

Aus dem Lehrstuhl  
für Innere Medizin II  
Prof. Dr. med. Lars Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Reaktive Sauerstoffspezies in hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten einer ARVC  
Patientin mit Plakophilin 2 Mutation

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Näbauer

2024



Aus dem Lehrstuhl  
für Innere Medizin II  
Prof. Dr. med. Lars Maier  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Reaktive Sauerstoffspezies in hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten einer ARVC  
Patientin mit Plakophilin 2 Mutation

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Näbauer

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Maier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Silke Härteis

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2024

# Reaktive Sauerstoffspezies in hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten einer ARVC Patientin mit einer Plakophilin 2 Mutation

## Inhalt

Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis .....	10
Formelverzeichnis .....	11
Abkürzungsverzeichnis .....	12
1. Einleitung.....	16
1.1. ARVC.....	16
1.1.1. Überblick .....	16
1.1.2. Genetische Grundlagen und Epidemiologie.....	16
1.1.3. Pathophysiologie .....	17
1.1.4. Krankheitsverlauf.....	18
1.1.5. Diagnostik.....	18
1.1.6. Therapie .....	23
1.1.7. Prognose .....	24
1.2. reaktive Sauerstoffspezies.....	25
1.2.1. Definition und Entstehung .....	25
1.2.2. wichtige ROS Produzenten .....	26
1.2.3. zelluläre Verteidigungsmechanismen gegen Sauerstoffradikale.....	29
1.2.4. Wirkungen von ROS auf Kardiomyozyten.....	30
1.2.5. Die Rolle von Mitochondrien .....	33

1.3.	Kardial vorliegende Glucose .....	35
1.3.1.	Glucose Transporter der GLUT-Familie .....	35
1.3.2.	Glucose Transporter der SGLT-Familie .....	35
1.4.	Ziel des Projekts .....	37
2.	Material und Methoden .....	38
2.1.	Fluoreszenzmessung am Tecan .....	38
2.1.1.	Funktiosprinzip .....	38
2.1.2.	MitoSox™ Red .....	38
2.1.3.	Antimycin A .....	38
2.1.4.	N-Acetyl-Cystein .....	38
2.1.5.	Messprotokoll .....	38
2.1.6.	Material .....	40
2.1.7.	Datenauswertung: .....	43
2.2.	Konfokalmikroskopie .....	44
2.2.1.	Funktionsprinzip .....	44
2.2.2.	MitoSox™ Red .....	47
2.2.3.	MitoTracker™ Green .....	47
2.2.4.	Messprotokoll .....	47
2.2.5.	Datenauswertung .....	48
2.3.	Real-Time PCR .....	49
2.3.1.	RNA Isolation .....	49
2.3.2.	cDNA Transkription .....	49
2.3.3.	Real Time PCR und TaqMan Analyse .....	50
2.3.4.	Datenauswertung .....	52
2.4.	Western Blot .....	52
2.4.1.	Herstellung von Zell Lysaten .....	52

2.4.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.4.3.	Blotting .....	55
2.4.4.	Immunmarkierung und Detektion .....	56
2.4.5.	Datenauswertung .....	58
2.5.	Kultur der hiPSC Kardiomyozyten und Differenzierung zu iCM.....	58
2.5.1.	Differenzierung zu iCM.....	59
3.	Ergebnisse.....	63
3.1.	Fluoreszenz-Messung der mitochondrialen Sauerstoffradikale im Tecan ....	63
3.1.1.	Optimierung des Versuch-Aufbaus .....	63
3.1.2.	Verhalten der mtROS bei den Zellen ohne Behandlung .....	64
3.1.3.	Anstieg von mtROS bei Behandlung mit Antimycin A.....	65
3.1.4.	Hemmung der ROS durch Zugabe von NAC .....	67
3.2.	Kolokalisation der ROS in den Mitochondrien .....	69
3.3.	Proteinbestimmung mit Western Blot und Expression der mRNA durch die qPCR .....	71
3.3.1.	NADPH-Oxidasen (NOX) .....	71
3.3.2.	Komplexe der Atmungskette .....	74
3.3.3.	Glukosetransporter.....	79
3.3.4.	Superoxid-Dismutase 2 (SOD2).....	82
4.	Diskussion .....	84
4.1.	Unterschiede der mitochondrialen ROS zwischen den Zelllinien .....	84
4.2.	Schutz vor ROS durch das Antioxidans N-Acetyl-Cystein .....	85
4.3.	Einfluss von NADPH-Oxidasen.....	86
4.3.1.	NADPH-Oxidase 2 .....	86
4.3.2.	NADPH-Oxidase 4 .....	88
4.4.	Einfluss durch die Komplexe der Atmungskette .....	89

4.5. Einfluss durch die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) .....	90
4.6. Einfluss von Glukosetransportern .....	92
4.6.1. SGLT1 .....	92
4.6.2. GLUT4 .....	93
5. Zusammenfassung .....	94
6. Ausblick .....	95
7. Referenzen .....	96
8. Danksagung .....	105

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> invertierte T-Welle .....	20
<b>Abbildung 2:</b> Epsilon Welle.....	20
<b>Abbildung 3:</b> verlängerte terminale Aktivierungsdauer .....	20
<b>Abbildung 4:</b> fragmentierter QRS-Komplex .....	20
<b>Abbildung 5:</b> Schema zur prognostischen Stratifizierung von Patienten mit ARVC nach ihrem klinischen Erscheinungsbild.....	24
<b>Abbildung 6:</b> Vereinfachte Darstellung des Verlaufs der Protonen und Elektronen in der menschlichen Atmungskette.....	27
<b>Abbildung 7:</b> Ungleichverteilung von Energiebedarf und -bereitstellung führt zu Herzversagen:.....	34
<b>Abbildung 8:</b> Aufteilung der Platte .....	40
<b>Abbildung 9:</b> schematische Darstellung eines Konfokalmikroskop mit Lichtverlauf. 46	
<b>Abbildung 10:</b> Anstieg der relativen mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (mtROS) bei der Erhöhung der Konzentration von Antimycin A von 5 $\mu$ M auf 7 $\mu$ M. ....	63
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich der absoluten mtROS Fluoreszenzwerte von den Zellen der Indexpatientin, den korrigierten Zellen und den Zellen der Kontrollpatientin jeweils ohne Behandlung.....	64
<b>Abbildung 12:</b> Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der Zellen der Indexpatientin mit Antimycin A 7 $\mu$ M:.....	65
<b>Abbildung 13:</b> Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der Zellen der Kontrollpatientin mit Antimycin A 7 $\mu$ M: .....	66
<b>Abbildung 14:</b> Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der korrigierten Zellen mit Antimycin A 7 $\mu$ M: .....	66
<b>Abbildung 15:</b> Hemmung der mitochondrialen Sauerstoffradikale durch Zugabe von N-Acetyl-Cystein (NAC) zu den Zellen.....	69
<b>Abbildung 16:</b> Mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Kardiomyozyten verschiedener Zellreihen, welche die Kollokalisierung der Sauerstoffradikale in den Mitochondrien darstellen. ....	70

