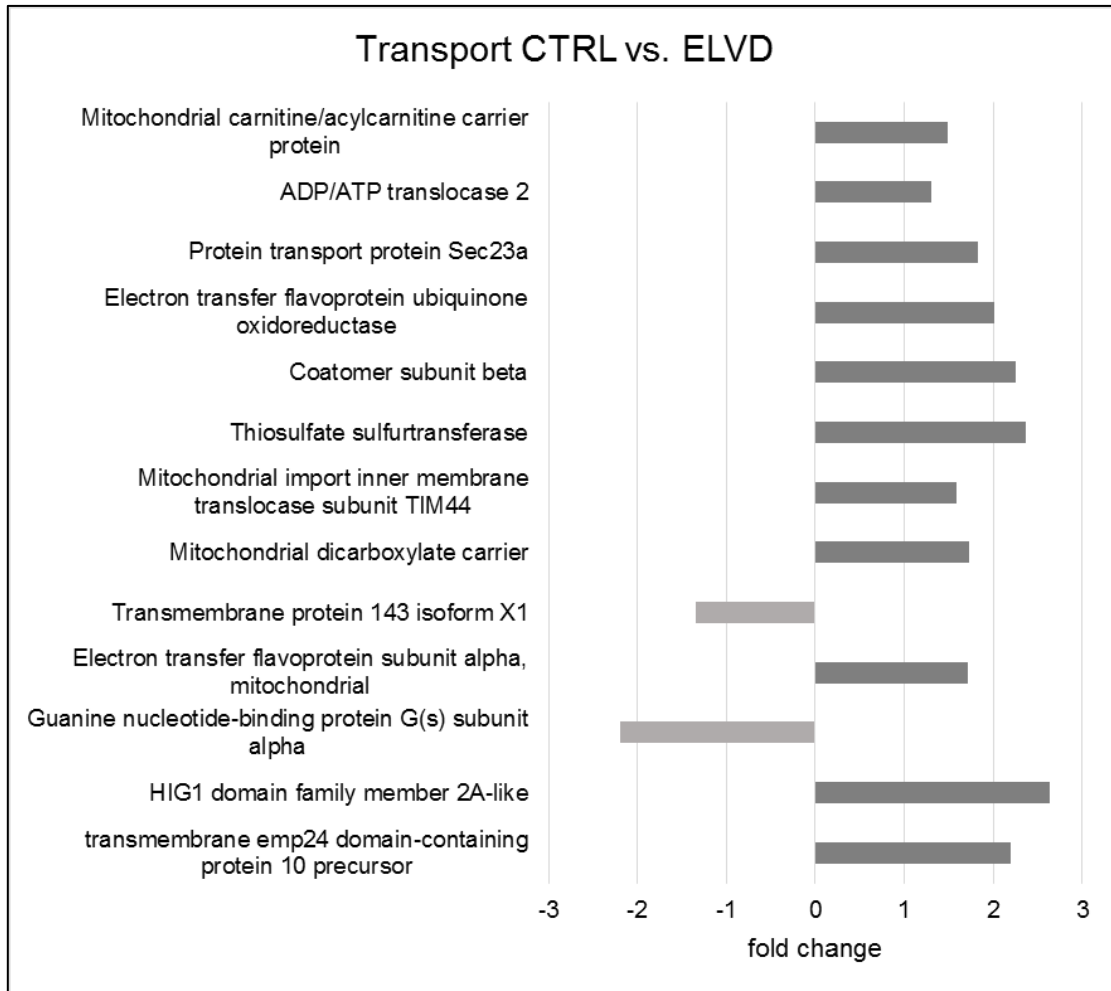


Abbildung 11: Transportproteine, Vergleich CTRL vs. ELVD

Die Expression der Transportproteine ist in der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD) signifikant erhöht mit einem fold change zwischen 1,3 und 2,6. Das Transmembranprotein 143 ist um das 1,3-fache erniedrigt, wie auch das Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha um das 2,2-fache.

## 3.2.2 CTRL vs. CHF

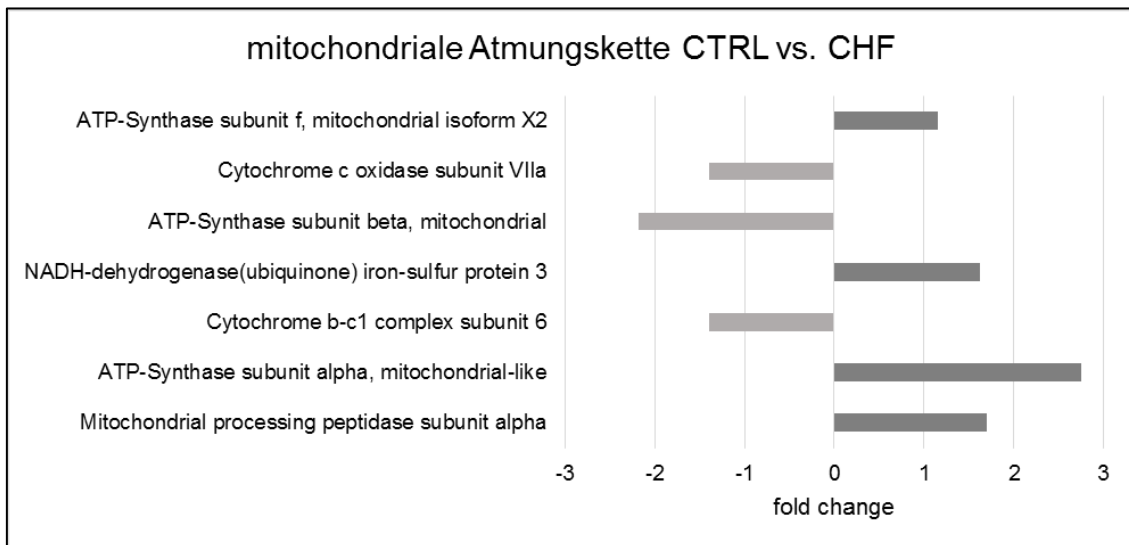


Abbildung 12: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CTRL vs. CHF

Im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) sind die Proteine des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (NADH-Dehydrogenase) signifikant um das 1,6-fache erhöht. Bei dem Komplex III (Cytochrom-c-Oxidase) kann man eine deutliche Verminderung der Expression um den Faktor 1,4 feststellen. Die Proteine der ATP-Synthase-Untereinheiten (Komplex V) sind unterschiedlich exprimiert: Die alpha- und die f- Untereinheit sind um das 2,8 bzw. 1,2-fache erhöht, wohingegen die beta-Untereinheit um das 2,2-fache erniedrigt ist.

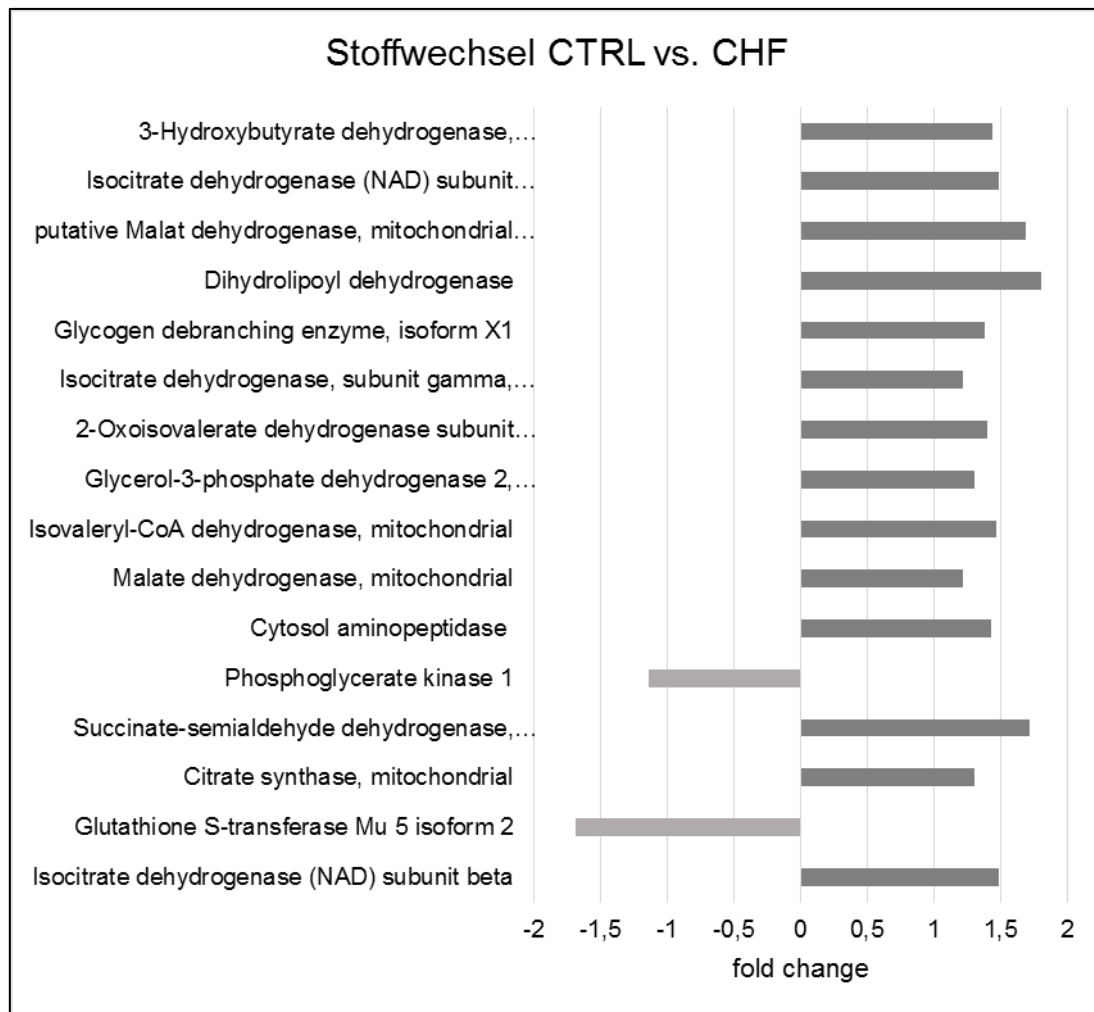


Abbildung 13: Stoffwechselproteine, Vergleich CTRL vs. CHF

In der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) sieht man signifikante Veränderungen der Expression der Stoffwechselproteine. Die Proteine des Citratzyklus (Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase) sind um das 1,2-1,7fache in der Expression erhöht. Die Phosphoglycerat-Kinase, ein wichtiges Enzym der Glykolyse ist mit einem fold change von -1,2 signifikant reduziert. Sowohl die Proteine des Ketonkörperstoffwechsels (z.B. 3-Hydroxybuttersäure) als auch die Proteine des Glykogenstoffwechsels (Glykogen debranching enzyme) sind um das 1,4fache erhöht in der manifesten Herzinsuffizienz.

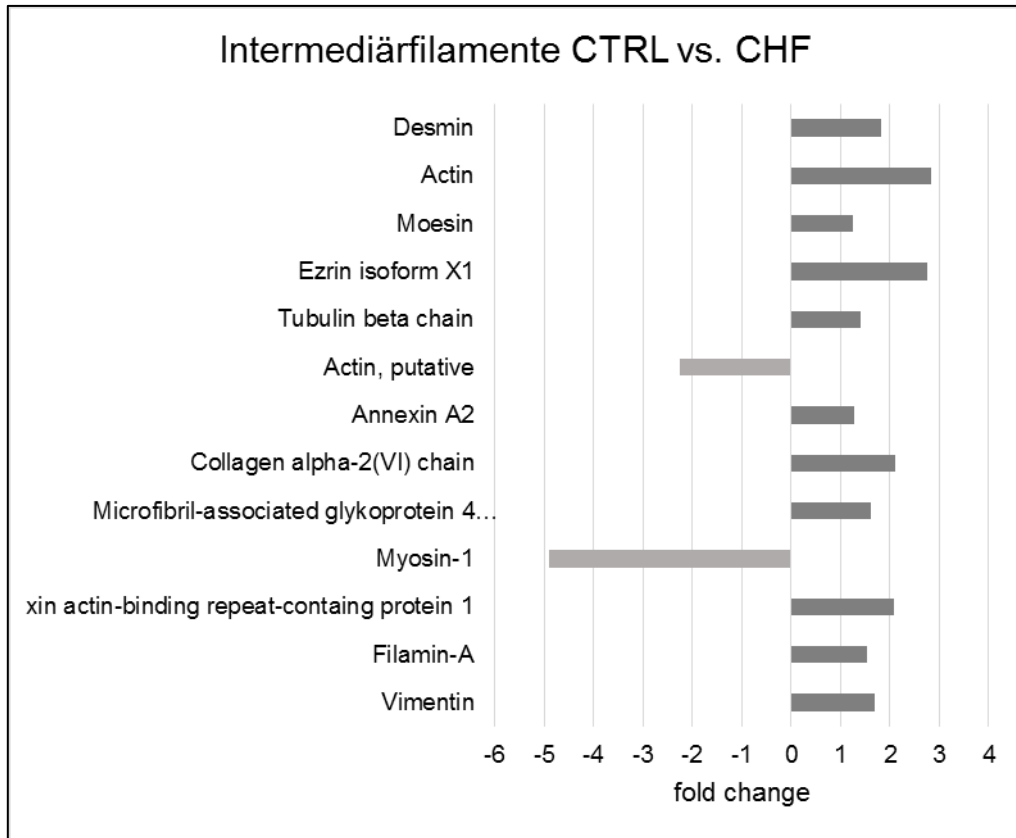


Abbildung 14: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich CTRL vs. CHF

Im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) sind die Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente signifikant um das 1,2 bis 2,8-fache in der Expression gesteigert. Myosin-1, ein Motorprotein lokalisiert in den Myofibrillen des Muskels und Teil des kontraktile Apparats, ist deutlich um das 4,8-fache vermindert.

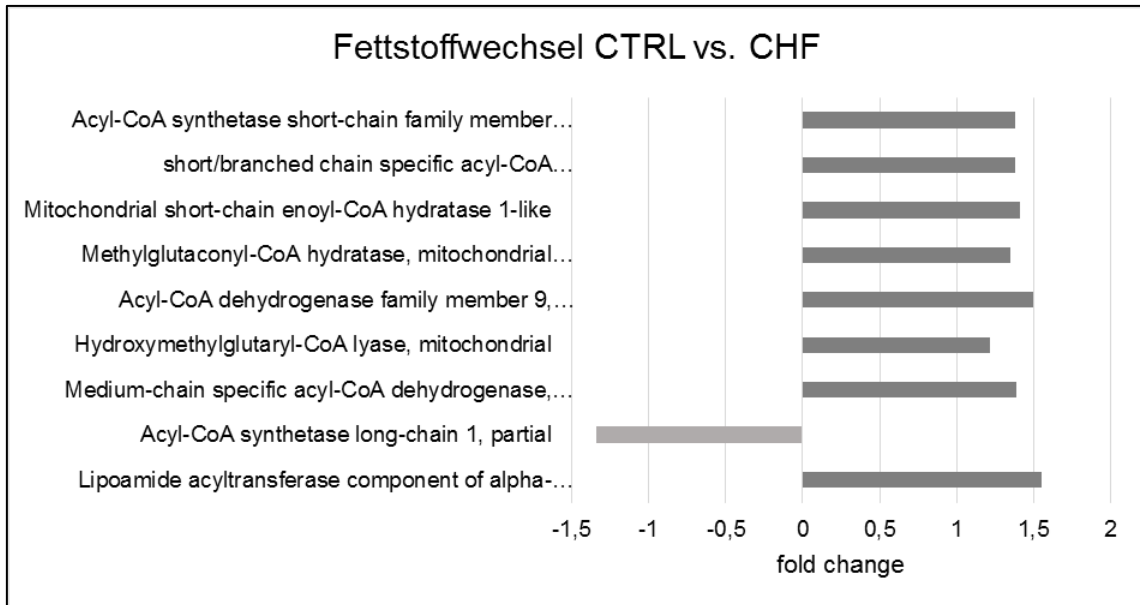


Abbildung 15: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CTRL vs. CHF

Die Proteine des Fettstoffwechsels sind in der manifesten Herzinsuffizienz signifikant hochreguliert. Die Acyl-Dehydrogenasen, Teil der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, sind um das 1,3-1,5-fache erhöht. Umgekehrt sind auch die Proteine der Bildung von aktivierten Fettsäuren, die Acyl-CoA-Synthetasen, mit Ausnahme der Acyl-CoA-Synthetase long-chain 1, signifikant um das 1,4-fache gesteigert.



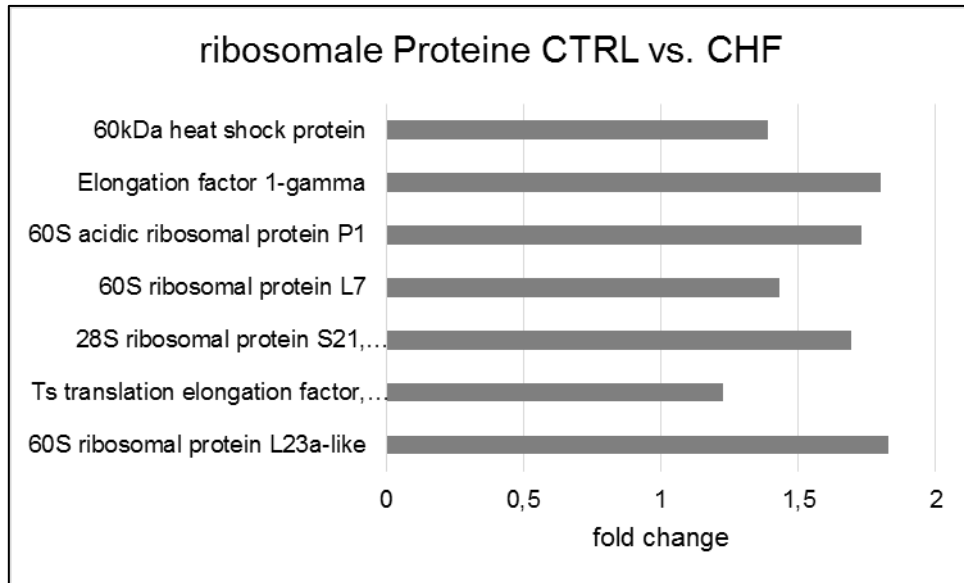


Abbildung 16: Ribosomale Proteine, Vergleich CTRL vs. CHF

Die Proteine der Elongationsfaktoren sind im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) signifikant um das 1,8-fache nach oben reguliert. Ebenso sind die Proteine der kleinen (28S) und der großen ribosomalen Einheit mit einem fold change zwischen 1,4 und 1,8 in ihrer Expression erhöht.