- Abbildung 17:** Expression der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....72
- Abbildung 18:** Expression der mRNA der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt. ....72
- Abbildung 19:** Expression der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....73
- Abbildung 20:** Expression der SDHA (Komplex II) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt. Statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$ .....75
- Abbildung 21:** Expression der mRNA der SDHA (Komplex II) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....76
- Abbildung 22:** Originalregistrierung des Komplex II (SDHA) der Atmungskette (obere Reihe) und von GAPDH (untere Reihe) im Western Blot. ....76
- Abbildung 23:** Expression der UQCR2 (Komplex III) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt. ....77
- Abbildung 24:** Expression der mRNA der UQCR2 (Komplex III) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....78
- Abbildung 25:** Expression der SGLT1 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf

Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....	79
<b>Abbildung 26:</b> Expression der mRNA der SGLT1 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....	80
<b>Abbildung 27:</b> Expression des GLUT4 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....	81
<b>Abbildung 28:</b> Expression der SOD2 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....	82
<b>Abbildung 29:</b> Expression der mRNA der SOD2 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.....	83
<b>Abbildung 30:</b> Ausschnitt aus einer schematischen Darstellung eines Kardiomyozyten mit Mitochondrium:.....	87
<b>Abbildung 31:</b> Ausschnitt aus einer schematischen Darstellung eines Kardiomyozyten mit Mitochondrium:.....	89
<b>Abbildung 32:</b> Bild einer schematischen Darstellung eines Mitochondriums. ....	91

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> verschiedene Typen von ARVC mit zugehörigen verursachenden Genen, abgewandelt aus Romero, Mejia-Lopez et al. 2013 (4) .....	17
<b>Tabelle 2:</b> beispielshafte typische EKG-Veränderungen bei der ARVC .....	20
<b>Tabelle 3:</b> Task Force Kriterien zur Diagnosestellung der ARVC (Abgewandelt aus Corrado et al. 2017 (1) und Marcus et al. 2010 (14)).....	21
<b>Tabelle 4:</b> Oxidative Phosphorylierung. Abgewandelt aus Müller-Esterl (2004) (30)	28
<b>Tabelle 5:</b> Zellkulturmedium, gelöst in DMEM ohne Glucose .....	41
<b>Tabelle 6:</b> 10-fach Normatyrode, geöst in ddH <sub>2</sub> O.....	42
<b>Tabelle 7:</b> 1-fach Normaltyrode, gelöst in ddH <sub>2</sub> O .....	42
<b>Tabelle 8:</b> Regenzien für Tecan Messung.....	43
<b>Tabelle 9:</b> Einstellungen des Lasers am Konfokalmikroskop .....	47
<b>Tabelle 10:</b> Fluoreszenzfarbstoffe .....	48
<b>Tabelle 11:</b> Mastermix für reverse Transkription .....	50
<b>Tabelle 12:</b> Schema der real time PCR.....	51
<b>Tabelle 13:</b> Master-Mix für Real Time PCR.....	51
<b>Tabelle 14:</b> Zusammensetzung des Lysepuffers in ddH <sub>2</sub> O .....	53
<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung des Ladepuffers in ddH <sub>2</sub> O .....	54
<b>Tabelle 16:</b> Trenngel für Gelelektrophorese .....	54
<b>Tabelle 17:</b> Sammelgel für Gelelektrophorese .....	55
<b>Tabelle 18:</b> Lösungen Tris/SDS, pH 6,8 und pH 8,8 .....	55
<b>Tabelle 19:</b> Gelelektrophorese-Laufpuffer pH:8,3: .....	55
<b>Tabelle 20:</b> Transferpuffer .....	55
<b>Tabelle 21:</b> TBS-T (Tris-Buffered Saline mit Tween 20) .....	56
<b>Tabelle 22:</b> primäre Antikörper .....	57
<b>Tabelle 23:</b> sekundäre Antikörper .....	58
<b>Tabelle 24:</b> zeitliche Anwendung von Medien und Wachstumsbedingungen zur Differenzierung der human induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) zu induzierten Kardiomyozyten (iCM).....	60
<b>Tabelle 25:</b> verschiedene Medien zur Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu induzierten Kardiomyozyten.....	61

## Formelverzeichnis

<b>Formel 1:</b> Reduktion von Sauerstoff zu Wasser über Zwischenstufen (21) .....	25
<b>Formel 2:</b> Reaktion des Superoxids zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff durch die Superoxid-Dismutase.....	29
<b>Formel 3:</b> Reaktion des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff durch die Katalase .....	29

## Abkürzungsverzeichnis

**AA** – Antimycin

**ACTB** – beta-Actin

**APS** - Ammoniumpersulfat

**ARVC** – arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

**ASK1** – apoptosis signal regulating kinase 1

**BCA** – Bicinchoninsäure

**cDNA** – komplementäre DNA

**Ct(x)** – threshold Zyklus der Zielamplifikation

**ddH<sub>2</sub>O** – destilliertes Wasser

**DMSO** – Dimethylsulfoxid

**DNA** - Desoxyboribonukleinsäure

**DSC2** – Desmocollin 2

**DSG2** – Desmoglein 2

**DSP** – Desmoplakin

**ECC** – Excitation Contraction Coupling = Elektromechanische Kopplung

**EF** – Ejektionsfraktion

**EKG** – Elektrokardiogramm

**FAO** – Fettsäureoxidation

**FBS** – fetales Rinderserum

**FGF** – Fibroblasten Wachstumsfaktoren

**FRET** – Fluoreszenzresonanzenergietransfer

**GAPDH** – Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

**GLUT** – Glukose Transporter

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Wasserstoffperoxid

**hiPSC-CM** – aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen -abgeleitete Kardiomyozyten

**ICD** – implantierbarer Kardioverter Defibrillator

**iCM** – induzierte Kardiomyozyten

**JUP** – Plakoglobin

**KOF** – Körperoberfläche

**LBBB** – left bundle branch block (dt. Linksschenkelblock)

**LSB** – Linksschenkelblock

**MCC** – Mander's Colocalisations Coefficient

**mRNA** – messenger ribonucleic acid = Boten Ribonukleinsäure

**mtDNA** – mitochondriale DNA

**mtRNA** – mitochondriale RNA

**mtROS** – mitochondriales ROS

**NAC** – N-acetyl-cystein

**NaF** – Natriumflourid

**NOS** – Stickstoffmonoxid-Synthase

**NOX** – NADPH-Oxidase

**NT** – Normaltyrode

**NT** – Normaltyrode

**O<sub>2</sub>** – Sauerstoff

**O<sup>2-</sup>** – Superoxid

**PBS** – phosphate buffered saline

**PCC** – Pearsons Correlation Coefficient

**PCR** – Polymerase-Kettenreaktion

**PLAX** – parasternal long axis view

**PSAX** – parasternal short axis view

**PVB** – premature ventricular beats

**RNA** – Ribonukleinsäure

**RNS** – reaktive Stickstoffspezies

**ROS** – reaktive Sauerstoffspezies

**RSB** – Rechtsschenkelblock

**RT** – Raumtemperatur

**RV** – rechter Ventrikel

**RVOT** – right ventricular outflow tract

**RYR** – Ryanodin Rezeptor

**SCD** – plötzlicher Herztod

**SDHA** – Succinat Dehydrogenase

**SDS** – Natriumdodecylsulfat

**SDS-Page** – SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

**SEM** – Standardfehler der Mittelwerte

**SERCA** – Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums

**SGLT** – Natrium-Glukose Kotransporter

**SOD** – Superoxiddismutase

**TAD** – terminale Aktivierungsdauer

**TEMED** – Tetramethylethyldiamin

**TGFB** – Transforming growth factor beta

**Tris** – Trishydroxymethyl-aminomethan

**TSC** – task force Kriterien

**Tween20** – Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat

**U/min** – Umdrehungen pro Minute

**UQCR2** – Ubiquinol-Cytochrome- Reduktase core protein 2

**VT** – Ventrikuläre Tachykardie

**w/o** – without = ohne

# 1. Einleitung

## 1.1. ARVC

### 1.1.1. Überblick

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine genetisch vererbare Herzerkrankung, die hauptsächlich den rechten Ventrikel, seltener auch den linken Ventrikel, betrifft. Sie schreitet progredient fort und ist charakterisiert durch fibröse und fettige Einlagerungen in das Myokard. Klinisch zeigt sich die Erkrankung in ventrikulärer Arrhythmie, Palpitationen, Synkope bis hin zum plötzlichen Herztod (SCD). Häufig sind vor allem junge sportliche Personen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr betroffen, was auf eine schnellere Progression der Erkrankung durch körperliche Belastung hindeutet. Da die Erkrankung noch nicht gut erforscht ist, ist eine Diagnose mit ARVC schwer zu stellen und kann nur symptomatisch oder präventiv behandelt werden. (2)

### 1.1.2. Genetische Grundlagen und Epidemiologie

Die Wahrscheinlichkeit an ARVC zu erkranken liegt in der Allgemeinbevölkerung zwischen 1:2000 und 1:5000 (3), wobei Frauen im Vergleich zu Männern mit einem Verhältnis von 1:3 deutlich seltener betroffen sind. Da die Diagnose schwer zu stellen ist, kann man die genaue Inzidenz dieser Erkrankung nicht sicher abschätzen. (4)

Durch Mutationen an verschiedenen Genloci, die für verschiedene Proteine kodieren, kann man die ARVC in 12 verschiedene Typen unterteilen (siehe Tabelle 1) (4). Die häufigsten Typen sind bedingt durch Mutationen an Genen, die für desmosomale Proteine kodieren, während nur wenige durch Mutationen an nicht desmosomalen Genen verursacht werden (2). Zu den desmosomalen Proteinen gehören unter anderem Plakoglobin (JUP), Desmoplakin (DSP), Plakophilin 2 (PKP2), Desmoglein-2 (DSG2) und Desmocollin-2 (DSC2). Der vermutlich häufigste Typ, mit einer Prävalenz von 11%-43%, ist bedingt durch verschiedene Mutationen eines Genlocus, das für PKP2 kodiert. Dieser wird als ARVD9 bezeichnet. (2,4-7)

Zwar ist bekannt, dass eine Mutation im PKP2 Gen zu ARVC führt, welche genauen Konsequenzen dies jedoch auf die Kardiomyozyten hat, ist noch wenig erforscht. (8)

Desmosomen sind verantwortlich für den Zell-Zell-Kontakt in der Haut und im Myokard, ebenso wie für die inter- und intrazelluläre Signalübertragung (2). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es durch Mutation in kodierenden Proteinen in Kombination mit mechanischen Stress, zum Ablösen von Myozyten untereinander kommt, was zu Problemen der elektrischen Signalübertragung führen kann (9).