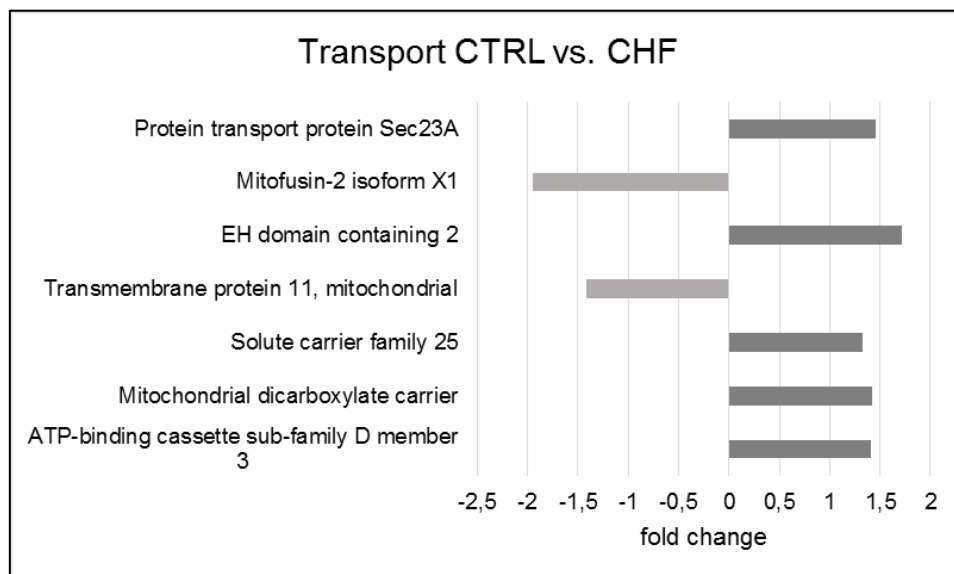


Abbildung 17: Transportproteine, Vergleich CTRL vs. CHF

Bei den Transportproteinen zeigt sich in der manifesten Herzinsuffizienz im Gegensatz zu den Kontrolltieren sowohl eine Erhöhung der Expression (z.B. Mitochondrial dicarboxylate carrier) als auch eine Reduktion der Expression (z.B. Mitofusin-2 isoform X1).

### 3.2.3 EVLD vs. CHF

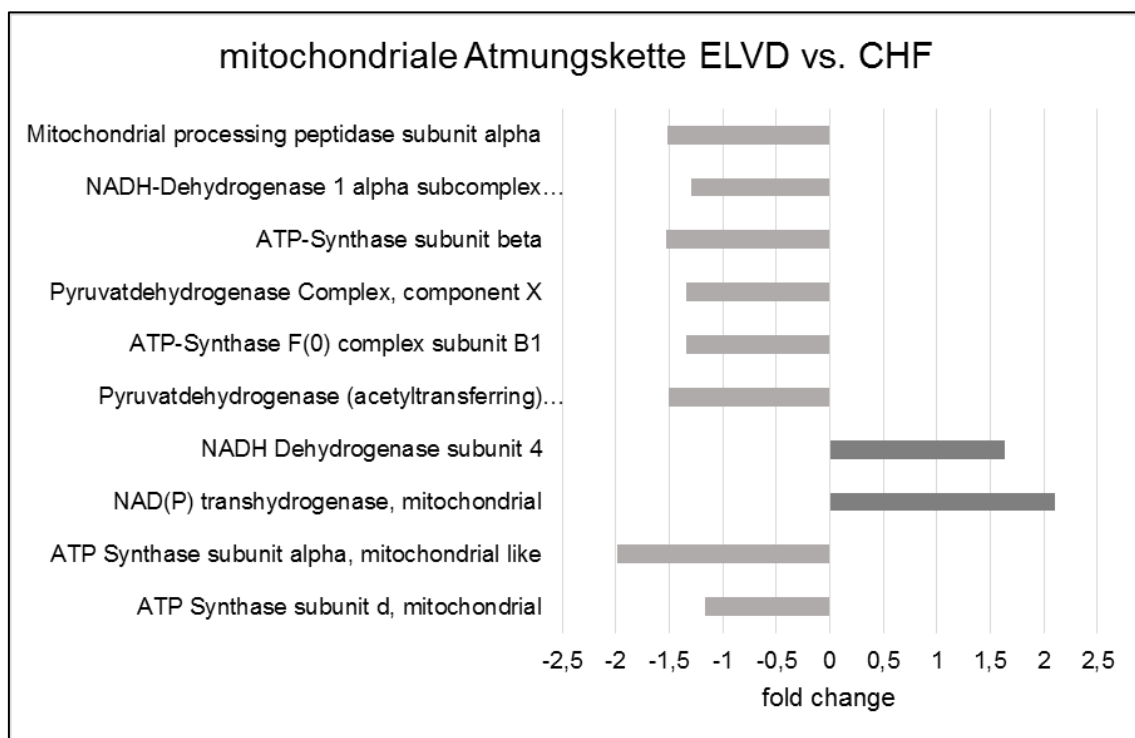


Abbildung 18: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich ELVD vs. CHF

Im Vergleich der frühen linksventrikulären Dysfunktion zur Herzinsuffizienz zeigt sich in den Proteinen der mitochondrialen Atmungskette eine deutliche Reduktion der Expression in der Herzinsuffizienz. Der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Dehydrogenase, ist signifikant um das 1,3-fache nach unten reguliert, wohingegen die Untereinheit 4 der NADH-Dehydrogenase eine Expressionserhöhung um das 1,6-fache erfährt. Die *mitochondrial processing peptidase*, ein Teil des Komplexes III, ist im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz mit einem fold change von -1,5 deutlich vermindert. Der Komplex V, die

ATP-Synthase, ist in allen Untereinheiten in der Progression der Herzinsuffizienz in der Expression reduziert um das 1,2-1,5-fache.

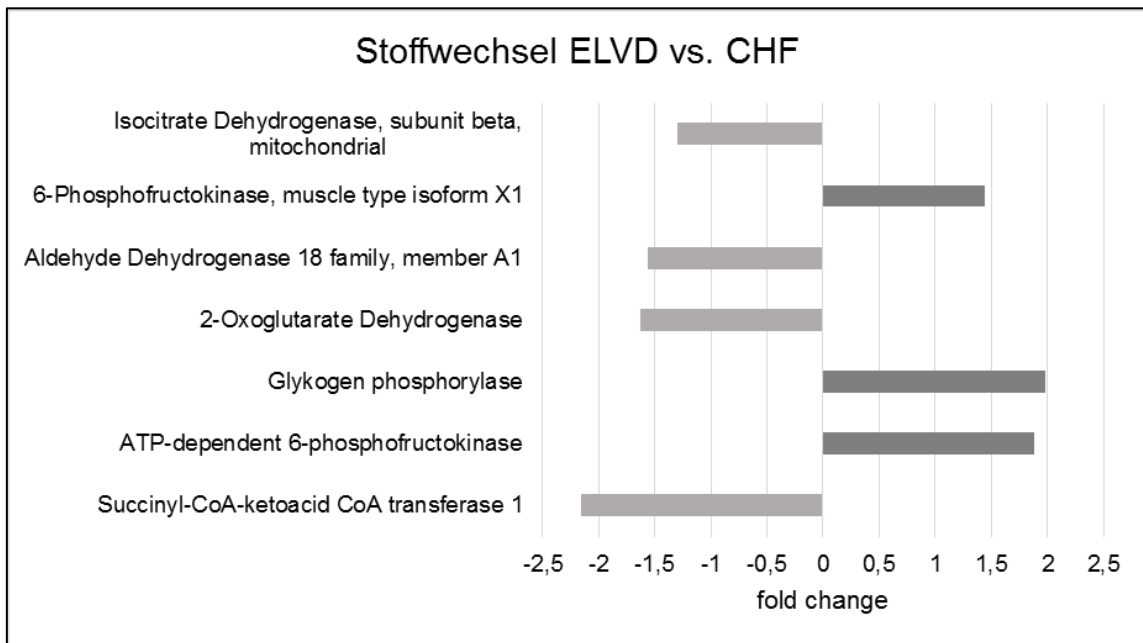


Abbildung 19: Stoffwechselproteine, Vergleich ELVD vs. CHF

Die Proteine des Citratzyklus (Isocitrat-Dehydrogenase, 2-Oxoglutarate-Dehydrogenase) sind im Verlauf der progressiven Herzinsuffizienz signifikant um das 1,3-1,6-fache vermindert. Die 6-Phosphofruktokinase, Teil der Glykolyse, ist in der Herzinsuffizienz gegenüber der frühen linksventrikulären Dysfunktion in ihrer Expression mit einem fold change von 1,4-1,9 deutlich gesteigert. In der Progression zeigt sich zudem eine Reduktion der Expression im Ketonkörperabbau (Succinyl-CoA-ketoacid CoA transferase) um das 2,2-fache.

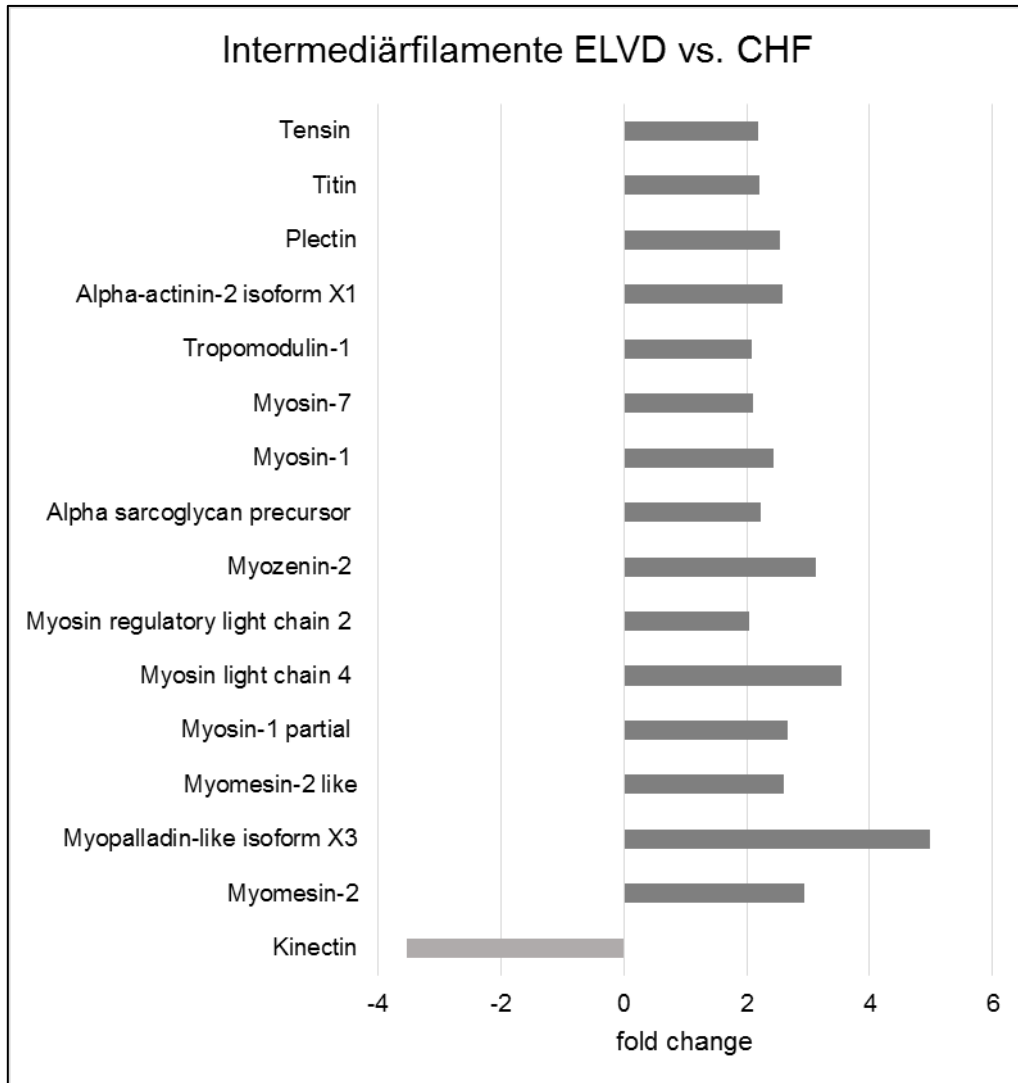


Abbildung 20: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich ELVD vs. CHF

In der Progression der Herzinsuffizienz zeigt sich in der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) eine deutliche Expressionserhöhung der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente um das 2-5-fache im Gegensatz zur frühen linksventrikulären Dysfunktion.

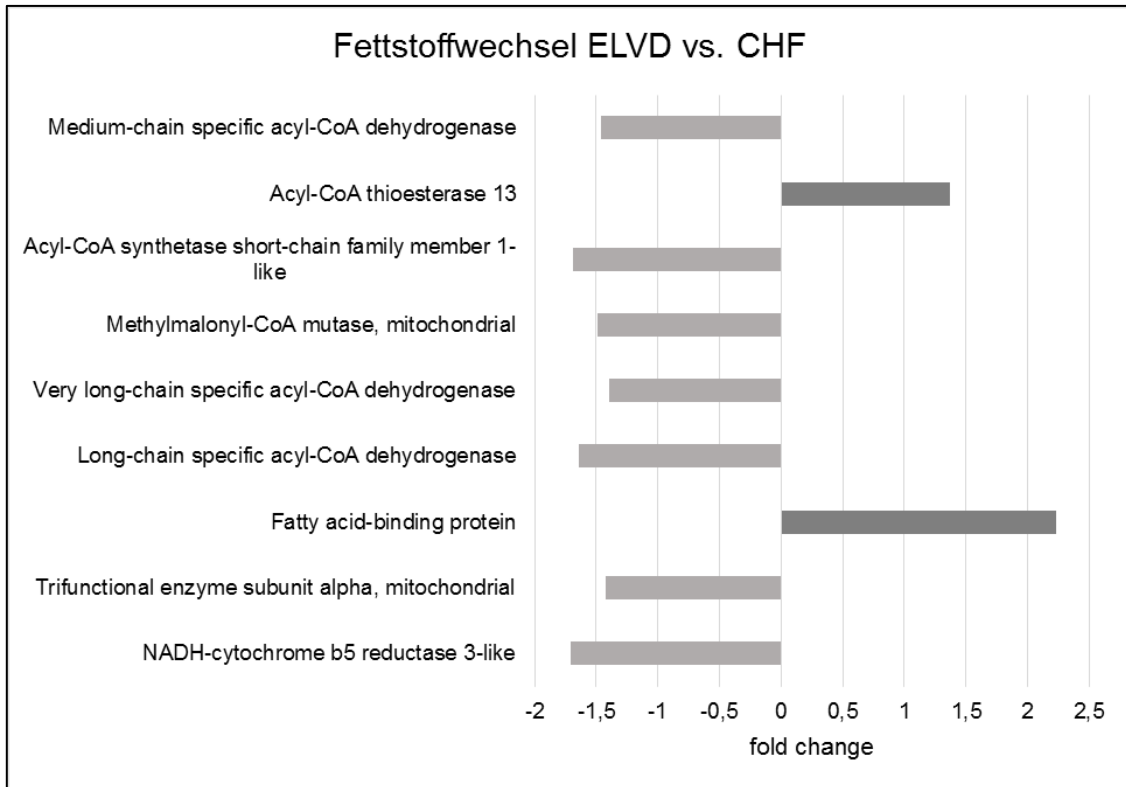


Abbildung 21: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich ELVD vs. CHF

Die Proteine des Fettstoffwechsels sind im Verlauf der manifesten Herzinsuffizienz (CHF) signifikant nach unten reguliert. Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen, Proteine der  $\beta$ -Oxidation, sind um das 1,4-1,6-fache nach unten exprimiert im Gegensatz zum Stadium der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD). Die Proteine der Synthese von aktivierten Fettsäuren, die Acyl-CoA-Synthetasen, sind in der Progression von der ELVD zur CHF um mehr als das 1,5-fache in ihrer Expression reduziert. Eine deutliche Expressionserhöhung mit einem fold change von 2,2 ist bei dem *fatty acid-binding protein* zu finden, einem Transportprotein für Fettsäuren und andere lipophile Substanzen.

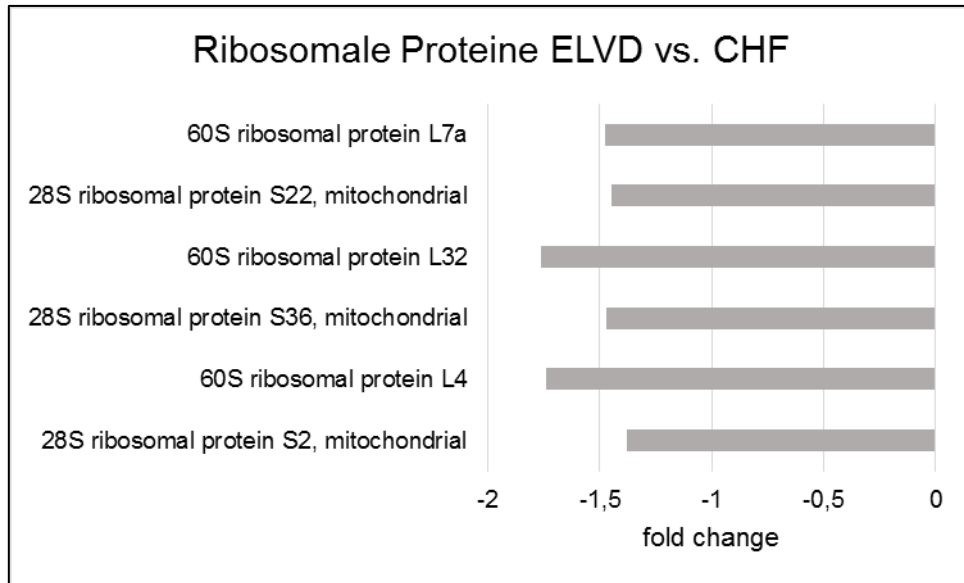


Abbildung 22: Ribosomale Proteine, Vergleich ELVD vs. CHF

Sowohl die Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit (28S) sind in der Progression von der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD) zur manifesten Herzinsuffizienz (CHF) in ihrer Expression um das 1,4-1,5-fache reduziert, als auch die Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (60S) um das 1,4-1,7-fache.