**Tabelle 1:** verschiedene Typen von ARVC mit zugehörigen verursachenden Genen, abgewandelt aus Romero, Mejia-Lopez et al. 2013 (4)

<b>Typ</b>	<b>Gen</b>
ARVC1	TGFB3
ARVC2	RYR2
ARVC8	DSP
ARVC9	PKP2
ARVC10	DSG2
ARVC11	DSC2
ARVC12	JUP

### 1.1.3. Pathophysiologie

Histologisch zeigt sich eine progredient fortschreitende fibrös-fettige Infiltration in das Myokard, welche vom Epikard ins Endokard fortschreitet. Das führt zu einer Verdünnung der Herzwand bis hin zu Aneurysma Bildung. Die alleinige Einlagerung von Fett in das Myokard ist nicht pathognomonisch für ARVC, da diese bis zu einer gewissen Ausprägung physiologisch ist. Besonders für die ARVC ist jedoch die fibröse Umwandlung der Herzzellen in Kombination mit Fetteinlagerung. (4,6,10)

Teilweise kann man auch inflammatorische Infiltrationen finden, wobei nicht klar ist, ob diese durch den Zelltod der Kardiomyozyten hervorgerufen werden oder Folge von immunologischen oder infektiösen Ereignissen sind. (2,6)

Besonders betroffen von allem Genannten ist der rechte Ventrikel, in späteren Stadien genauso der linke Ventrikel und hier besonders die inferioren, apikalen und infundibulären Wandabschnitte (Triangel der Dysplasie) (2,4). Man vermutet, dass diese Bereiche besonders befallen sind, da hier der mechanische Stress an der dünnen Herzwand des rechten Ventrikels und posterolateral am linken Ventrikel besonders stark sind (6). Folge dieses Zelluntergangs und der fibrös-fettigen

Einlagerung sind Arrhythmien, welche das Risiko eines plötzlichen Herztodes (SCD) steigern, und die für das Krankheitsbild typische Epsilon-Welle im EKG verantwortlich sind (siehe Tabelle 2, Abbildung 2).

#### 1.1.4. Krankheitsverlauf

Die Erkrankung ist in ihrem Auftreten sehr variabel und präsentiert sich in einem klinisch großen Spektrum. Vor allem bei sportlicher Belastung manifestiert sich ein klinisches Bild in Form von Palpitationen, Synkopen und Brustschmerzen. Die Erkrankung kann auch als erstes Symptom den SCD aufweisen. Sie kann in vier verschiedene Phasen unterteilt werden. (4,7,11)

Die erste Phase verläuft meistens still und weist lediglich eine leichte Form von Arrhythmie auf. Bemerkbar wird diese Phase meist nur im Zuge eines Familienscreenings. (4) Strukturelle Veränderungen am Herzmuskel können vorkommen, sind jedoch kein Kriterium (7).

Die zweite Phase ist geprägt von Palpitationen und Arrhythmien, ausgehend vom rechten Ventrikel und oft ausgelöst durch körperliche Belastung. Diese können zu Synkopen bis hin zum SCD führen und ist die klassische erste klinische Manifestation der Erkrankung vor allem bei jungen Patienten. (7)

Die darauffolgende dritte Phase der ARVC hat ihren Ursprung im fortschreitenden Austausch von Myokardzellen mit fibrös-fettigem Gewebe. Dadurch kommt es zu wachsendem Funktionsverlust des rechten Ventrikels (RV), was zur Dilatation und Rechtsherzversagen führt. (4,7)

Die vierte und letzte Phase ist charakterisiert durch ein Fortschreiten der Erkrankung auf den linken Ventrikel, wodurch es zum biventrikulären Herzversagen kommt. (4)

#### 1.1.5. Diagnostik

Die klinische Manifestation der ARVC ist variabel und die Spezifität der elektrokardiographischen Tests ist gering, weshalb sich die Diagnosestellung schwierig darstellt (1,4,7,12).

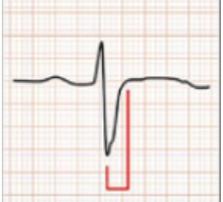
Das typische Alter der Erstmanifestation liegt zwischen dem 20. und dem 50. Lebensjahr. Daraus ergibt sich die Empfehlung für regelmäßige

Vorsorgeuntersuchungen zwischen dem 10. und dem 60. Lebensjahr sollte eine familiäre Belastung bekannt sein. (7)

Eine ARVC sollte in Betracht gezogen werden, wenn vor allem bei jungen Patienten folgende Symptome auftreten: Palpitationen, Synkope, Ventrikuläre Tachykardie (VT) mit Linksschenkelblock (LBBB) und verschiedenen EKG Abnormalitäten (siehe Tabelle 2). Doch auch ein asymptomatischer Verlauf, bei dem als erstes Symptom der SCD auftritt, kommt vor. (1,4,7)

Der Goldstandard der Diagnosestellung wird von den, seit 2010 in dieser Form bestehenden Task Force Kriterien (TSC), gestellt. Diese bestehen aus sogenannten großen Kriterien und kleinen Kriterien, die verschiedene diagnostische Merkmale darstellen (siehe Tabelle 3). Wenn man zwei große Kriterien oder ein großes und zwei kleine Kriterien oder vier kleine Kriterien erfüllt, gilt die Diagnose ARVC als gesichert. (4,6,7,10) Dabei werden nicht-invasive Untersuchungen, wie EKG, Echokardiographie und andere, an erster Stelle durchgeführt und invasive Untersuchungen wie Biopsien der Ventrikel, nur bei einer Patientengruppe mit hohem Risiko (7).

**Tabelle 2:** beispielshafte typische EKG-Veränderungen bei der ARVC

<b>EKG-Veränderung</b>	<b>Grund für Veränderung</b>	<b>EKG</b>
<b>Invertierte T-Wellen V1-V3 (V4)</b>	Abnormalitäten bei der Repolarisation des rechten Ventrikels; wenn diese auch in II, III, aVF sichtbar ist, kann schon der linke Ventrikel betroffen sein. (2,13)	 <p><b>Abbildung 1:</b> invertierte T-Welle aus Iqbal, Kamarullah et al. 2024 (13)</p>
<b>Epsilon Welle und QRS-Verlängerung</b>	Abnormalitäten in der Signalweiterleitung durch strukturelle Veränderungen führt zu einer Verlängerung der Depolarisation und zu einer geringeren Amplitude (2,13).	 <p><b>Abbildung 2:</b> Epsilon Welle aus Iqbal, Kamarullah et al. 2024 (13)</p>
<b>verlängerte terminale Aktivierungsdauer (TAD)</b>	Durch die Verzögerung in der Endaktivierung (13).	 <p><b>Abbildung 3:</b> verlängerte terminale Aktivierungsdauer aus Iqbal, Kamarullah et al. 2024 (13)</p>
<b>Fragmentierter QRS-Komplex</b>	Da das Signal durch zerstörtes Gewebe und somit über Umwege geleitet wird, kommt es zu einem fragmentierten QRS-Komplex (13).	 <p><b>Abbildung 4:</b> fragmentierter QRS-Komplex aus Iqbal, Kamarullah et al. 2024 (13)</p>