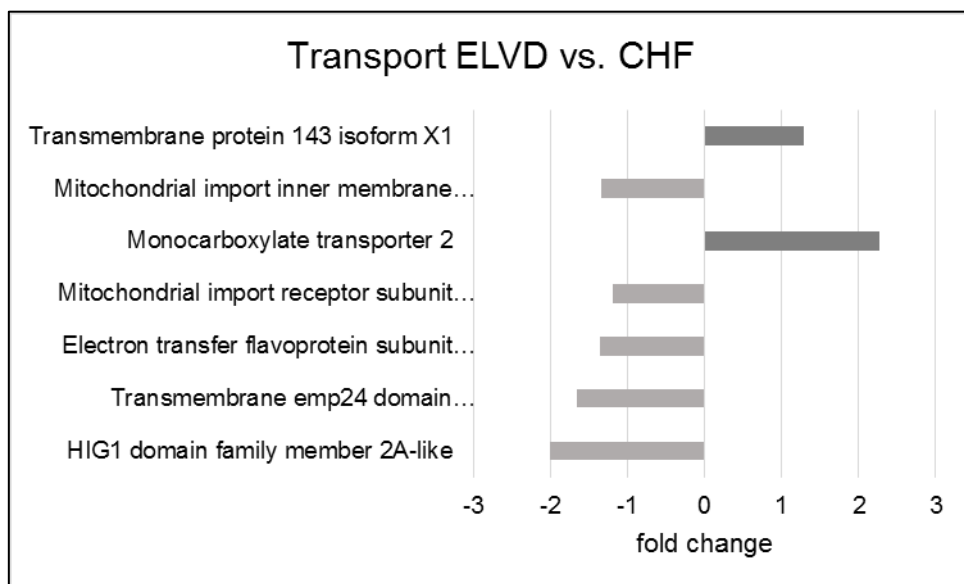


Abbildung 23: Transportproteine, Vergleich ELVD vs. CHF

Im Verlauf der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD) zur manifesten Herzinsuffizienz (CHF) erfahren die Transportproteine eine Reduktion ihrer Expression um das 1,2-2fache. Ausnahmen hierbei bilden das Transmembranprotein 143 mit einer Erhöhung der Expression mit einem fold change von 1,3 und der Monocarboxylate Transporter 2 mit einer Steigerung um das 2,2fache.

### 3.2.4 CHF vs. CHF+VPI

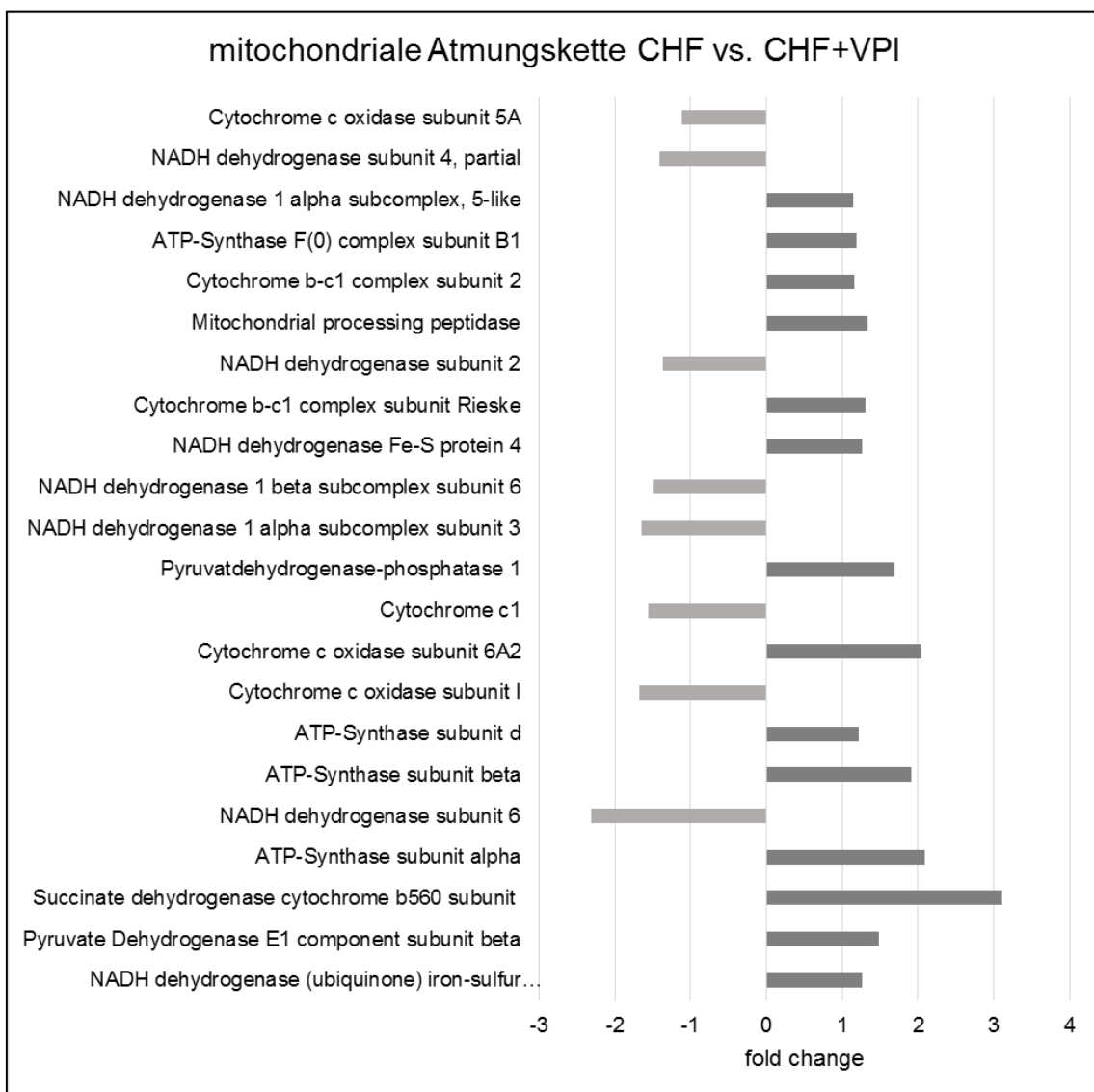


Abbildung 24: Proteine der mitochondrialen Atmungskette, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Durch die Behandlung mit dem Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Expression der Atmungskettenenzyme mit einem fold change zwischen 1,3 und 3,1. So werden die Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V) um das 1,2 bis 2-fache signifikant hochreguliert. Die NADH-Dehydrogenase, der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, ist im Gegensatz zu den Enzymen der anderen Komplexe signifikant um das 1,4- bis 2,3-fache herunterreguliert.

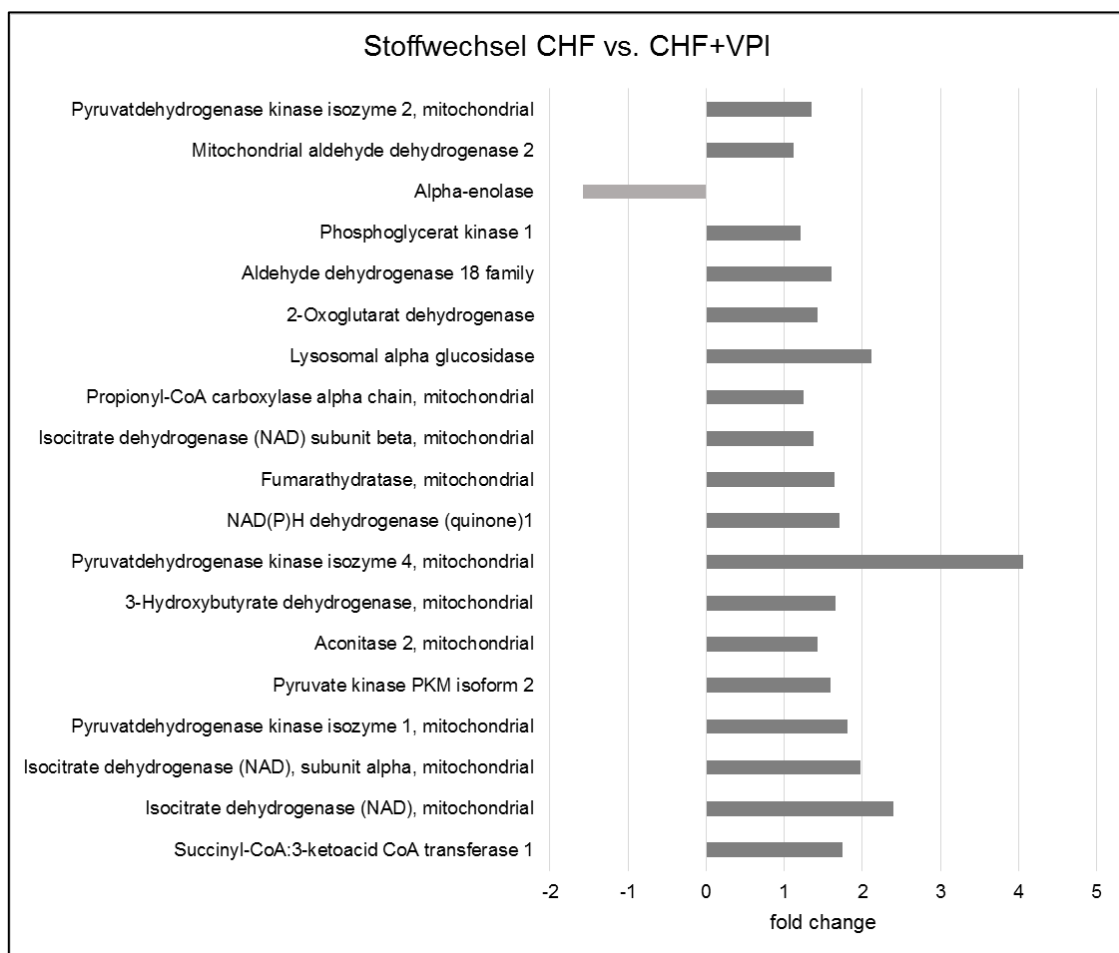


Abbildung 25: Stoffwechselproteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Die metabolischen Proteine werden unter einer Therapie mit Omapatrilat in der manifesten Herzinsuffizienz signifikant hochreguliert, mit Ausnahme der alpha-Enolase, welche einen Schritt der Glykolyse katalysiert.



Weitere Proteine der Glykolyse (Pyruvatkinase, Phosphoglyceratkinase) sind durch die Therapie mit dem Vasopeptidaseinhibitor um das 1,2-1,6-fache hochreguliert. Der Citratzyklus, vertreten mit den Proteinen Isocitrat-Dehydrogenase, Aconitase und Fumarathydratase, wird unter der Therapie um das 1,4-2,4-fache in der Proteinexpression gesteigert. Zu der Erhöhung der Stoffwechselwege der Glykolyse und des Citratzyklus ist auch das verbindende Enzym, die Pyruvatdehydrogenase, deutlich nach oben reguliert.

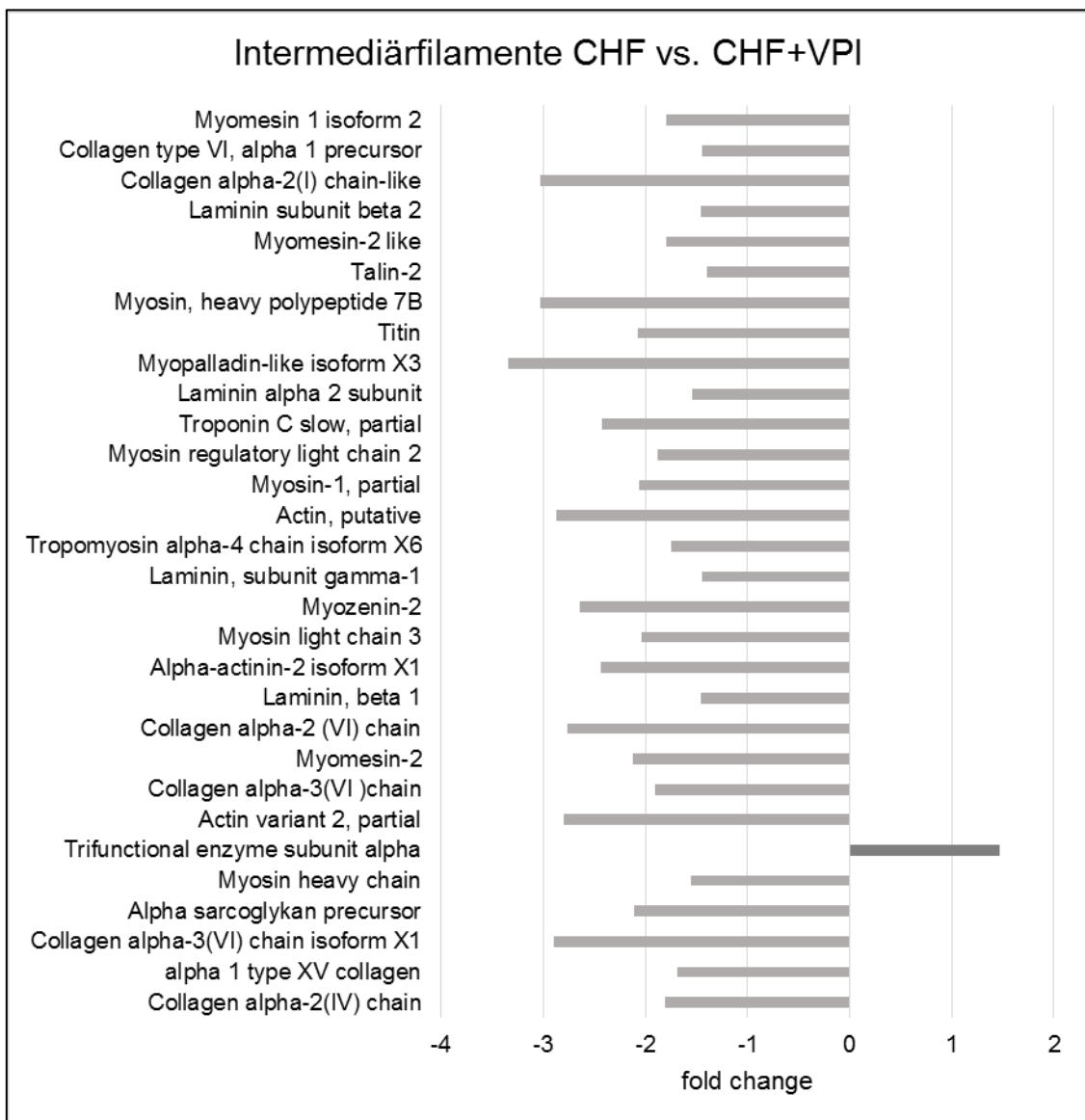


Abbildung 26: Proteine der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Die mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente sind durch eine Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor Omapatrilat deutlich herunterreguliert.

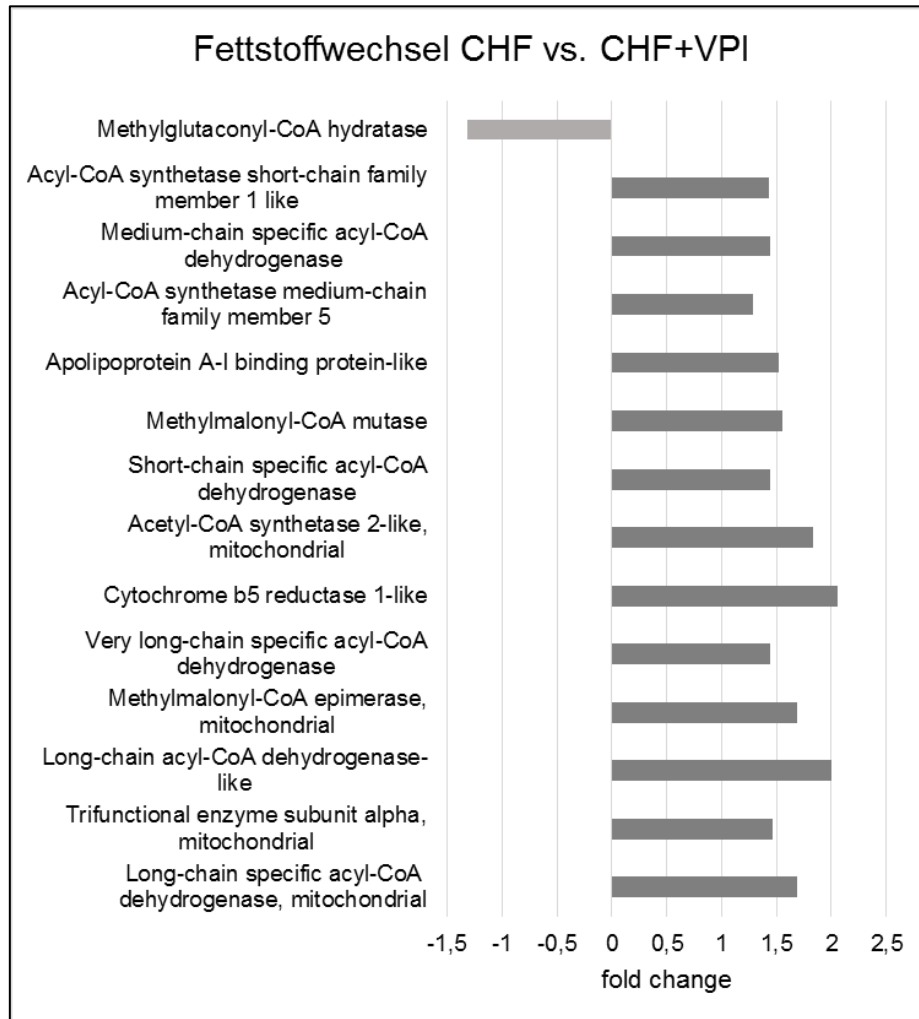


Abbildung 27: Proteine des Fettstoffwechsels, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Unter einer Therapie mit dem Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat ist eine signifikante Erhöhung der Expression der Proteine des Fettstoffwechsels festzustellen. Sowohl der Abbau von Fettsäuren durch die  $\beta$ -Oxidation und deren Proteine (z.B. Long-chain Acyl-CoA-Dehydrogenase, Short-chain specific Acyl-CoA-Dehydrogenase) ist mit einem fold change von 1,4 bis 2 in der Expression erhöht, als auch die Bildung von aktivierten Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetase mit einer Expressionserhöhung um das 1,3 bis 1,8-fache.