**Tabelle 3:** Task Force Kriterien zur Diagnosestellung der ARVC (Abgewandelt aus Corrado et al. 2017 (1) und Marcus et al. 2010 (14))

<b>1. Globale oder regionale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen</b>		
	<b>Minor</b>	<b>Major</b>
2D Echo	Regionale Akinesie oder Dyskinesie des RV <b>und</b> eines der folgenden Kriterien (enddiastolisch):	Regionale Akinesie Dyskinesie oder Aneurysma des RV <b>und</b> eines der folgenden Punkte:
	– PLAX RVOT $\geq 29$ bis $< 32$ mm (korrigiert nach Körpergröße PLAX/KOF $\geq 16$ bis $< 19$ mm/m <sup>2</sup> )	– PLAX RVOT $\geq 32$ mm (korrigiert nach Körpergröße PLAX/KOF $\geq 19$ mm/m <sup>2</sup> )
	– PSAX RVOT $\geq 32$ bis $< 36$ mm (korrigiert nach Körpergröße PSAX/KOF $\geq 18$ bis $< 21$ mm/m <sup>2</sup> )	– PSAX RVOT $\geq 36$ mm (korrigiert nach Körpergröße PSAX/KOF $\geq 21$ mm/m <sup>2</sup> )
	– oder RV-Flächenverkürzung $> 33$ bis $\leq 40\%$	oder RV-Flächenverkürzung $\leq 33\%$
MRT	Regionale RV-Akinesie oder -Dyskinesie oder dyssynchrone RV-Kontraktion <b>und</b> eines der folgenden Kriterien (enddiastolisch gemessen):	Regionale RV-Akinesie oder -Dyskinesie oder dyssynchrone RV-Kontraktion <b>und</b> eines der folgenden Kriterien (enddiastolisch gemessen):
	– Verhältnis enddiastolisches RV-Volumen/KOF $\geq 100$ bis $< 110$ ml/m <sup>2</sup> (Männer), $\geq 90$ bis $< 100$ ml/m <sup>2</sup> (Frauen)	– Verhältnis enddiastolisches RV-Volumen/KOF $\geq 110$ ml/m <sup>2</sup> (Männer), $\geq 100$ ml/m <sup>2</sup> (Frauen)
	– oder RVEF $41$ bis $\leq 45\%$	– oder RVEF $\leq 40\%$
RV-Angiographie	--	Regionale Akinesie, Dyskinesie oder Aneurysma des RV

Abkürzungen: PSAX: parasternal short axis view, PLAX: parasternal long axis view, RV: rechter Ventrikel, RVOT: right ventricular outflow tract, KOF: Körperoberfläche, RVEF: rechtsventrikuläre Auswurfraction

<b>2. Gewebecharakteristik des Myokards (Histopathologie, Endomyokardbiopsie)</b>	
<b>Minor</b>	<b>Major</b>
60–75% verbleibender Myozytenanteil, morphometrisch (oder geschätzt 50–65%), mit fibrotischem Ersatz des Myokards der freien Wand des RV in $\geq 1$ Gewebeprobe, mit oder ohne Ersatz des Myokards durch Fettgewebe in mindestens einer Endomyokardbiopsie	verbleibender Myozytenanteil $< 60\%$ morphometrisch (oder geschätzt $< 50\%$ ), mit fibrotischem Ersatz des Myokards der freien Wand des RV in $\geq 1$ Gewebeprobe, mit oder ohne Ersatz des Myokards durch Fettgewebe in mindestens einer Endomyokardbiopsie

<b>3. Repolarisationsstörungen (im EKG)</b>	
<i>Minor</i>	<i>Major</i>
– im EKG: T-Negativierung (V1 und V2) bei Alter > 14 Jahre ohne kompletten Rechtsschenkelblock (RSB) oder T-Negativierung in V4, V5 oder V6	– im EKG: T-Negativierung in den rechtspräkordialen Ableitungen (V1, V2 und V3) oder darüber hinaus bei Alter > 14 Jahre, ohne kompletten RSB (QRS $\geq$ 120 ms)
– im EKG: T-Negativierung (V1-V4) bei Alter > 14 Jahre, mit kompletten RSB	

<b>4. Depolarisations- und AV-Überleitungsstörungen (im EKG)</b>	
<i>Minor</i>	<i>Major</i>
– Spätpotenziale im signalgemittelten EKG bei mindestens einem von drei Parametern, bei Abwesenheit der QRS - Dauer von $\geq$ 110 ms im Standard-EKG	– im EKG: Epsilonpotenzial/-welle (reproduzierbares Signal geringer Amplitude zwischen dem Ende des QRS-Komplexes und dem Beginn der T-Welle) in den rechtspräkordialen Ableitungen (V1-V3)
– im EKG: gefilterte QRS-Dauer (fQRS) $\geq$ 114 ms	
– im EKG: Dauer des terminalen QRS < 40 $\mu$ V, $\geq$ 38 ms	
– im EKG: quadratischer Mittelwert der terminalen 40 ms $\leq$ 20 $\mu$ V	
– im EKG: TAD (terminal activation duration) des QRS-Komplexes $\geq$ 55 ms gemessen vom Nadir der S-Zacke bis zum Ende des QRS-Komplexes incl. R', in V1, V2 oder V3, ohne kompletten RSB	

<b>5. Arrhythmien (Herzrhythmusstörungen im EKG)</b>	
<i>Minor</i>	<i>Major</i>
– nicht anhaltende oder anhaltende ventrikuläre Tachykardie mit rechtsventrikulärer Ausfluss-Konfiguration, mit Linksschenkelblock (LSB) - Morphologie mit inferiorer Achse (positiver QRS-Komplex in den Ableitungen II, III und aVF und negativer QRS-Komplex in Ableitung aVL) oder unbekannter Achse	nicht anhaltende oder anhaltende ventrikuläre Tachykardie mit LSB-Morphologie und superiorer Achse (negativer oder unbestimmter QRS-Komplex in den Ableitungen II, III und aVF und positiver QRS-Komplex in Ableitung aVL)
– > 500 ventrikuläre Extrasystolen in 24h im Langzeit-EKG	

<b>6. Familienanamnese</b>	
<i>Minor</i>	<i>Major</i>
– Anamnese von ARVC bei Blutsverwandten 1. Grades, bei dem die derzeit geltenden Task-Force-Kriterien nicht überprüft werden können	– ARVC bei Blutsverwandten 1. Grades aufgrund der derzeit geltenden Task-Force-Kriterien gesichert
– frühzeitiger plötzlicher Herztod (< 35 Jahre) mit Verdacht auf ARVC bei Blutsverwandten 1. Grades	– ARVC bei Blutsverwandten 1. Grades pathologisch gesichert durch Autopsie oder Herz-Operation
– gesicherte ARVC (pathologisch oder anhand der derzeit geltenden Task-Force-Kriterien) bei Blutsverwandten 2. Grades	– Nachweis einer pathogenen Mutation (klassifiziert als assoziiert oder möglicherweise assoziiert mit ARVC) beim untersuchten Patienten

### 1.1.6. Therapie

Grundsätzlich wird als erste lebensverlängernde Maßnahme von körperlicher Belastung und Sport abgeraten. Denn dabei kommt es nachweislich vermehrt zu lebensbedrohlichen Arrhythmien und somit zum plötzlichen Herztod. Ebenso schreitet dadurch der Krankheitsverlauf schneller fort. (2,5,15)

Medikamente mit antiarrhythmischer Wirkung werden als first-line Therapie empfohlen. Antiarrhythmika der Klasse III wie Amiodaron, Beta-Blocker und Sotalol (unselektiver beta-Blocker) werden klassischerweise verabreicht, um sowohl Arrhythmien vorzubeugen als auch den mechanischen Stress auf die Herzwand zu verringern. (1,2,6,16) Das Klasse Ic Antiarrhythmikum Flecanid in Kombination mit einem Betablocker erweist sich zunehmend als geeignete Therapie (16,17). Bei bestehender Herzinsuffizienz wird die dafür vorgesehene Standard-Behandlung empfohlen, bestehend aus ACE-Inhibitoren, Angiotensin II Rezeptor Blockern, beta-Blockern und Diuretika (2).

Interventionell kann eine Katheter Ablation durchgeführt werden, um die ventrikulären Tachykardien zu reduzieren und eine symptomatische Verbesserung der Lebensbelastung zu erreichen. Die Implantation eines ICD (Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator) ist die Haupttherapiemöglichkeit, um dem plötzlichen Herztod durch Arrhythmien vorzubeugen. Die Empfehlung zu diesem wird nach der Risiko-Nutzen-Abwägung an den Patienten angepasst. (2,16) Es gibt durchaus ein

nicht zu vernachlässigendes Komplikationsrisiko bei Implantation eines ICD durch unangemessene Schockabgaben und Versagen der Elektroden (16).

Als ultima ratio kann bei Herzversagen eine Herztransplantation durchgeführt werden. (2)

### 1.1.7. Prognose

Die Mortalität beträgt zwischen 0,08% bis 3,6% pro Jahr, wobei sich verschiedene Angaben in Studien finden lassen (1,15). Dabei ist die Prognose der Betroffenen stark abhängig von der Schwere der Arrhythmien und der ventrikulären Dysfunktion, da diese zum plötzlichen Herztod führen können (1).

Das prognostische Risiko wird anhand der klinischen Präsentation und der Risikofaktoren des Patienten eingeschätzt. Zu den Risikofaktoren zählen vorhergehender Herzstillstand, Synkope, junges Alter, männliches Geschlecht, ungünstige familiäre Belastung, ventrikuläre Tachykardie, Mitbetreffen des linken Ventrikels und viele mehr. Wegen der Vielschichtigkeit und der vielen Einflussfaktoren, die diese Erkrankung aufweist und der ungenügenden Datenlage, erweist sich eine genaue Risikostratifizierung jedoch als schwierig. (1,6) In Abbildung 5 wird diese versucht schematisch darzustellen.



**Abbildung 5:** Schema zur prognostischen Stratifizierung von Patienten mit ARVC nach ihrem klinischen Erscheinungsbild.

Das Schema ist von Corrado et al. 2017 (1) vorgeschlagen. Das Mortalitätsrisiko wird hier in drei Kategorien eingeteilt und berechnet die Wahrscheinlichkeit eines schweren Arrhythmie Ereignisses. (PVB = premature ventricular beats)

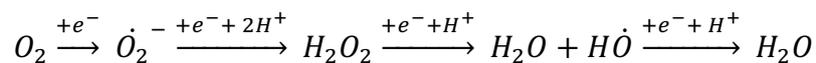
Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

## 1.2. reaktive Sauerstoffspezies

### 1.2.1. Definition und Entstehung

Als reaktive Sauerstoffspezies, auch ROS genannt, werden verschiedene reaktive Moleküle bezeichnet, welche Radikale mit ungepaarten Elektronenpaaren enthalten und von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) abgeleitet sind (18). Dazu gehören beispielsweise das Superoxid-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\cdot}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Sauerstoffradikale können sich leicht ineinander umwandeln und weiterreagieren. (19,20)

Die Weitergabe von Elektronen kommt klassischerweise bei Sauerstoff abhängiger Oxidation von Reduktionsäquivalenten in der Zelle vor. Die Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ) haben jeweils zwei ungepaarte Elektronen in der äußeren Atomhülle und werden in der Zelle zu Wasser reduziert, indem sie vier Elektronen aufnehmen. Auf dem Weg dahin, kann  $O_2$  zu Zwischenstufen reduziert werden, die dann reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt werden (siehe Formel 1). (18)



**Formel 1:** Reduktion von Sauerstoff zu Wasser über Zwischenstufen (21)

ROS können in Zellen über verschiedenen Mechanismen entstehen, von denen in den Kardiomyozyten die wichtigsten die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, die NADPH-Oxidasen (Nox) und die Stickstoffmonoxide Synthasen (Nos) sind, welche im Folgenden noch genauer beschrieben werden. (22,23)

Wie viel ROS in den Zellen vorhanden ist, hängt von verschiedenen zellulären Einflussfaktoren ab. Beispielsweise können sie bei Erkrankungen ansteigen. Auch die Stimulation von bestimmten Enzymen führt zur Veränderung des ROS-Haushalts. Die Auswirkungen auf die Zelle hängen vom Produktionsort der ROS und von der Menge der vorliegenden Antioxidantien ab. (22)

Unter physiologischen Bedingungen werden reaktive Sauerstoffspezies in Zellen streng reguliert und ausbalanciert, da sie großen Einfluss auf Signalwege im Herz haben und somit für den optimalen Ablauf zellulärer Funktionen gebraucht werden. Dies geschieht durch enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien. (18)

Ist das sensible Gleichgewicht zwischen der Produktion von Sauerstoffradikalen und Antioxidantien gestört, kommt es zu oxidativem Stress (22). Dieser führt, wie in Kapitel 1.2.4 genauer beschrieben, zu Störungen in zellulären Signalkaskaden und zu zellulären Veränderungen und steht damit in Verbindung zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (23–25).