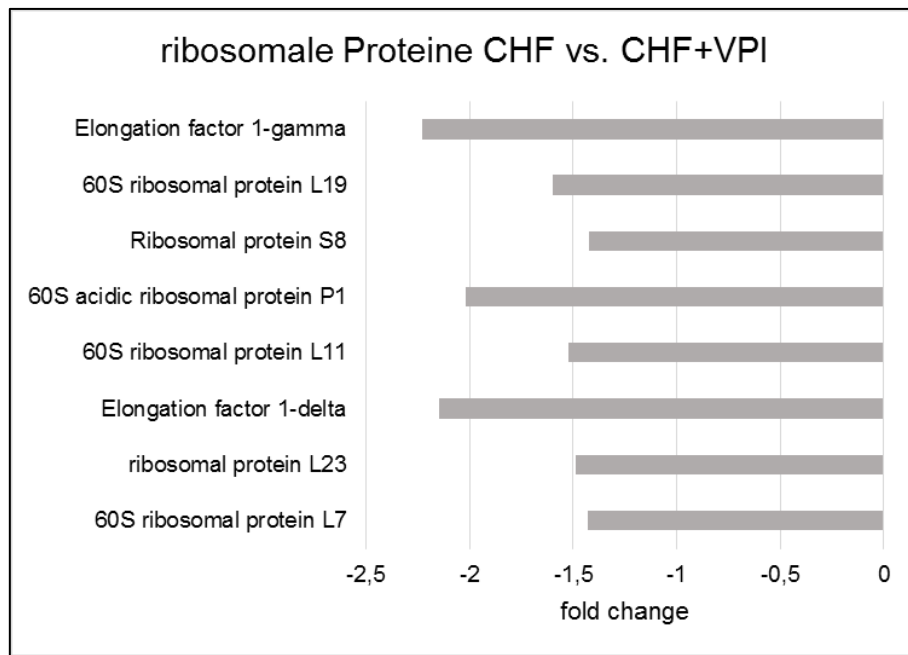


Abbildung 28: Ribosomale Proteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Die ribosomalen Proteine sind durch die VPI-Behandlung in ihrer Expression signifikant herunter reguliert. Die Elongationsfaktoren 1-delta und 1-gamma sind unter Therapie um mehr als das 2-fache reduziert, wohingegen die Proteine der großen ribosomalen Untereinheit einen fold change zwischen -1,4 und -2 erreichen.

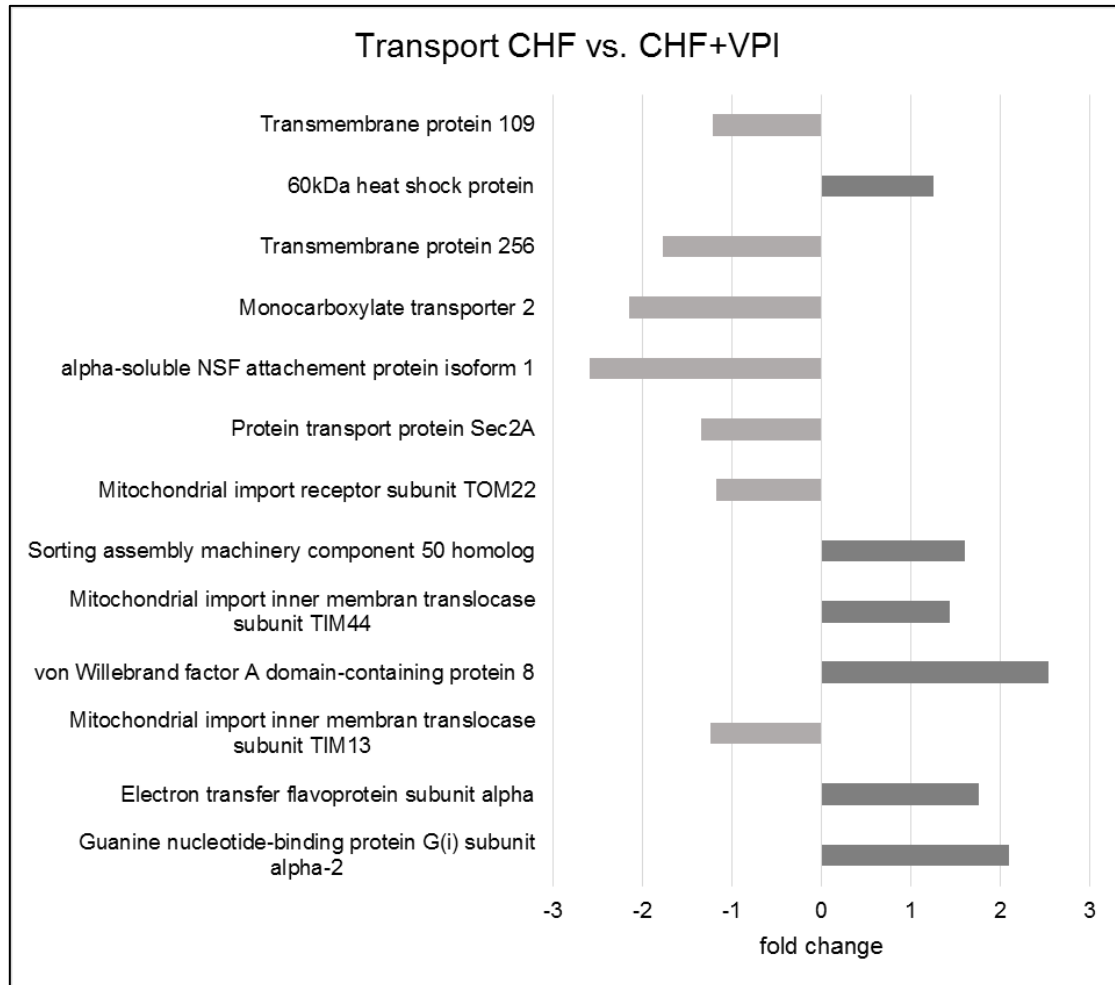


Abbildung 29: Transportproteine, Vergleich CHF vs. CHF+VPI

Die Translokasen der inneren Mitochondrienmembran zeigen in ihren Untereinheiten durch die Behandlung mit Omapatrilat eine unterschiedliche Veränderung der Expression: Die *mitochondrial import inner membran translocase subunit TIM44* zeigt eine Erhöhung um das 1,4-fache, die *mitochondrial import inner membran translocase subunit TIM13* eine Erniedrigung um den Faktor 1,2. Die Transmembranproteine sind in ihrer Expression unter VPI-Therapie einheitlich nach unten reguliert.

## 3.2.5 Zusammenfassung Proteom Analyse

	CTRL vs. ELVD	ELVD vs. CHF	CHF vs. CHF+VPI	CTRL vs. CHF
<b>Atmungskette:</b>				
<b>Komplex I</b>	↑	↓	↓	↑
<b>Komplex II</b>			↑	
<b>Komplex III</b>	↑	↓	↑	↓
<b>Komplex IV</b>			↑↓	
<b>Komplex V</b>	↑	↓	↑	↑
<b>Citratzyklus</b>	↑	↓	↑	↑
<b>Glykolyse</b>	↓	↑	↑	↓
<b>β-Oxidation</b>	↑	↓	↑	↑
<b>Fettsäuresynthese</b>	↑	↓	↑	↑
<b>Intermediärfilamente</b>	↓	↑	↓	↑
<b>Ribosomale Proteine</b>	↑	↓	↓	↑
<b>Transportproteine</b>	↑	↓	↑↓	↑↓
<b>Gesamtzahl differentiell exprimierter Proteine</b>	199	106	223	99

### 3.3 Elektronenmikroskopische Analysen

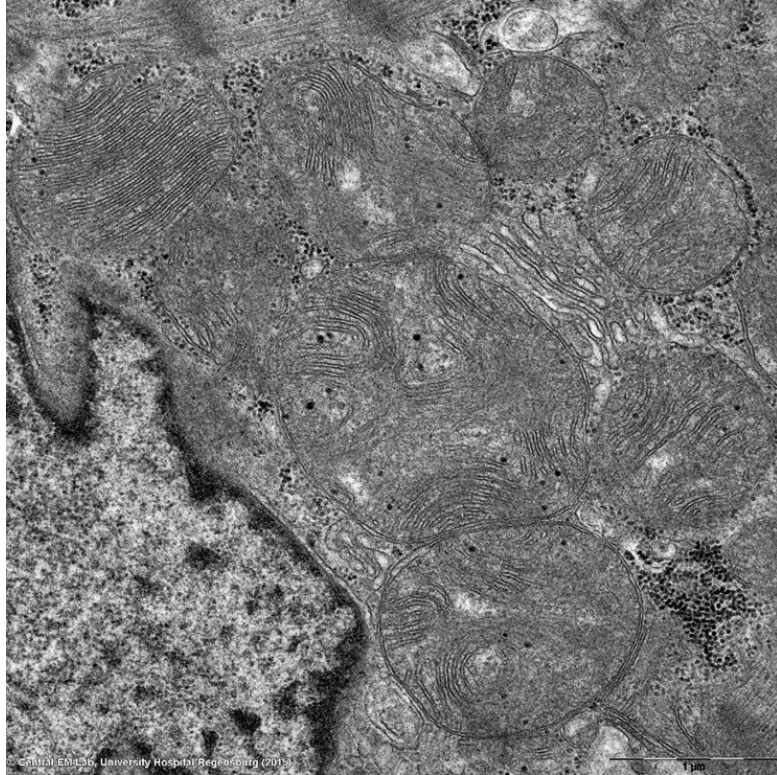


Abbildung 30: Herzmuskelgewebe mit normalen Mitochondrien (Vergrößerung 1250-fach).

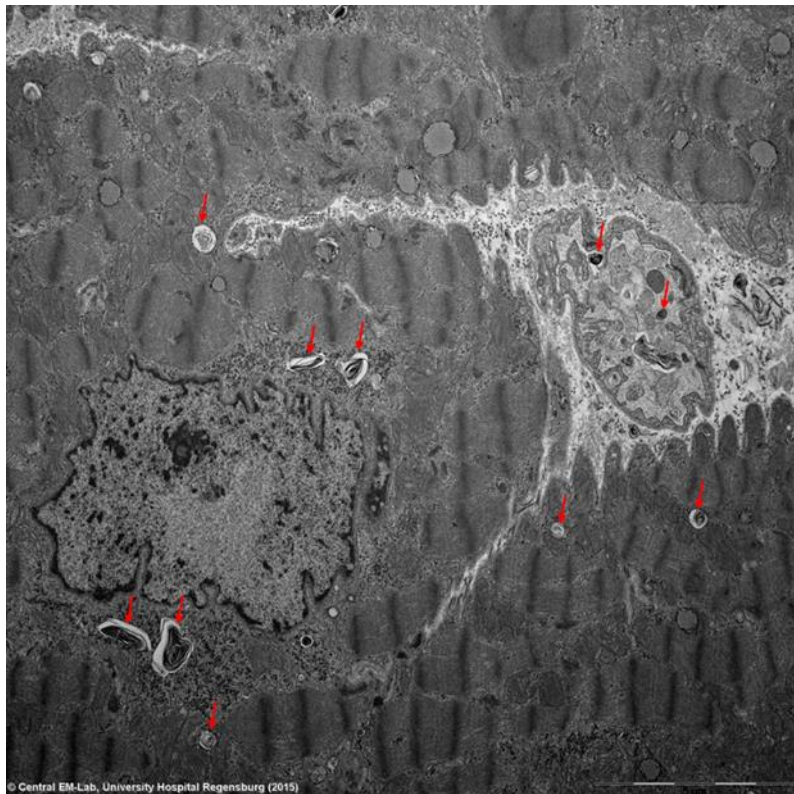


Abbildung 31: Myelin-artige Strukturen (Pfeile), CHF (Vergrößerung 5000-fach).

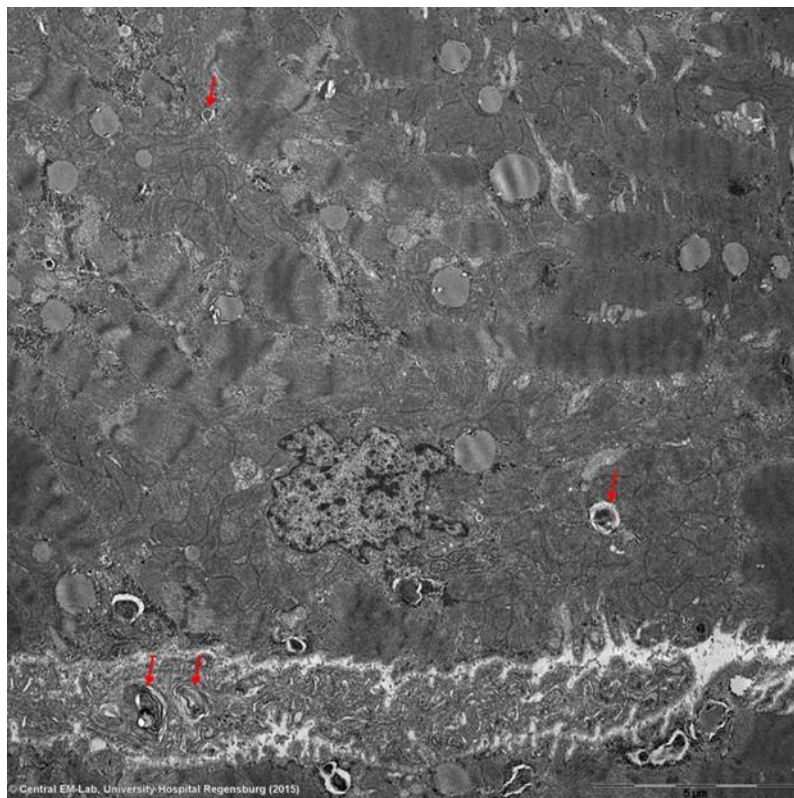


Abbildung 32: Myelin-artige Strukturen (Pfeile), CHF+VPI Vergrößerung (5000-fach).

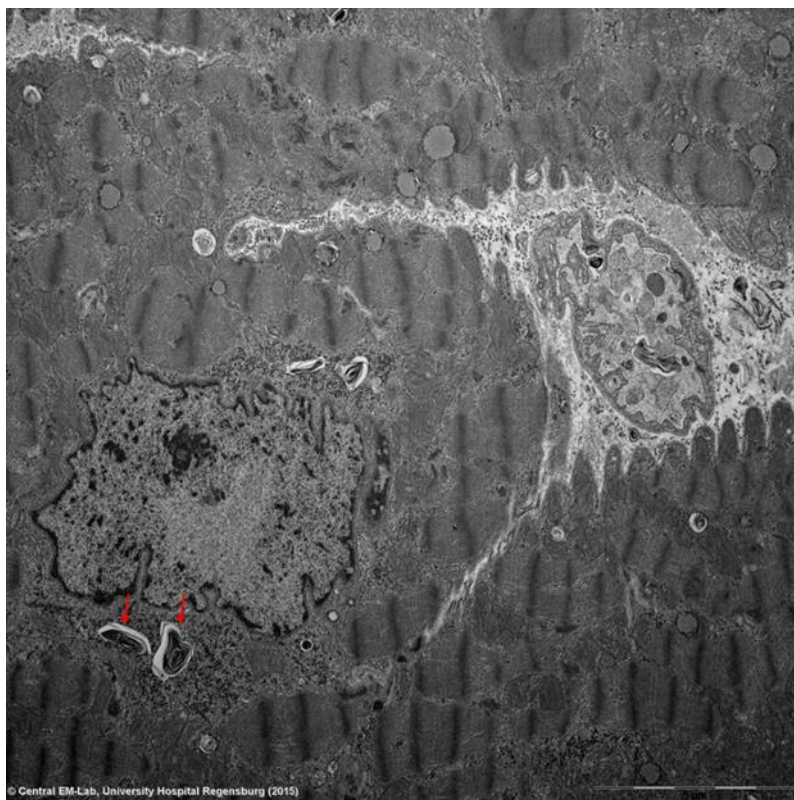


Abbildung 33: Parakristalline Strukturen (Pfeile), CHF (Vergrößerung 5000-fach).

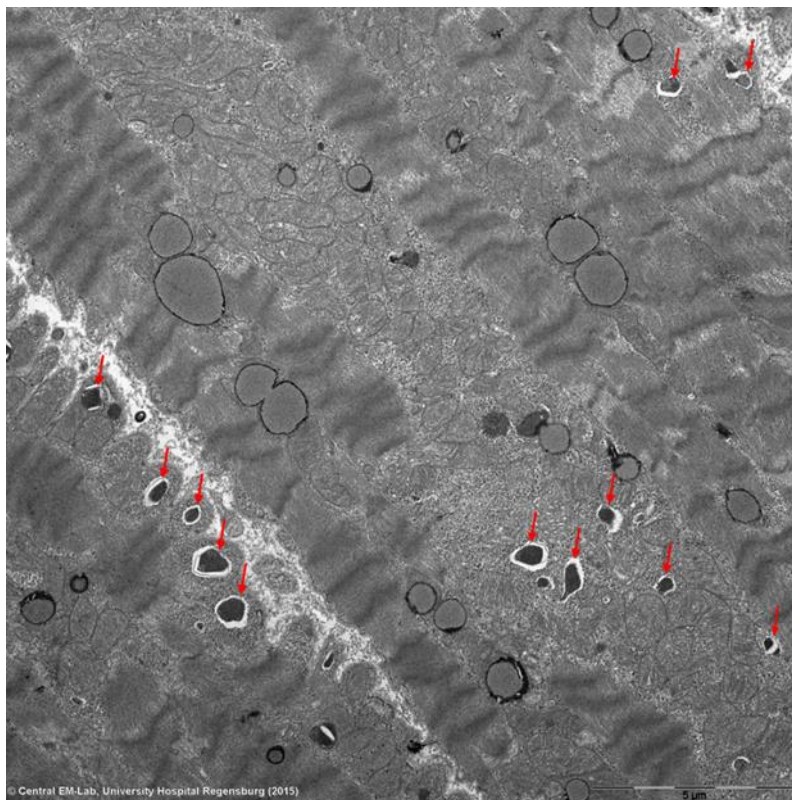


Abbildung 34: Parakristalline Strukturen (Pfeile), CHF+VPI (Vergrößerung 5000-fach).

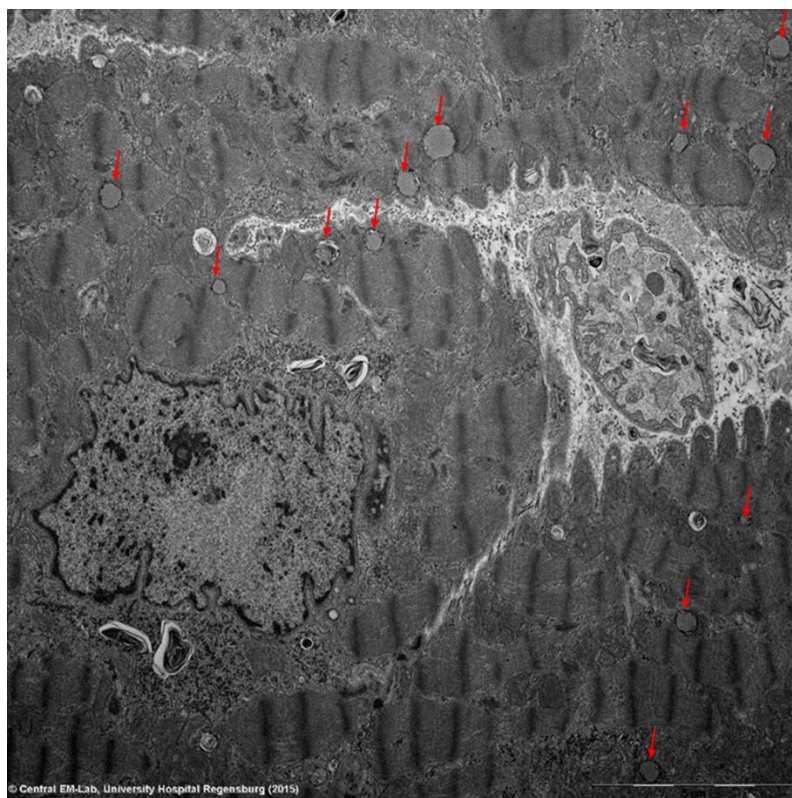


Abbildung 35: Lipidinkclusionen, CHF (Vergrößerung 5000-fach).



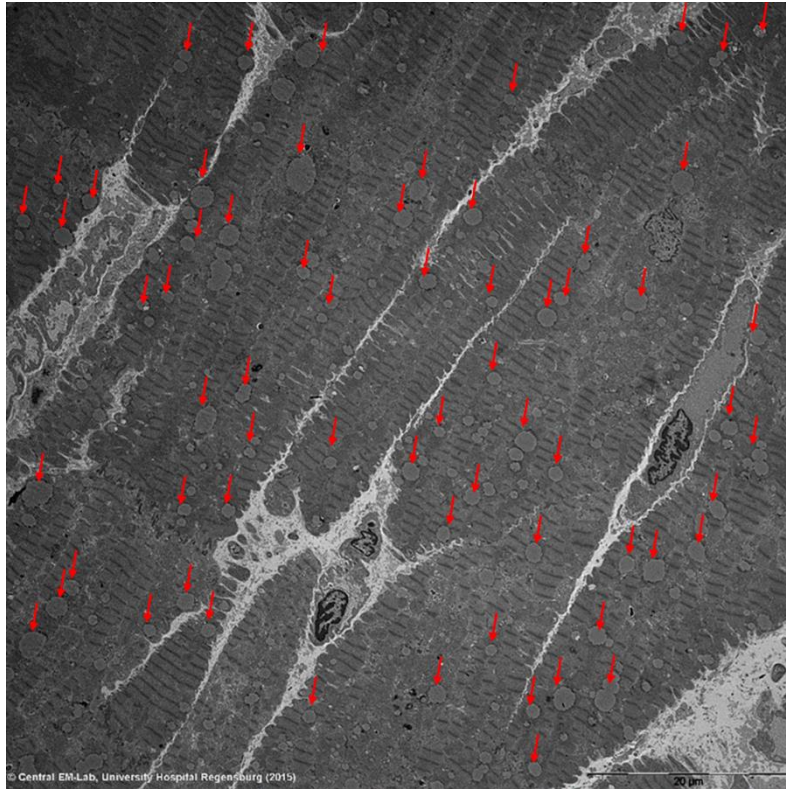


Abbildung 36: Lipidinkclusionen (Pfeile), CHF+VPI (Vergrößerung 1250-fach).

Tabelle 9: Quantitative Befunde der TEM-Analyse

	CHF	CHF+VPI
<b>Parakristalline Strukturen</b>	+	++ - +++
<b>Myelin-artige Strukturen in Kardiomyozyten</b>	+++	+
<b>Myelin-artige Strukturen in Gefäßen</b>	++	++
<b>Myelin-artige Strukturen im Interstitium</b>	++	++
<b>Lipidinkclusionen</b>	++	+++
<b>Mitochondrienödem</b>	0	+

In den elektronenmikroskopischen Analysen zeigte sich bei den mit VPI-behandelten Tieren eine deutliche Verminderung an "Myelin-artigen-Strukturen". Hierbei handelt es sich um autophagische Inklusionen, welche beim Abbau von membranösen Strukturen entstehen. Die parakristallinen Strukturen in den Zellen, auskristallisierte, zu Tubuli gepackte Proteine nehmen unter einer Therapie signifikant zu. Die vermehrte Lipidakkumulation im Kardiomyozyten ist bei den Tieren mit einer manifesten Herzinsuffizienz wahrzunehmen, jedoch unter einer Therapie mit Omapatrilat noch mit einer Steigerung festzustellen.

### 3.4 Funktionelle Analysen

#### 3.4.1 Citratsynthase-Aktivität

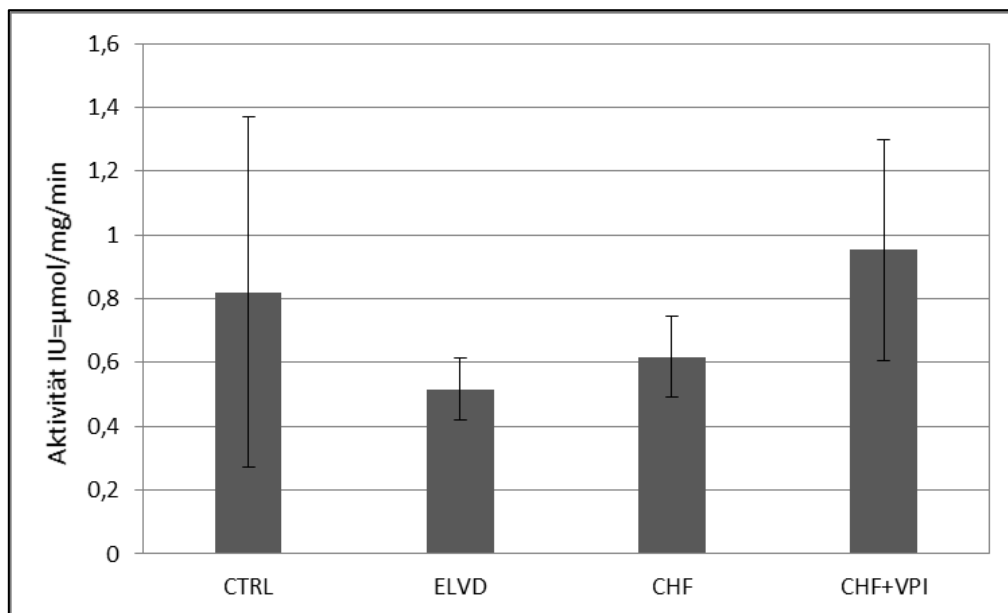


Abbildung 37: Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase-Aktivität gilt als globaler metabolischer Marker für die oxidative Kapazität der Mitochondrien. Im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sinkt die Aktivität der Citratsynthase von  $0,82 \pm 0,54$  IU/µmol/mg/min in den Kontrolltieren auf eine Aktivität von  $0,52 \pm 0,09$  IU/µmol/mg/min in der Gruppe der frühen ventrikulären Dysfunktion (ELVD) und erreicht in der manifesten Herzinsuffizienz

zienz (CHF) eine Aktivität von  $0,62 \pm 0,12$  IU/ $\mu$ mol/mg/min. Durch eine Behandlung mit dem Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat erhöht sich die Citratsynthase-Aktivität der Mitochondrien in der manifesten Herzinsuffizienz auf  $0,95 \pm 0,34$  IU/ $\mu$ mol/mg/min.

### 3.4.2 Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette

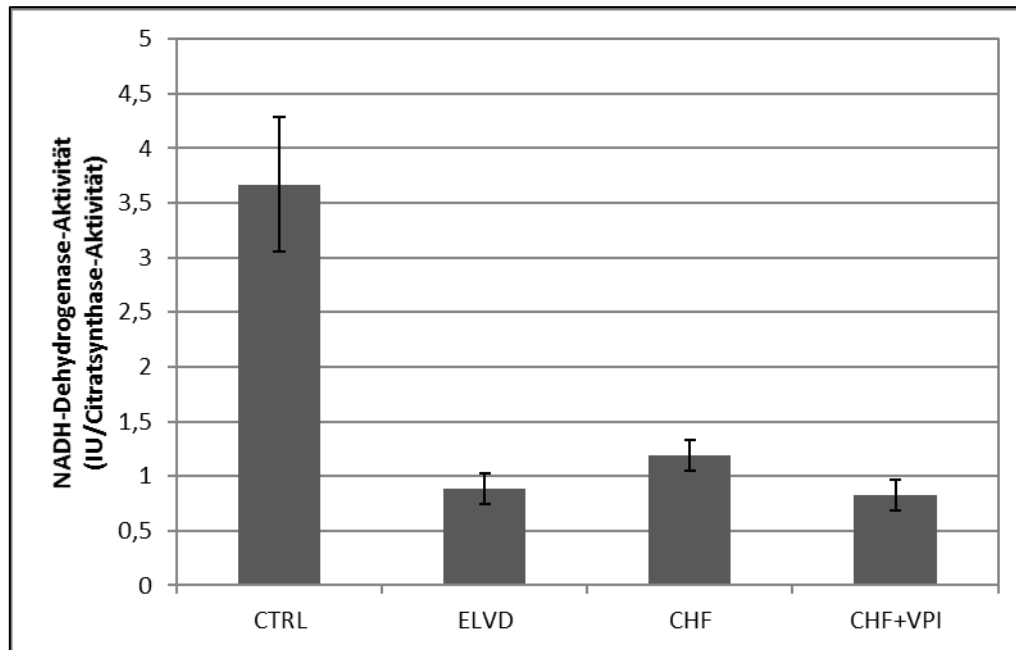


Abbildung 38: NADH-Dehydrogenase-Aktivität

In der Progredienz der Herzinsuffizienz zeigt sich eine Reduktion der Aktivität der NADH-Dehydrogenase von 3,67 IU/Citratsynthase-Aktivität in den Kontrolltieren auf 0,88 IU/Citratsynthase-Aktivität in der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD). Im weiteren Verlauf zur manifesten Herzinsuffizienz erfolgt ein dezenter Anstieg der Aktivität auf 1,19 IU/Citratsynthase-Aktivität. Durch die Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor Omapatrilat wird ein Wert von 0,82 IU/Citratsynthase-Aktivität erreicht, vergleichbar mit der frühen linksventrikulären Dysfunktion.

### 3.4.3 Aktivität des Komplex II der mitochondrialen Atmungskette

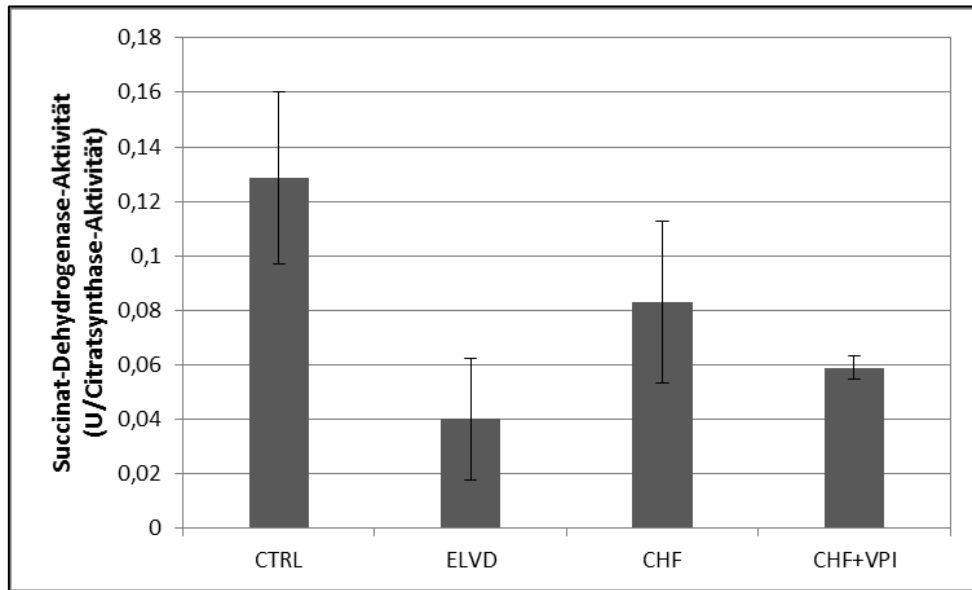


Abbildung 39: Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase, des Komplex II der mitochondrialen Atmungskette, zeigt im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz eine Reduktion von 0,12 U/Citratsynthase-Aktivität in der Kontrollgruppe auf 0,04 U/Citratsynthase-Aktivität in der Gruppe der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD). Durch die weitere Progression zur manifesten Herzinsuffizienz erhöht sich die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase auf einen Wert von 0,083 U/Citratsynthase-Aktivität. Aufgrund der Behandlung mit dem VPI Omapatrilat sinkt die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase auf 0,058 U/Citratsynthase-Aktivität.

## 3.4.4 Aktivität des Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette

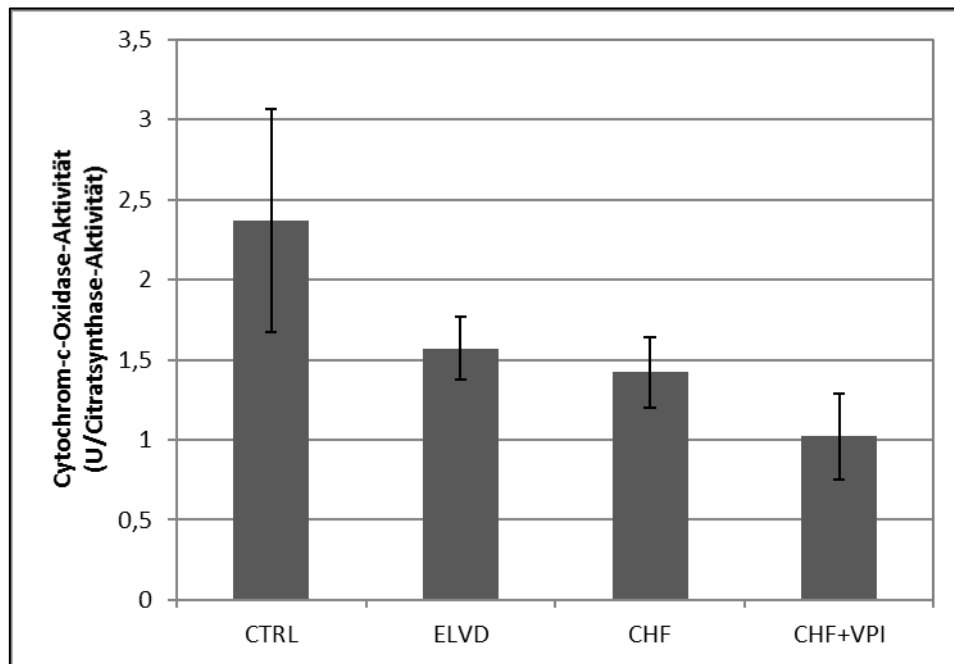


Abbildung 40: Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität

Die Cytochrom-c-Oxidase, Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette zeigt in den Kontrolltieren eine Aktivität von 2,37 U/Citratsynthase-Aktivität. Durch die Progredienz der Herzinsuffizienz zeigt sich eine Reduktion der Aktivität in der ELVD-Gruppe auf 1,57 U/Citratsynthase-Aktivität, welche sich in der manifesten Herzinsuffizienz weiter reduziert auf einen Wert von 1,42 U/Citratsynthase-Aktivität. Die Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor Omapatrilat erreicht eine Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase von 1,02 U/ Citratsynthase-Aktivität und somit eine weitere Reduktion im Vergleich zur manifesten Herzinsuffizienz ohne Behandlung mit Omapatrilat.

### 3.4.5 Pyruvatdehydrogenase-Aktivität

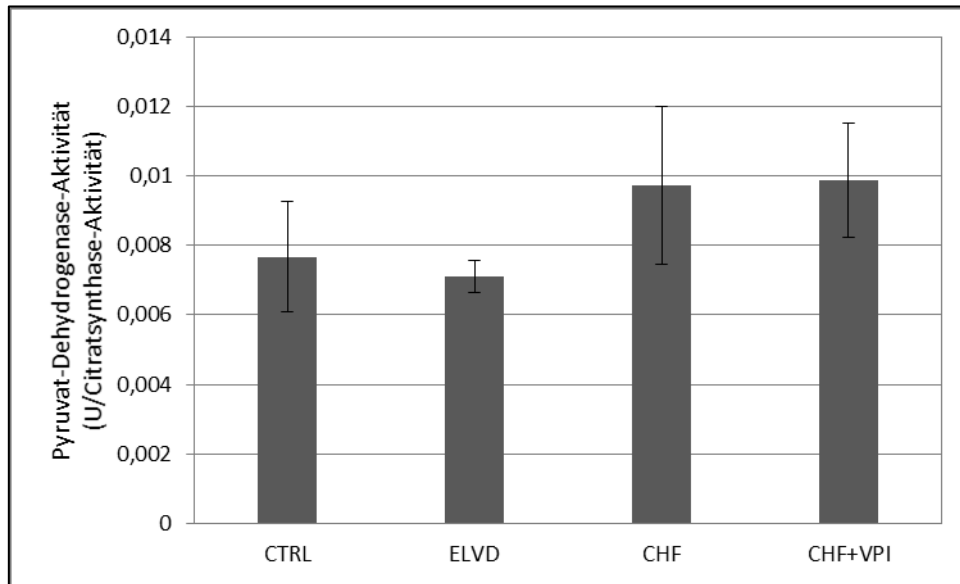


Abbildung 41: Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) ist ein wichtiges Enzym in der Verbindung der Glykolyse und des Citratzyklus. Die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase sinkt von einem Wert von 0,0076 U/Citratsynthase-Aktivität in der Kontrollgruppe auf 0,0071 U/Citratsynthase-Aktivität in der ELVD-Gruppe. Durch das Fortschreiten der Herzinsuffizienz erreicht die PDH-Aktivität in der manifesten Herzinsuffizienz 0,0097 U/Citratsynthase-Aktivität, wohingegen die Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor noch einen minimalen Zuwachs der Aktivität von 0,0099 U/Citratsynthase-Aktivität erlaubt.

## 3.4.6 CPT1A-Western Blot

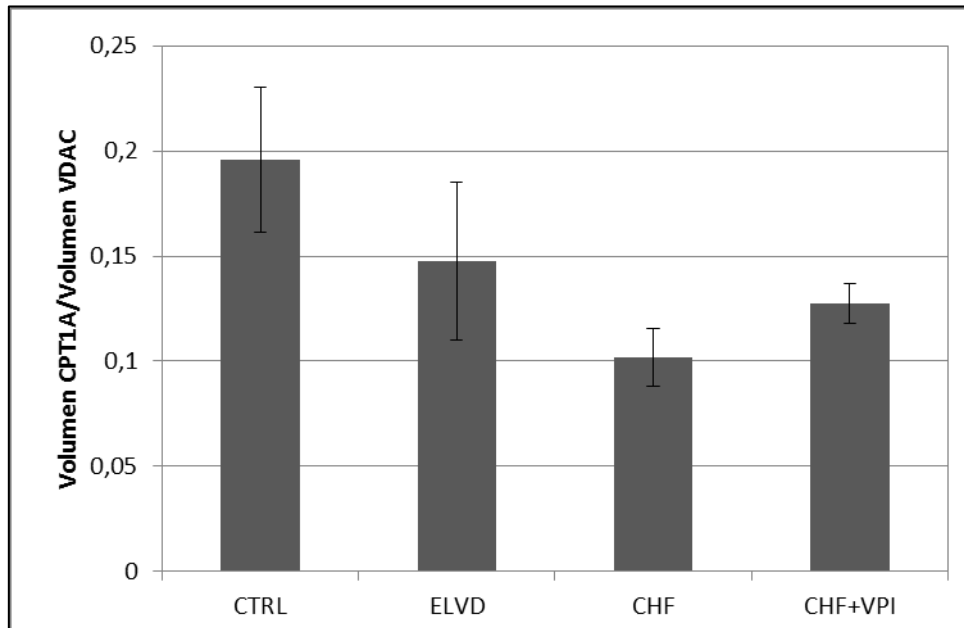


Abbildung 42: CPT1A- Auswertung Western Blot

Die Carnitin-Palmyltransferase (CPT1A) ist ein mitochondriales Enzym, verantwortlich für den Transfer einer Acylgruppe von Acetyl-CoA zu Carnitin und damit essentiell notwendig für den Fettsäuremetabolismus.