### 1.2.2. wichtige ROS Produzenten

Es gibt viele verschiedene Wege, auf denen Sauerstoffradikale entstehen können. Unter ihnen sind die Xanthinoxidoreductase (XO), Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), Peroxisomem, Monoaminoxidasen, die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette, NADPH-Oxidasen und viele andere. (26)

Im Folgenden wird auf die Atmungskette und die NADPH-Oxidasen eingegangen.

#### Atmungskette:

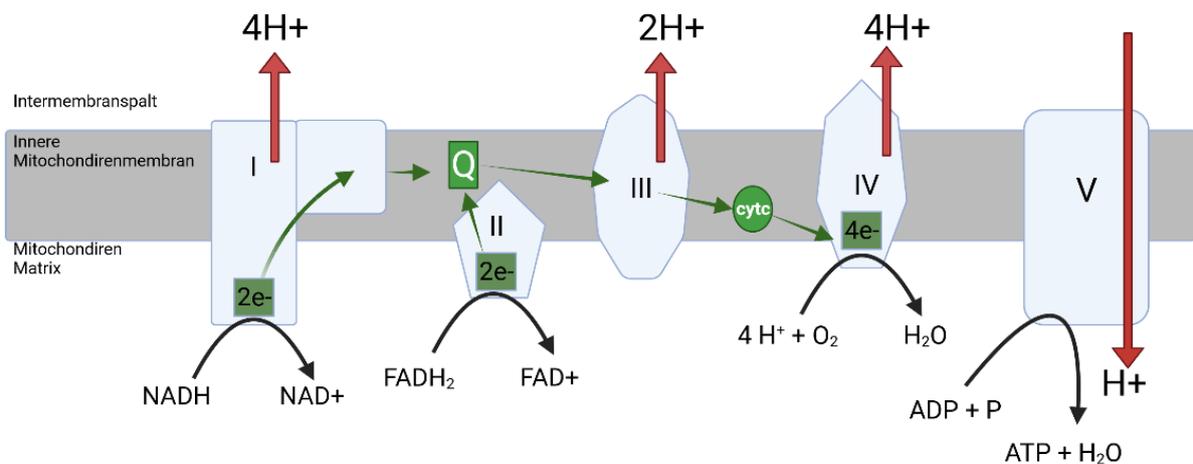
Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen (siehe Tabelle 4) und liegt in den Mitochondrien und dort in ihrer inneren Membran. Sie ist für die ATP-Herstellung mittels oxidativer Phosphorylierung zuständig, indem sie die Reduktionsäquivalenten NADH und FADH<sub>2</sub> aus dem Citratzyklus oxidiert. Dabei geben diese beiden Reduktionsäquivalenten ihre Elektronen an die Komplexen I oder II ab. Diese werden in einzelnen Schritten mit Hilfe von den zwei sogenannten mobilen Überträgern Ubichinon und Cytochrom c über den Komplex III zum Komplex IV transportiert, an dem sie Sauerstoff zu H<sub>2</sub>O reduzieren. (27)

Parallel dazu werden die H<sup>+</sup>-Ionen von den Komplexen in ihrer Funktion als Protonenpumpe von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranspalt gepumpt. Dadurch entsteht ein elektrochemischer Gradient. (28) Im Komplex V wird dieser Gradient ausgeglichen, indem H<sup>+</sup> Ionen zurückströmen in die Matrix und dadurch ATP generieren. (27)

Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Verlauf der Protonen und Elektronen.

Die Bildung von Sauerstoffradikalen lässt sich beispielsweise auf ein „Elektronen-Leck“ in der Atmungskette zurückführen, bei dem einzelne Elektronen an O<sub>2</sub> abgegeben werden, wodurch sich O<sub>2</sub><sup>-</sup> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet (28,29).

Auch ein gestörter Elektronentransport im zweiten Komplex (Succinat-Dehydrogenase/SDH) kann für die Bildung von ROS verantwortlich sein (29). Die SDH ein Teil des NADH-bildenden Citratzyklus und ist für die Oxidation von Succinat zu Fumarat und im zweiten Schritt von  $\text{FADH}_2$  zu  $\text{FAD}$  zuständig. Somit hat sie direkte Auswirkung auf den NADH-Gehalt in den Mitochondrienmatrix und damit wiederum auf die Atmungskette. (20)



**Abbildung 6:** Vereinfachte Darstellung des Verlaufs der Protonen und Elektronen in der menschlichen Atmungskette.

Q: Ubiquinon, cytc: Cytochrom c, I: NADH-Dehydrogenase, II: Succinat-Dehydrogenase, III: Cytochrom C Reduktase, IV: Cytochrom C Oxidase, V: ATP-Synthase. Abgewandelt aus Müller-Esterl, Werner - Oxidative Phosphorylierung S.591 (30)

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

**Tabelle 4:** Oxidative Phosphorylierung. Abgewandelt aus Müller-Esterl (2004) (30)

Namen der Komplexe	Funktion
NADH-Dehydrogenase (Komplex I)	NADH-Oxidation; Ubichinon-Reduktion; vektorieller Transport von Protonen
Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)	Succinat-Dehydrierung; Ubichinon-Reduktion; Enzym des Citratzyklus; <i>kein</i> Protonentransport
Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)	Ubihydrochinon-Oxidation; Cytochrom-c-Reduktion; vektorieller Transport von Protonen
Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)	Cytochrom-c-Oxidation; O <sub>2</sub> -Reduktion; vektorieller Transport von Protonen
ATP-Synthase (Komplex V)	Rückfluss von Protonen; ATP-Synthese