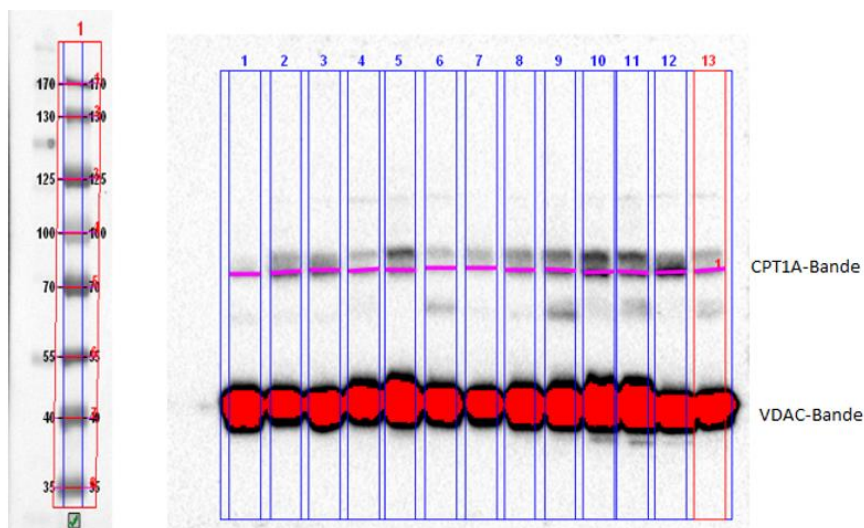


Abbildung 43: Western Blot Banden CPT1A

In der Auswertung des Western Blots sieht man eine Reduktion der Signalstärke von CPT1A in der Kontrollgruppe von 0,196 (in Relation zum Housekeeper VDAC) zu 0,1 in der manifesten Herzinsuffizienz (CHF). Durch die Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor (CHF+VPI) kann die Signalstärke wieder auf 0,127 erhöht werden, wenngleich diese Veränderung nicht statistisch signifikant ist.

.



## 4 Diskussion

### 4.1 Veränderungen des Proteoms in der Progression der Herzinsuffizienz

#### 4.1.1 Veränderungen des Stoffwechsels

Das Herz ist in der Lage, sich sowohl der Fettsäureoxidation als auch der Glykolyse zur Substratgewinnung zu bedienen. Diese metabolische Flexibilität in der Nutzung von Substraten garantiert im gesunden Herzen die Aufrechterhaltung der Energiegewinnung und die ausreichende Versorgung mit ATP (13,57,58). In der Herzinsuffizienz kommt es in experimentellen Tiermodellen zu einer Downregulation der Proteine des Fettstoffwechsels (13,59–61) und einem Shift von dem Primärsubstrat Fettsäure zum Substrat Glucose (13,30,32,35,58–62).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zahlreiche Proteine der  $\beta$ -Oxidation in der manifesten Herzinsuffizienz signifikant vermindert sind gegenüber der linksventrikulären Dysfunktion. Die Progression vom ungestörten linken Ventrikel zur links-ventrikulären Dysfunktion ist demgegenüber mit einer Erhöhung der Proteine der  $\beta$ -Oxidation verbunden. Darüber hinaus sind im Vergleich der Kontrolltiere zu den Tieren mit einer manifesten Herzinsuffizienz die Proteine der  $\beta$ -Oxidation in ihrer Expression erhöht. Dieses komplexe Regulationsverhalten deutet auf eine allgemeine Überexpression von Fettsäure-verstoffwechselnden Proteinen in der Herzinsuffizienz hin, welche allerdings beim Übergang in das manifeste Krankheitsstadium eine Abschwächung erfährt. Ergänzend zeigen Western-Blot-Analysen der Carnitin-Palmoyltransferase (CPT1A), einem essentiellen Bestandteil des Fettsäuremetabolismus, eine -allerdings statistisch nicht signifikante- Reduktion der Signalstärke von 0,2 in den Kontrolltieren auf 0,1 in der manifesten Herzinsuffizienz, was auf einen verminderten Transfer von Acylgruppen durch die Carnitin-Palmoyltransferase hindeutet und die Komplexität des Fettstoffwechsels in der progressiven Herzinsuffizienz unterstreicht.

In dieser Arbeit konnte weiterhin die Erhöhung der Glykolyse im Vergleich von früher linksventrikulären Dysfunktion und manifester Herzinsuffizienz gezeigt werden, wohingegen im Vergleich der Kontrollgruppe zur frühen linksventrikulären Dysfunktion eine Erniedrigung der ATP-abhängige 6-Phosphofruktokinase deutlich wird. Insofern zeigt sich hier ein zum Lipidmetabolismus gegenläufiges Regulationsverhalten: die Überexpression Glucose-verstoffwechselnder Enzyme bildet sich erst im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz aus, beim Übergang von Kontrolltieren in die frühe linksventrikuläre Dysfunktion zeigt sich demgegenüber eine Verminderung der Enzyme auf Proteomebene. In Ergänzung zum bisherigen Modell des „metabolic switch“ in der Herzinsuffizienz zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Umstellung der Energiegewinnung in der Herzinsuffizienz offenbar erst in späteren Erkrankungsstadien manifest wird.

Diese Umstellung entspricht dem fetalen Programm der kardialen Energiegewinnung, da das fetale Herz aufgrund einer sauerstoffarmen Umgebung auf die Substratgewinnung durch Glucose und Lactat angewiesen ist (63,64). Nach der Geburt stellt sich der Organismus durch einen Abfall der Plasmainsulinkonzentration und der verminderten Verfügbarkeit von Glucose auf eine vermehrte Fettsäureoxidation ein (59) und nutzt als Primärsubstrat zu mehr als 70% Fettsäuren (35). Die Ursachen dieses pathologischen Shifts in der Herzinsuffizienz beruhen auf der geringen Regenerationsfähigkeit des Kardiomyozyten, der bestrebt ist, den Zelltod zu verhindern und das Zellüberleben anzustreben (63). Durch Änderungen des peroxisome proliferator activated Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (35,60,63), welcher sowohl für die Regulation der Fettsäureaufnahme als auch der  $\text{-oxidation}$  zuständig ist (63) und eine entscheidende Rolle in der transkriptionellen Regulation der Substratpräferenz am Herzen spielt (63), gelingt der Shift. Die Reaktivierung des fetalen metabolischen Programmes sorgt für eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs und Maximierung der Effizienz, könnte aber auch nachteilige Effekte auf die kardiale Kontraktionsfunktion haben (59). Denn die glykolytischen Stoffwechselwege sind zwar Sauerstoff sparend, es entsteht aber eine Abhängigkeit des Myokards gegenüber Glucose (65,66) und die Umstellungen sind nicht ausreichend, um die Verminderungen in den anderen Stoffwechselwegen auszugleichen. Die Konsequenz ist ein ATP-Abfall, der zu einer verminderten kontraktile Reserve im herzinsuffizienten Muskel führt (67,68). Das

Ergebnis dieser Arbeit bezüglich des Vergleichs der Kontrolltieren zu den Tieren mit einer manifesten Herzinsuffizienz ist auch im Vergleich der Tiermodelle zu humanen funktionellen PET-Studien zu finden: während die experimentellen Tiermodelle einen fetalen metabolischen Shift der kardialen Energiegewinnung mit einer Downregulation der  $\beta$ -Oxidation in Verbindung mit einer Erhöhung der Glykolyse vermuten lassen, zeigen sich in den humanen Studien eine Erhöhung der Fettsäureaufnahme sowie eine Erniedrigung der Glucoseaufnahme (69–71). Zudem zeigt sich auch eine Verbindung zwischen der Aktivität der Carnitin-Palmyltransferase (CPT1A) und den Intermediärfilamenten: mehrere Studien belegen eine Regulation der CPT1A-Aktivität durch eine Interaktion zwischen Mitochondrien und Intermediärfilamenten (72,73). Capetanaki postuliert sogar eine Verbindung der Aktivität der Carnitin-Palmyltransferase bzw. Änderungen der  $\beta$ -Oxidation mit dem beobachteten Zelltod in einem Desmin-defizienten Mausmodell (74). Prinzipiell muss allerdings berücksichtigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Protein-Expressionsunterschiede nicht zwangsläufig mit einer gleichgerichteten Veränderung der jeweiligen enzymatischen Aktivität einhergehen müssen.

Es konnte weiterhin in der ultrastrukturellen Analyse gezeigt werden, dass sich in der manifesten Herzinsuffizienz im linksventrikulären Gewebe eine deutliche Akkumulation von Lipidinklusionen findet, was ein Hinweis auf die sog. Lipotoxizität sein könnte, denn die Verminderung des Fettstoffwechsels hat nicht nur Auswirkungen auf den Energiemetabolismus des Herzen sondern auch auf die Architektur: sowohl Veränderungen des PPAR $\alpha$  als auch die idiopathische dilatative Kardiomyopathie führen zu einer verminderten  $\beta$ -Oxidation und zeigen eine vermehrte kardiale, vor allem linksventrikuläre, Hypertrophie, welche auch im experimentellen Tiermodell durch Knockout-Mäuse bestätigt werden konnte (60). Weiterhin ist bekannt, dass eine Lipidakkumulation in Kardiomyozyten zur Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion führt, welche unweigerlich in der Apoptose der Kardiomyozyten endet (75).

Neben dem „metabolic switch“ mit der daraus resultierenden intrakardiomyozytären Lipidakkumulation ergaben sich in vorliegender Arbeit auch Veränderungen

im Citratzyklus. Dieser Stoffwechselweg ist ein wichtiger Teil des Intermediärmetabolismus, welcher die Oxidation der Acetylgruppe von Acetyl-CoA übernimmt und somit Reduktionsäquivalente (NADH, FADH<sub>2</sub>) für die oxidative Phosphorylierung produziert. Er wird dabei stark von Veränderungen im Fettsäure- und Glucosestoffwechsel beeinflusst.

In der vorliegenden Proteomanalyse dieser Arbeit konnte in der Progression der Herzinsuffizienz zunächst eine Expressionserhöhung der Proteine des Citratzyklus zwischen den Kontrolltieren und der frühen linksventrikulären Dysfunktion (ELVD) gezeigt werden, anschließend jedoch eine Erniedrigung der Proteine im Verlauf der ELVD zur manifesten Herzinsuffizienz. Die Aktivität der Citratsynthase zeigt eine deutliche Reduktion um 25% im Vergleich der Kontrolltiere zu den Tieren mit manifester Herzinsuffizienz. Insofern ließe sich hieraus schlussfolgern, dass die reduzierte enzymatische Aktivität der Citrat-Synthase durch eine Expressionserhöhung nachgeschalteter Enzyme kompensiert werden soll.

Es gibt in der Literatur widersprüchliche Angaben zu der Expressionsänderung der Enzyme des Citratzyklus: bei Shibayama et al. (76) sind die Enzyme des Citratzyklus deutlich nach oben reguliert, wie auch bei Bugger et al. (33). Als Ursache für die Expressionserhöhung wird eine direkte kompensatorische Antwort auf den vermehrten Stress während der Schrittmacherstimulation im experimentell Tiermodell angenommen (76). Hingegen sind die Enzyme bei Cieniewski-Bernard (77) in ihrer Expression herunter reguliert. Die anaplerotischen Stoffwechselwege, vor allem der Pyruvateintritt in den Citratzyklus, sind aber nicht effektiv genug, um das Energiedefizit durch die Downregulation des Fettsäuremetabolismus zu kompensieren (76,78), auch weil spezifische Transporter die Intermediate immer wieder umleiten in zytosolische Pools außerhalb des Citratzyklus (78). Experimentelle Studien mit einer Depletion von Enzymen des Citratzyklus führen zu einem Abfall der kontraktilen Funktion des Herzens (79,80), was seine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel des Herzens deutlich macht.

#### 4.1.2 Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

Nach der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADH, FADH<sub>2</sub>) durch die Oxidation von Acetyl-CoA im Citratzyklus kann die Energiegewinnung durch die mitochondriale Atmungskette beginnen. Die mitochondriale Atmungskette ist an den Cristae der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die Komplexe I bis IV der mitochondrialen Atmungskette transportieren Elektronen von NADH und FADH<sub>2</sub> zu Sauerstoff und generieren dadurch einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Protonengradient ist der Antrieb für die ATP-Synthase, auch als Komplex V der Atmungskette bezeichnet, welche durch Phosphorylierung von ADP das energiereiche ATP produziert.

Im Verlauf der progressiven Herzinsuffizienz führte die frühe linksventrikuläre Dysfunktion im Gegensatz zur Kontrolle zu einer Expressionerhöhung der Proteine der Komplexe I, III und V. Bei kontinuierlicher weiterer Stimulation änderte sich das Expressionsverhalten zwischen der frühen linksventrikulären Dysfunktion und der manifesten Herzinsuffizienz in einer signifikanten Expressionsverminderung der Komplexe I, III und V.

In der Herzinsuffizienz wurden erniedrigte ATP-Konzentrationen um 30% gefunden (35), welche zusammen mit Verringerungen in der mitochondrialen Atmung (81,82) eine verminderte ATP-Produktion vermuten lassen (83). Analysen der einzelnen Komplexe in experimentellen Tiermodellen ergeben eine Erniedrigung des Komplex I (31,36,84), Mausmodelle mit einem Defekt des Komplex I führen zu einer NADH-Akkumulation in der Zelle und sind nach Karamanlidis et al. assoziiert mit einer erhöhten Produktion an Sauerstoffradikalen und verursachen Schäden auf zellulärer Ebene (85). Der -ebenfalls als wichtiger mitochondrialer Produktionsort reaktiver Sauerstoffspezies bekannte- Komplex III ist in mehreren Studien deutlich in der Herzinsuffizienz reduziert (31,36,37,86), ebenso wie der Komplex IV (36,38). Letzterer weist auch eine Reduktion bei Marin-Garcia et al. (37) und Page et al. (31) auf. Das Fehlen der Regulation der Enzymaktivität des Komplex II erklärt Ide et al. durch die rein nukleäre Kodierung der Gene, da die Komplexe I, III und IV partiell mitochondrial kodiert sind und er suggeriert, dass die Ursache der mitochondrialen Dysfunktion in der verminderten Anzahl von Kopien der mtDNA bei gleichbleibender Mitochondrienanzahl liegt (36). Auch Marin-

Garcia et al. macht Defekte in der Regulation der mitochondrialen Transkription verantwortlich für die Reduktion der einzelnen Komplexe (37).

Eine Studie von Rosca et al. (82) konnte keine Veränderungen in der Enzymaktivität der einzelnen Komplexe der Atmungskette zeigen, aber in der Funktion und Anordnung der Komplexe im sogenannten Respirasom, einem Superkomplex bestehend aus den Komplexen I, III und IV. Die Respirasomen ermöglichen in der mitochondrialen Atmungskette verbesserte Elektronentransferraten und erhöhen die Stabilität der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (87), sind aber in ihrer Anzahl in der Herzinsuffizienz deutlich reduziert (82): so ließ sich für eine 30-50%ige Reduktion im Anteil des Respirasoms I/III<sub>2</sub>/IV<sub>1</sub> eine Verminderung der oxidativen Phosphorylierung um 50% nachweisen (62).

#### 4.1.3 Veränderungen der Intermediärfilamente

Das Vorhandensein von Intermediärfilamenten in der mitochondrialen Fraktion ist am ehesten nicht als Verunreinigung zytosolischer Bestandteile zu werten, sondern hypothetisch als Merkmal spezifischer Interaktion zwischen Zytoskelett und Mitochondrien diskutiert wird (siehe unten).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamenten in der terminalen Herzinsuffizienz im Gegensatz zur frühen linksventrikulären Dysfunktion und den Kontrolltieren.

Fountoulakis et al. stellt in diesem Zusammenhang die Hypothese auf, dass das Vorhandensein von Intermediärfilamenten aufgrund nicht-spezifischer Bindungen mit den Mitochondrien zu erklären ist, oder aber auch durch spezifische Assoziation mit den Mitochondrien (88). Unklar ist der Mechanismus: die Interaktion könnte entweder durch direkte Interaktion der Mitochondrien mit den Intermediärfilamenten über Membranproteine der äußeren Mitochondrienmembran erfolgen oder indirekt über Intermediärfilamente-assoziierte Proteine (74,88). Das Zytoskelett ist zum einen wesentlich beteiligt an dem Transport und der Verteilung der Mitochondrien (89), zum anderen sorgen Intermediärfilamente für eine Ver-

änderung der mitochondrialen Funktion durch Veränderungen der mitochondrialen Form aufgrund Dehnung oder Stauchung mitochondrialer Membranen (89–91). Diese Veränderungen in der mitochondrialen Verteilung und Form sind assoziiert mit vielfachen Erkrankungen (74): alkoholische Lebererkrankungen (92), kongenitale Muskeldystrophie (93), Kardiomyopathie (94) und Myelomen (95). Sowohl Zellstudien als auch Tiermodelle bestätigen diese Abhängigkeit der mitochondrialen Funktion mit der Interaktion zwischen äußerer Mitochondrienmembran und Zytoskelett (74,91). Brdiczka et al. vermutet zusätzlich zu den strukturellen Veränderungen in der Verbindung der Intermediärfilamente mit den Mitochondrien auch regulatorische Verknüpfungen in Form gezielter ATP-Zufuhr durch Poren der äußeren Mitochondrienmembran und eine Beteiligung beider Organellen beim Fluss der Nucleotide über die mitochondrialen Membranen (96). Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von Saks et al. bekräftigt, welche postulieren, dass die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranen für ADP abhängig ist von den Intermediärfilamenten (97). Auch eine erhöhte Aktivität der Carnitin-Palmoyltransferase (CPT1A) sorgt für vermehrte Interaktionen zwischen der äußeren Mitochondrienmembran und den Intermediärfilamenten (91) und bekräftigt die entscheidende Rolle der Intermediärfilamente in Bezug auf den Energiestoffwechsel. Ein strukturelles Pendant finden diese mechanistischen Prozesse in der erhöhten Mikrotubuli-Dichte in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien (91,98).

## 4.2 Veränderungen durch die Behandlung mit einem Vasopeptidaseinhibitor in der manifesten Herzinsuffizienz

### 4.2.1 Veränderungen des Stoffwechsels

Die Proteinexpression unter einer Omapatrilat-Behandlung ist signifikant erhöht für Proteine des Citratzyklus und der Glykolyse, auch das verbindende Enzym beider Stoffwechselwege, die Pyruvatdehydrogenase, ist mit ihren Untereinheiten erhöht. Die Aktivität der Citratsynthase, als globaler Marker der oxidativen Kapazität der Mitochondrien, steigert sich von einer Aktivität von 0,62

IU/ $\mu$ mol/mg/min in der manifesten Herzinsuffizienz durch VPI-Behandlung auf 0,95 IU/ $\mu$ mol/mg/min. Im Fettstoffwechsel wird unter einer Therapie mit dem VPI Omapatrilat eine Erhöhung der Expression sowohl im Abbau der Fettsäuren durch die  $\beta$ -Oxidation, als auch in der Synthese aktivierter Fettsäuren deutlich. Elektronenmikroskopisch lässt sich eine stark vermehrte Lipidakkumulation durch Lipidinklusionen im linksventrikulären Gewebe nachweisen, welche unter einer dualen RAAS-/NEP-Inhibition moderat zunehmen. Myelin-like-Strukturen als autophagische Inklusionen membranöser Strukturen treten unter einer Therapie mit Omapatrilat vermindert auf, während die parakristallinen Strukturen, als auskristallisierte, zu Tubuli gepackte Proteine keine Änderung durch den VPI aufweisen. Somit hat der Vasopeptidase-Inhibitor keinen Einfluss auf die Verhinderung der Lipidakkumulation, vielmehr wird durch eine Hochregulation der Acyl-Synthetasen der Kardiomyozyt ggf. mit dem Angebot an Fettsäuren und der Unfähigkeit der Utilisation überlastet, was im Endeffekt in der vermehrten Anzahl an Lipidinklusionen in dieser Arbeit deutlich wird. Vielmehr führt die gesteigerte Stoffwechsellage zu einem lipidinduzierten, programmierten Zelltod der Kardiomyozyten, welches auch von Chiu et al. (75) und Zhou et al. (99) in Maus- bzw. Rattenmodellen bestätigt wurde und von dieser Arbeit auf ein Kaninchenmodell übertragen werden konnte. Die Verminderung der myelin-like-Strukturen spricht für eine Reduktion des mitochondrialen Schadens, da Studien mit dem zytotoxischen Cyclophosphamid eine Zerstörung der Mitochondrien mit Bildung von Myelin-like-Strukturen zeigen konnten (100), als Zeichen von späten Produkten der autophagischen, lysosomalen Verdauung. Ein Hamstermodell der dilatativen Kardiomyopathie konnte zudem eine direkte Verbindung zwischen den autophagischen Inklusionen, der Myelin-like-Strukturen, als Zeichen der Degeneration, und dem Zelltod der Kardiomyozyten nachweisen (101). Zusammengefasst scheint damit die Behandlung mit einem Vasopeptidase-Inhibitor zu einer Reduktion autophagolytischer Prozesse zu führen.

Die Citratsynthase-Aktivität erreicht in den mit dem Vasopeptidaseinhibitor behandelten Tieren eine nahezu vergleichbare Aktivität zu Kontrolltieren, auch



wenn das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich Remodeling in der progressiven Herzinsuffizienz auch auf funktioneller Ebene widerspiegelt, ohne dass die Expression von Proteinen betroffen sein muss. Zudem zeigt die hier vorliegende Proteomanalyse, dass durch VPI-Behandlung eine Erhöhung des Fettsäuremetabolismus zu verzeichnen ist, sowohl in der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren als auch in der Fettsäuresynthese, diese Erhöhung hat aber keinen Einfluss auf die Proteine der Glykolyse, welche unter einer Behandlung ohne Expressionsänderung bleiben. Somit steuert der Vasopeptidaseinhibitor der vorherbeschriebenen Downregulation der  $\beta$ -Oxidation (29,30,32,33) entgegen und es erfolgt eine Rückkehr zur normalen Substratutilisation, vergleichbar mit dem gesunden Herzen. Diese entgegengesetzte Expression durch die VPI-Behandlung konnte auch durch den Einsatz von LVAD (left ventricle assist device) in versagenden humanen Herzen von Gupte et al. (102) beschrieben werden, zusätzlich zum Fettstoffwechsel wird hier auch eine Steigerung der Citratsynthase-Aktivität durch „unloading“ des Herzens beschrieben (102). Auch tachykardie-induzierte herzinsuffiziente Herzen von Hunden zeigen nach einem Absetzen des Tachykardie-Stimulus eine Erhöhung des Fettsäuremetabolismus (103).

#### 4.2.2 Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

In der in dieser Arbeit vorliegenden Proteomanalyse zeigte sich eine signifikante Verminderung der Expression der NADH-Dehydrogenase, als Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch die Behandlung in der chronischen Herzinsuffizienz mit dem Vasopeptidaseinhibitor Omapatrilat. Hingegen sind die Proteinexpressionen der Komplexe II (Succinat-Dehydrogenase) und V (ATP-Synthase) unter Omapatrilat-Therapie deutlich erhöht. Es zeigt sich also eine differente Expression der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette unter einer Behandlung mit einer dualen RAAS-/NEP-Inhibition. Die Komplexe I und III, mit einer Expressionsverminderung durch die VPI-Behandlung, stellen die Hauptquelle für die Bildung von ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) in den Mitochondrien dar. Da der oxidative Stress und die damit einhergehenden mitochondriale Dysfunktion als Schlüsselfaktoren für die Progression bzw. die Entwicklung einer

Herzinsuffizienz angesehen werden (104), scheint diese Entwicklung durch die VPI-Behandlung vermindert zu sein. Relevant sind die Atmungskettenkomplexe auch bei Kardiomyopathien: ein Defekt im Komplex II kann sowohl zu einer dilatativen Kardiomyopathie (105), als auch zu einer ischämischen Kardiomyopathie (106) führen und verdeutlicht die Wichtigkeit des mitochondrialen Energiemetabolismus in der Entwicklung und Progredienz von kardialen Erkrankungen. Jedoch ist die funktionelle Relevanz der vorliegenden Ergebnisse schwierig zu beurteilen, denn zu einem könnte der Auslöser die Reduzierung des oxidativen Stress sein, zum anderen könnte auch eine erhöhte Effizienz der ATP-Produktion zu dieser verbesserten kardialen Energiesituation beitragen. Um diese Hypothesen abschließend beurteilen und evaluieren zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Zudem bestehen einige Diskrepanzen zwischen den Proteinexpressionen der Proteomanalyse und den funktionellen Analysen der einzelnen Komplexe. So ist Komplex II der mitochondrialen Atmungskette, die Succinat-Dehydrogenase, in der Proteomanalyse signifikant um das 3fache erhöht exprimiert, wohingegen in der funktionellen Analyse die Aktivität auf 0,058 U/Citrat-synthase-Aktivität sinkt durch Omapatrilat-Behandlung. Ursächlich hierfür könnten zum einen posttranslationale Modifikationen (Acetylierungen), welche zu einer Enzyminaktivierung führen (107), sein, zum anderen könnte auch, wie im vorherigen schon diskutiert, nach Rosca et al. eine falsche Assemblierung der einzelnen Komplexe zu einer Funktionseinschränkung führen, wobei die einzelnen Komplexe nicht beeinträchtigt sind (82).

#### 4.2.3 Veränderungen der Intermediärfilamente

Die mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente zeigen in der vorliegenden Arbeit unter der Therapie mit Omapatrilat eine signifikante Erniedrigung der Proteinexpression. Auch hier kann man nicht nur von einer Verunreinigung der mitochondrialen Fraktion durch zytosolische Bestandteile ausgehen, vielmehr könnte dies die intensiven, komplexen Interaktionen zwischen den Mitochondrien und den Intermediärfilamenten, wie oben angeführt, vermuten lassen.

Es handelt es sich hierbei nach Fountoulakis, wie oben erwähnt, einerseits um unspezifische Interaktionen/ Bindungen zu Mitochondrien, andererseits auch um

spezifische Assoziationen mit Mitochondrien (88). Die deutliche Reduktion in der Proteinexpression durch kombinierte RAAS-/NEP-Inhibition führt möglicherweise zu einer protektiven Funktion bezüglich des kardialen Remodelings in der Herzinsuffizienz, denn Fountoulakis et al. zeigte in Desmin-defizienten Tieren, dass M-Protein und Vinculin, beides Intermediärfilamente, um 25-50% gesteigert waren, welches schließlich zu Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz führte, im Gegensatz zu den Kontrolltieren (88). Desweiteren ist auch die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran abhängig von den Intermediärfilamenten (97). Hier müssten weitere Experimente klären, ob die Verringerung der Proteinexpression Auswirkungen auf die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran hat, eventuell durch ATP-Messungen, da auch die gezielte ATP-Zufuhr durch Poren der äußeren Mitochondrienmembran stattfindet (96). Eine erhöhte Mikrotubulidichte führt zu einer kontraktilen Dysfunktion im Kardiomyozyten bei der linksventrikulären, druckbedingten Hypertrophie (91,98) und sind laut Tsutsui et al. einer der Gründe für den Übergang einer kompensierten Herzhypertrophie zu einer manifesten Herzinsuffizienz (108). Möglicherweise kann diesem Mechanismus durch die kombinierte RAAS-/NEP-Inhibition über eine signifikante Reduktion der Proteinexpression der Intermediärfilamente entgegen gewirkt werden.

Eine verbesserte CPT1A-Aktivität führt zu vermehrten Interaktionen zwischen Mitochondrien und Intermediärfilamenten (91), welches durch die Omapatrilat-Therapie erreicht werden konnte. Konträr ist die Proteinexpression mit einer signifikanten Reduktion der Intermediärfilamente, sodass sich hier ein weiterer Hinweis darauf findet, dass nicht allein das Vorhandensein von Intermediärfilamenten relevant für den mitochondrialen Stoffwechsel ist, sondern die Interaktionen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der kardialen Energetik spielen.

### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Trotz der zentralen Rolle energetischer Prozesse in der Herzinsuffizienz sind die mitochondrialen Adaptationen noch immer unzureichend charakterisiert. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die mitochondrialen Veränderungen in der progressiven Herzinsuffizienz zu charakterisieren und den Einfluss einer RAAS-/NEP-

Inhibition auf Proteomebene zu untersuchen. Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten signifikante Expressionsveränderungen zahlreicher mitochondrialer Stoffwechselwege in der Herzinsuffizienz aufzeigen.

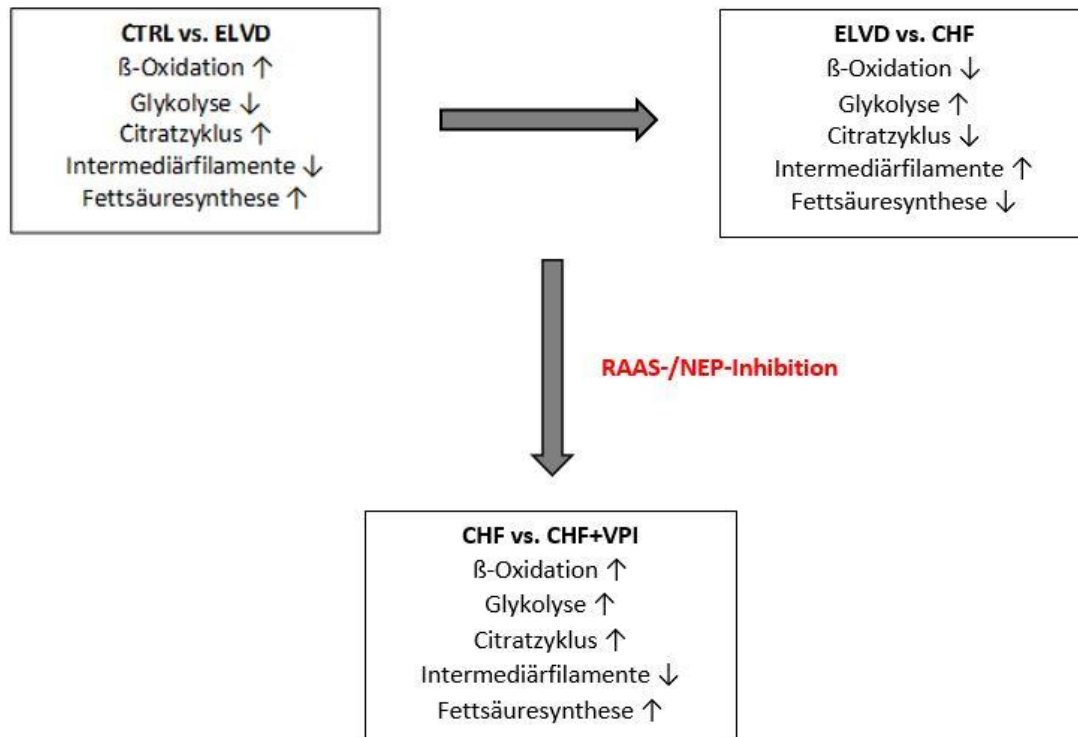


Abbildung 44: Zusammenfassung der Ergebnisse

So ergab sich eine Überexpression von Fettsäure-verstoffwechselnden und glykolytischen Proteinen in der frühen linksventrikulären Dysfunktion, welche dann allerdings im manifesten Krankheitsbild vermindert exprimiert sind. Ultrastrukturell konnte dies mit einer vermehrten Akkumulation von Lipidinkclusionen korreliert werden. Auch im Citratzyklus und der mitochondrialen Atmungskette, dem Generator von Energieäquivalenten, zeigte sich zunächst eine Überexpression der einzelnen Komplexe, welche im späteren Krankheitsverlauf eine signifikante Abschwächung erfuhr. Demnach scheint der Organismus in der frühen Krankheitsphase möglicherweise den Versuch zu unternehmen, mittels Überexpression zentraler energetischer Prozesse den Substratmangel zu kompensieren, was in der manifesten Herzinsuffizienz nicht mehr möglich zu sein scheint.

Die Behandlung mit einem Wirkstoff der kombinierten RAAS-/NEP-Hemmung führt zu einer Erhöhung der Expression mitochondrialer bzw. metabolischer Enzyme, auch im manifesten Krankheitsstadium und führt- im Trend- zu einer Normalisierung der Citratsynthase-Aktivität, als globalen Marker der oxidativen Kapazität der Mitochondrien. Zudem reduziert die kombinierte RAAS-/NEP-Inhibition die Proteinexpression der mit den Mitochondrien assoziierten Intermediärfilamente. Eine Therapie mit einem Vasopeptidase-Hemmer scheint die autophagolytischen Vorgänge im Kardiomyozyten zu reduzieren, ohne die interstitielle und intravaskuläre Autophagolyse zu beeinflussen. Somit scheint dieses pharmakologische Target interessant für die Verhinderung des kardialen Remodelings in der Herzinsuffizienz zu sein, so kann es auf Proteomebene die beobachteten Veränderungen zentraler energetischer Prozesse in der manifesten Herzinsuffizienz verhindern/ abschwächen und ein Niveau des kardialen Energiemetabolismus halten, wie es bei den Kontrolltieren zu sehen ist.

In weiterführenden Untersuchungen müsste überprüft werden, inwiefern diese Ergebnisse auch Veränderungen in der humanen Herzinsuffizienz widerspiegeln.

## Literatur

1. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray, John J V, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen, Dirk J, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *European Heart Journal*. 2008;29(19):2388–442. eng. doi:10.1093/eurheartj/ehn309
2. McMurray, J. J. V., Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip, G. Y. H., Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin, H. A., Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2012;33(14):1787–847. doi:10.1093/eurheartj/ehs104
3. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland, John G. F., Coats, Andrew J. S., Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano, Giuseppe M. C., Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer, Peter. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129–200. doi:10.1093/eurheartj/ehw128
4. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002;106(24):3068–72. eng.
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong

- ND, Woo D, Turner MB. Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):e6-e245. doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad
6. Gomez-Soto FM, Andrey JL, Garcia-Egido AA, Escobar MA, Romero SP, Garcia-Arjona R, Gutierrez J, Gomez F. Incidence and mortality of heart failure: A community-based study. *International Journal of Cardiology*. 2011;151(1):40–5. doi:10.1016/j.ijcard.2010.04.055
  7. Tiller D, Russ M, Greiser KH, Nuding S, Ebelt H, Kluttig A, Kors JA, Thiery J, Bruegel M, Haerting J, Werdan K, Bauer WR. Prevalence of Symptomatic Heart Failure with Reduced and with Normal Ejection Fraction in an Elderly General Population—The CARLA Study. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59225. doi:10.1371/journal.pone.0059225
  8. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Oden A, Rosengren A. Population Impact of Heart Failure and the Most Common Forms of Cancer: A Study of 1 162 309 Hospital Cases in Sweden (1988 to 2004). *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2010;3(6):573–80. doi:10.1161/CIRCOUT-COMES.110.957571
  9. Nickel A, Löffler J, Maack C. Myocardial energetics in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(4). doi:10.1007/s00395-013-0358-9
  10. Yin X, Dwyer J, Langley SR, Mayr U, Xing Q, Drozdov I, Nabeebaccus A, Shah AM, Madhu B, Griffiths J, Edwards LM, Mayr M. Effects of perhexiline-induced fuel switch on the cardiac proteome and metabolome. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2013;55:27–30. eng. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.12.014
  11. McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine Stimulates Glucose Oxidation in Normoxic, Ischemic, and Reperfused Ischemic Rat Hearts. *Circulation*. 1996;93(1):135–42. doi:10.1161/01.CIR.93.1.135
  12. McCormack JG, Baracos VE, Barr R, Lopaschuk GD. Effects of ranolazine on oxidative substrate preference in epitrochlearis muscle. *J Appl Physiol*. 1996;81(2):905–10. eng.
  13. Lionetti V, Stanley WC, Recchia FA. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc. Res*. 2011;90(2):202–9. doi:10.1093/cvr/cvr038
  14. Adlam VJ. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 2005;19(9):1088–95. doi:10.1096/fj.05-3718com
  15. Graham D, Huynh NN, Hamilton CA, Beattie E, Smith RA, Cocheme HM, Murphy MP, Dominiczak AF. Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ10 Improves Endothelial Function and Attenuates Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 2009;54(2):322–8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130351
  16. Dai D-F, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kuttyavin V, Santana LF, Rabinovitch PS. Mitochondrial Targeted Antioxidant Peptide Ameliorates Hypertensive Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(1):73–82. doi:10.1016/j.jacc.2010.12.044
  17. Corti R, Burnett, Jr JC, Rouleau JL. Vasopeptidase Inhibitors: A New Therapeutic Concept in Cardiovascular Disease? *Circulation*;2001(104):1856–62.

18. Margulies K, Barclay PL, Burnett Jr JC. The Role of Neutral Endopeptidase in Dogs With Evolving Congestive Heart Failure. *Circulation*. 1995;(91):2036–42.
19. Tamburini P, Koehn J, Gilligan J, Doeg C, Palmesino R, Sharif R, McMartin C, Erion M, Miller M. Rat Vascular Tissue Contains a Neutral Endopeptidase Capable of Degrading Atrial Natriuretic Peptide. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 1989;251(3).
20. Venugopal J. Pharmacological modulation of the natriuretic peptide system. *Expert Opinion Therapeutic Patents*. 2003;13(9):1389–409.
21. Vesterqvist O. Effects of omapatrilat on pharmacodynamic biomarkers of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme activity in humans. *Current Hypertension Reports*. 2001;(3):22–7.
22. Troughton RW, Rademaker MT, Powell JD, Yandle TG, Espiner EA, Frampton CM, Nicholls MG, Richards AM. Beneficial Renal and Hemodynamic Effects of Omapatrilat in Mild and Severe Heart Failure. *Hypertension*. 2000;36(4):523–30. doi:10.1161/01.HYP.36.4.523
23. McClean DR, Ikram H, Garlick AH, Richards A, Nicholls M, Crozier IG. The clinical, cardiac, renal, arterial and neurohormonal effects of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36(2):479–86. doi:10.1016/S0735-1097(00)00741-5
24. Tikkanen T, Tikkanen I, Rockell MD, Allen TJ, Johnston CI, Cooper ME, Burrell LM. Dual Inhibition of Neutral Endopeptidase and Angiotensin-Converting Enzyme in Rats With Hypertension and Diabetes Mellitus. *Hypertension*. 1998;32:778–85.
25. Bäcklund T, Palojoki E, Saraste A, Grönholm T, Eriksson A, Lakkisto P, Tikkanen I. Effect of vasopeptidase inhibitor omapatrilat on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in rat myocardial infarction. *Cardiovasc. Res*. 2003;57(3):727–37. doi:10.1016/S0008-6363(02)00721-6
26. Rouleau JL, Pfeffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Sestier F, Kerut EK, Porter CB, Proulx G, Qian C, Block AJ. Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *The Lancet*. 2000;356(9230):615–20. doi:10.1016/S0140-6736(00)02602-7
27. Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau J-L, Swedberg K. Comparison of Omapatrilat and Enalapril in Patients With Chronic Heart Failure: The Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*. 2002;106(8):920–6. doi:10.1161/01.CIR.0000029801.86489.50
28. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR. Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993–1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077
29. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med*. 2007;356(11):1140–51. eng. doi:10.1056/NEJMra063052



30. Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty Acid Oxidation Enzyme Gene Expression Is Downregulated in the Failing Heart. *Circulation*. 1996;94(11):2837–42. doi:10.1161/01.CIR.94.11.2837
31. Page B, Young R, Iyer V, Suzuki G, Lis M, Korotchkina L, Patel MS, Blumenthal KM, Fallavollita JA, Canty JM. Persistent Regional Downregulation in Mitochondrial Enzymes and Upregulation of Stress Proteins in Swine With Chronic Hibernating Myocardium. *Circulation Research*. 2008;102(1):103–12. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.155895
32. Osorio JC. Impaired Myocardial Fatty Acid Oxidation and Reduced Protein Expression of Retinoid X Receptor-alpha in Pacing-Induced Heart Failure. *Circulation*. 2002;106(5):606–12. doi:10.1161/01.CIR.0000023531.22727.C1
33. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schreppe A, Amorim PA, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc. Res*. 2009;85(2):376–84. doi:10.1093/cvr/cvp344
34. Birner C, Dietl A, Deutzmann R, Schröder J, Schmid P, Jungbauer C, Resch M, Endemann D, Stark K, Riegger G, Luchner A. Proteomic Profiling Implies Mitochondrial Dysfunction in Tachycardia-Induced Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2012;18(8):660–73. doi:10.1016/j.cardfail.2012.06.418
35. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic Mechanisms in Heart Failure. *Circulation*. 2007;116(4):434–48. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.702795
36. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K-i, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction Associated With Oxidative Stress in Failing Hearts After Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2001;88(5):529–35. doi:10.1161/01.RES.88.5.529
37. Marín-García J, Goldenthal MJ, Moe GW. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc. Res*. 2001;52(1):103–10. eng.
38. Quigley AF, Kapsa RM, Esmore D, Hale G, Byrne E. Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*. 2000;6(1):47–55. doi:10.1016/S1071-9164(00)00011-7
39. Ingwall JS. Is the Failing Heart Energy Starved?: On Using Chemical Energy to Support Cardiac Function. *Circulation Research*. 2004;95(2):135–45. doi:10.1161/01.RES.0000137170.41939.d9
40. Weiss RG, Gerstenblith G, Bottomley PA. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(3):808–13. doi:10.1073/pnas.0408962102
41. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest*. 2005;115(3):500–8. eng. doi:10.1172/JCI24408
42. Heusch G, Schulz R. A Radical View on the Contractile Machinery in Human Heart Failure □ □ Editorials published in the *Journal of the American*

- College of Cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(3):310–2. doi:10.1016/j.jacc.2010.06.057
43. Maack C, Böhm M. Targeting Mitochondrial Oxidative Stress in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(1):83–6. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.032
  44. Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(7):777–93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003
  45. Liu Y, Hüttenhain R, Collins B, Aebersold R. Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2013;13(8):811–25. doi:10.1586/14737159.2013.845089
  46. Egertson JD, Kuehn A, Merrihew GE, Bateman NW, MacLean BX, Ting YS, Canterbury JD, Marsh DM, Kellmann M, Zabrouskov V, Wu CC, MacCoss MJ. Multiplexed MS/MS for improved data-independent acquisition. *Nat Meth*. 2013;10(8):744–6. doi:10.1038/nmeth.2528
  47. Röst HL, Rosenberger G, Navarro P, Gillet L, Miladinović SM, Schubert OT, Wolski W, Collins BC, Malmström J, Malmström L, Aebersold R. OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):219–23. doi:10.1038/nbt.2841
  48. Hunter C. Comprehensive Quantification with Qualitative Confirmation using the TripleTOF 5600 System.
  49. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Rost H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6):O111.016717. doi:10.1074/mcp.O111.016717
  50. Schaeffer P, Lehman J. Mitochondrial Isolation (Heart and Skeletal Muscle). 2005.
  51. Vowinckel J, Capuano F, Campbell K, Deery MJ, Lilley KS, Ralser M. The beauty of being (label)-free: sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics. *F1000Res*. 2013. doi:10.12688/f1000research.2-272.v1
  52. Srere PA. Citrate Synthase. *Methods in Enzymology*. 1969;133–11.
  53. Kramer KA. Automated Spectrophotometric Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Enzyme Activities in Cultured Skin Fibroblasts. *Clinical Chemistry*. 2005;51(11):2110–6. doi:10.1373/clinchem.2005.050146
  54. Birner C, Ulucan C, Bratfisch M, Götz T, Dietl A, Schweda F, Riegger GA, Luchner A. Antihypertrophic effects of combined inhibition of the renin–angiotensin system (RAS) and neutral endopeptidase (NEP) in progressive, tachycardia-induced experimental heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012;385(11):1117–25. doi:10.1007/s00210-012-0791-6

55. Boehm EA, Jones BE, Radda GK, Veech RL, Clarke K. Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(3):H977-83.
56. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 1977;252(23):8731-9. eng.
57. Opie LH, Knuuti J. The Adrenergic-Fatty Acid Load in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(18):1637-46. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.024
58. Funada J, Betts TR, Hodson L, Humphreys SM, Timperley J, Frayn KN, Karpe F, Brandstaetter A. Substrate Utilization by the Failing Human Heart by Direct Quantification Using Arterio-Venous Blood Sampling. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7533. doi:10.1371/journal.pone.0007533
59. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes, Lisa, Rogers JG, Kelly DP, Gropler RJ. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(2):271-7. doi:10.1016/S0735-1097(02)01967-8
60. de las Fuentes, L., Herrero P, Peterson LR, Kelly DP, Gropler RJ, Davila-Roman VG. Myocardial Fatty Acid Metabolism: Independent Predictor of Left Ventricular Mass in Hypertensive Heart Disease. *Hypertension*. 2003;41(1):83-7. doi:10.1161/01.HYP.0000047668.48494.39
61. Stanley WC. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*. 2005;85(3):1093-129. doi:10.1152/physrev.00006.2004
62. Rosca M, Minkler P, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: Normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011;1807(11):1373-82. doi:10.1016/j.bbabi.2011.02.003
63. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev*. 2007;12(3-4):331-43. doi:10.1007/s10741-007-9034-1
64. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeyer H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*. 2001;104(24):2923-31. eng.
65. Massie BM, Schaefer S, Garcia J, McKirnan MD, Schwartz GG, Wisneski JA, Weiner MW, White FC. Myocardial High-Energy Phosphate and Substrate Metabolism in Swine With Moderate Left Ventricular Hypertrophy. *Circulation*. 1995;91(6):1814-23. doi:10.1161/01.CIR.91.6.1814
66. Liao R, Nascimben L, Friedrich J, Gwathmey JK, Ingwall JS. Decreased Energy Reserve in an Animal Model of Dilated Cardiomyopathy: Relationship to Contractile Performance. *Circulation Research*. 1996;78(5):893-902. doi:10.1161/01.RES.78.5.893
67. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc. Res*. 2008;81(3):412-9. doi:10.1093/cvr/cvn301

68. Luptak I, Balschi JA, Xing Y, Leone TC, Kelly DP, Tian R. Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ -null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation*. 2005;112(15):2339–46. eng. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.534594
69. Lommi J, Kupari M, Yki-Järvinen H. Free fatty acid kinetics and oxidation in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol*. 1998;81(1):45–50. eng.
70. Paolisso G, Gambardella A, Galzerano D, D'Amore A, Rubino P, Verza M, Teasuro P, Varricchio M, D'Onofrio F. Total-body and myocardial substrate oxidation in congestive heart failure. *Metab. Clin. Exp*. 1994;43(2):174–9. eng.
71. Taylor M, Wallhaus TR, Degrado TR, Russell DC, Stanko P, Nickles RJ, Stone CK. An evaluation of myocardial fatty acid and glucose uptake using PET with [18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid and [18F]FDG in Patients with Congestive Heart Failure. *J. Nucl. Med*. 2001;42(1):55–62. eng.
72. Velasco G, Geelen MJ, Gómez del Pulgar, T, Guzmán M. Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and cytoskeletal components. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(34):21497–504. eng.
73. Guzmán M, Velasco G, Geelen MJ. Do cytoskeletal components control fatty acid translocation into liver mitochondria? *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(2):49–53. eng.
74. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc. Med*. 2002;12(8):339–48. eng.
75. Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Saffitz JE, Schaffer JE. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest*. 2001;107(7):813–22. eng. doi:10.1172/JCI10947
76. Shibayama J, Yuzyuk TN, Cox J, Makaju A, Miller M, Lichter J, Li H, Leavy JD, Franklin S, Zaitsev AV, Dzeja P. Metabolic Remodeling in Moderate Synchronous versus Dyssynchronous Pacing-Induced Heart Failure: Integrated Metabolomics and Proteomics Study. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118974. doi:10.1371/journal.pone.0118974
77. Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry J-P, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Proteomic Analysis of Left Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Heart Failure. *J. Proteome Res*. 2008;7(11):5004–16. doi:10.1021/pr800409u
78. Sorokina N, O'Donnell JM, McKinney RD, Pound KM, Woldegiorgis G, LaNoue KF, Ballal K, Taegtmeier H, Buttrick PM, Lewandowski ED. Recruitment of Compensatory Pathways to Sustain Oxidative Flux With Reduced Carnitine Palmitoyltransferase I Activity Characterizes Inefficiency in Energy Metabolism in Hypertrophied Hearts. *Circulation*. 2007;115(15):2033–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.668665
79. Taegtmeier H, Hems R, Krebs HA. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J*. 1980;186(3):701–11. eng.

80. Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 2000;168(4):657–65. eng. doi:10.1046/j.1365-201x.2000.00717.x
81. Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998;30(9):1757–62. eng. doi:10.1006/jmcc.1998.0739
82. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 2008;80(1):30–9. doi:10.1093/cvr/cvn184
83. Rosca MG, Hoppel CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *J Bioenerg Biomembr.* 2009;41(2):107–12. doi:10.1007/s10863-009-9215-9
84. Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;40(12):2174–81. eng.
85. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, del Nido P, Tian R. Impaired Mitochondrial Biogenesis Precedes Heart Failure in Right Ventricular Hypertrophy in Congenital Heart Disease. *Circulation: Heart Failure.* 2011;4(6):707–13. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.961474
86. Jarreta D, Orús J, Barrientos A, Miró O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, Casademont J. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 2000;45(4):860–5. eng.
87. Boekema EJ, Braun H-P. Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;282(1):1–4. doi:10.1074/jbc.R600031200
88. Fountoulakis M, Soumaka E, Rapti K, Mavroidis M, Tsangaris G, Maris A, Weisleder N, Capetanaki Y. Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005;38(3):461–74. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.008
89. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J. Cell Biol.* 2000;150(6):1283–98. eng.
90. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 1994;27(3):198–219. doi:10.1002/jemt.1070270303
91. Rappaport L, Oliviero P, Samuel JL. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol. Cell. Biochem.* 1998;184(1-2):101–5. eng.
92. Inagaki T, Kobayashi S, Ozeki N, Suzuki M, Fukuzawa Y, Shimizu K, Kato K. Ultrastructural identification of light microscopic giant mitochondria in alcoholic liver disease. *Hepatology.* 1992;15(1):46–53. eng.

93. Nishino I, Kobayashi O, Goto Y, Kurihara M, Kumagai K, Fujita T, Hashimoto K, Horai S, Nonaka I. A new congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve*. 1998;21(1):40–7. eng.
94. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, Banchieri N, Bellini O, Dal Bello B, Pilotto A, Magrini G, Campana C, Fortina P, Gavazzi A, Narula J, Viganò M. Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial Abnormalities in Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(5):1501–10. doi:10.1016/S0002-9440(10)65738-0
95. Djaldetti M. Mitochondrial abnormalities in the cells of myeloma patients. *Acta Haematol*. 1982;68(3):241–8. eng.
96. Brdiczka D, Bücheler K, Kottke M, Adams V, Nalam VK. Characterization and metabolic function of mitochondrial contact sites. *Biochim. Biophys. Acta*. 1990;1018(2-3):234–8. eng.
97. Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova JO, Kesvatera T, Tiivel T. Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by Creatine Kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1995;27(1):625–45. doi:10.1016/S0022-2828(08)80056-9
98. Tagawa H, Koide M, Sato H, Zile MR, Carabello BA, Cooper G. Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circulation Research*. 1998;82(7):751–61. eng.
99. Zhou Y-T, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(4):1784–9. doi:10.1073/pnas.97.4.1784
100. Lushnikova EL, Nepomnyashchikh LM, Sviridov EA, Klinnikova MG. Ultrastructural signs of cyclophosphamide-induced damage to cardiomyocytes. *Bull Exp Biol Med*. 2008;146(3):366–71. doi:10.1007/s10517-008-0287-z
101. Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, Toyo-Oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *The American Journal of Pathology*. 2006;168(2):386–97. eng. doi:10.2353/ajpath.2006.050137
102. Gupte AA, Hamilton DJ, Cordero-Reyes AM, Youker KA, Yin Z, Estep JD, Stevens RD, Wenner B, Ilkayeva O, Loebe M, Peterson LE, Lyon CJ, Wong, S. T. C., Newgard CB, Torre-Amione G, Taegtmeyer H, Hsueh WA. Mechanical Unloading Promotes Myocardial Energy Recovery in Human Heart Failure. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2014;7(3):266–76. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000404
103. Qanud K, Mamdani M, Pepe M, Khairallah RJ, Gravel J, Lei B, Gupte SA, Sharov VG, Sabbah HN, Stanley WC, Recchia FA. Reverse changes in cardiac substrate oxidation in dogs recovering from heart failure. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295(5):H2098-H2105. doi:10.1152/ajpheart.00471.2008

104. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex Heart Inst J*. 2013;40(4):385–94. eng.
105. Jain-Ghai S, Cameron JM, Al Maawali A, Blaser S, MacKay N, Robinson B, Raiman J. Complex II deficiency-A case report and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* 2013;161(2):285–94. doi:10.1002/ajmg.a.35714
106. Marin-Garcia J, Hu Y, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Pierpont GL, Goldenthal MJ. A point mutation in the cytb gene of cardiac mtDNA associated with complex III deficiency in ischemic cardiomyopathy. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;40(3):487–95. eng.
107. Wende AR. Post-translational modifications of the cardiac proteome in diabetes and heart failure. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(1):25–38. eng. doi:10.1002/prca.201500052
108. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper G. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science*. 1993;260(5108):682–7. eng.

## Eidesstattliche Erklärung

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

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum, Unterschrift



# Lebenslauf/Vita

Laura Grois, geb. 08.05.1991 in Stuttgart

## Schulische Ausbildung

- 1997–2001 Besuch der Grundschule Ostheim in Stuttgart
- 2001–2010 Besuch des Ev. Heidehofgymnasium, Stuttgart

## Studium/Beruf

- 2010–2012 Medizinstudium an der Universität Regensburg, vorklinischer Abschnitt
- 2012–2016 Medizinstudium an der Universität Regensburg, klinischer Abschnitt
- 2017 Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie, Marienhospital Stuttgart

## Veröffentlichungen

**Grois L.**, Hupf J., Reinders J., Schröder J., Dietl A., Schmid PM., Jungbauer C., Resch M., Maier LS., Luchner A., Birner C. Combined Inhibition of the Renin-Angiotensin System and Nephilysin Positively Influences Complex Mitochondrial Adaptations in Progressive Experimental Heart Failure. PLoS One. 2017 Jan 11;12(1):e0169743. doi: 10.1371/journal.pone.0169743.

# Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. Christoph Birner für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung. Ich konnte jederzeit auf schnelle und unkomplizierte Unterstützung zurückgreifen, was wesentlich zu dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Frau Ingrid Winkel danke ich für die hervorragende Betreuung im Labor, sowie die unermüdliche Unterstützung und dem fachlichen Beistand im Rahmen der Methodenoptimierung und -durchführung.

Mein Dank gilt ebenso der Arbeitsgruppe experimentelle Herzinsuffizienz für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und Hilfsbereitschaft, die mir das Erstellen der Arbeit erleichterten.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie für die Stärkung und Motivierung danken, sowie für die Unterstützung während meines kompletten Studiums.