### NADPH-Oxidasen

Die NADPH-Oxidase (NOX) liegt in sieben verschiedenen Isoformen vor. Die häufigste ist die NOX2, welche in der Zellmembran und im Zellinneren vorkommt. Während die NOX4 in nur wenigen Geweben auftritt, unter anderem in den Kardiomyozyten, ist sie die einzige in den Mitochondrien lokalisierte Isoform.(20)

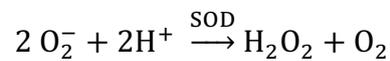
Ihre Hauptaufgabe ist es den Transfer der Elektronen von NADPH auf O<sub>2</sub> zu katalysieren und O<sub>2</sub><sup>-</sup> (v.a. NOX2) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v.a. NOX4) zu generieren (31–33). Im Gegensatz zu anderen Quellen, bei denen ROS als sekundäre Metaboliten hergestellt werden, produzieren sie diese unter strenger Kontrolle (28).

Die Kommunikation zwischen den mitochondrialen ROS und den NADPH-Oxidasen spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der physiologischen Redox-Signalweiterleitung. Damit wirken NOX, abhängig von ihrer Isoform, bei verschiedenen biologischen und auch pathologischen Prozessen mit. So sind sie beispielsweise beteiligt an Zell-Proliferation, -Transformation, -Überleben und -Differenzierung.(33)

Es konnte gezeigt werden, dass auch bei kardialen Erkrankungen die NADPH-Oxidase involviert sind und einen Beitrag zu pathophysiologischen Prozessen, wie Herzversagen oder Hypertrophie, leisten können. (23,31,33)

### 1.2.3. zelluläre Verteidigungsmechanismen gegen Sauerstoffradikale Superoxid-Dismutase (SOD)

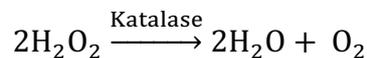
In menschlichen Zellen sind drei Isoformen der Superoxid-Dismutase (SOD) bekannt mit unterschiedlichen zellulären Lokalisationen. Die SOD1 ist im Intermembranspalt der Mitochondrien, die SOD2 ist in der mitochondrialen Matrix und die SOD3 im extrazellulären Raum lokalisiert. (28) Mit ihrer Hilfe reagiert Superoxid ( $O_2^-$ ) zu  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid) und Sauerstoff ( $O_2$ ) (siehe Formel 2) (26,28).



**Formel 2:** Reaktion des Superoxids zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff durch die Superoxid-Dismutase

### Katalase

Katalase katalysiert die Reaktion von  $H_2O_2$  zu Sauerstoff und Wasser (siehe Formel 3) (28).



**Formel 3:** Reaktion des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff durch die Katalase

### Glutathion Peroxidase

Glutathion ist ein Tripeptid, das mit seiner Peroxidase die Reduktion von  $H_2O_2$  zu Wasser katalysiert (26,28). In seinem reduzierten Zustand kann es selbst gut Elektronen von  $H_2O_2$  aufnehmen. Seine oxidierte Form (Glutathion Disulfid) muss mit Hilfe von NADPH/NADH wieder reduziert werden. Somit ist eine effiziente bioenergetische Funktion der Mitochondrien Voraussetzung für die antioxidative Wirkung dieses Systems. (26)

## Nicht-enzymatische Substanzen

Es gibt auch nicht enzymatische Substanzen, die als Antioxidanzien fungieren. Zu ihnen gehören Vitamin C, Bilirubin, Polyphenole und andere. (28)

### 1.2.4. Wirkungen von ROS auf Kardiomyozyten

Sauerstoffradikale unterliegen bei physiologischen Bedingungen einem Gleichgewicht. Wenn dieses nicht gegeben ist und vermehrt Sauerstoffradikale produziert werden, wird das „oxidativer Stress“ genannt. (20) Dabei spielen sowohl zu viel als auch zu wenig Sauerstoffradikale in pathologischen Prozessen des Herzens eine Rolle. (20,28)

#### a. physiologische Rolle von Sauerstoffradikalen

Physiologischer Weise spielen ROS eine Rolle als „second messenger“, um adaptive Prozesse zu triggern (20,34). Sie sind dafür zuständig überlebensfördernde, also für die Erneuerung einer biologischen Komponente zwingend erforderliche, Signale zu senden. Ein physiologisch signifikanter Anstieg an Sauerstoffradikalen ist daran beteiligt unerwünschte mitotische Zellen und Mitochondrien zu eliminieren und somit ihre Verbreitung zu verhindern. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle und der Instandhaltung der Zellfunktion.(20)

Ebenso in der Rolle als second messenger sind ROS bei der Differenzierung und Proliferation der Kardiomyozyten mitbeteiligt (35). Außerdem ist bei der Zellkommunikation und der Generation von einer physiologischen inflammatorischen zellulären Antwort das Weiterleiten von ROS Signalen essentiell (36). Durch die Radikale selbst werden Signale zur Bildung von Antioxidanzien gebildet, die wiederum vor ROS schützen und diese neutralisieren (28).

Im physiologischen Sinn haben sie ebenso die Aufgabe Abwehrmechanismen gegen Infektionserreger zu aktivieren. (37)

Speziell in den Kardiomyozyten spielen sie eine Rolle in der Erregungs-Kontraktion-Kopplung (ECC). Die Vorgänge, die bei der ECC ablaufen, lassen sich vor allem auf den Einfluss der Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  und damit auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen-Kanäle und -transporter zurückführen. Viele Teile der Maschinerie des ECC sind Redox-sensibel, lassen sich

also durch ROS beeinflussen. Besonders erwähnenswert hierbei ist der Ryanodin-Rezeptor, welcher Redox-sensitiv ist. (35)

b. oxidativer Stress

Oxidativer Stress kann die im Folgenden beschriebenen negativen Auswirkungen auf Kardiomyozyten und das Herz haben. Er kann die Dysfunktion und den Tod der Kardiomyozyten durch Apoptose triggern, ebenso zu kontraktile Dysfunktion führen und für das falsche Remodelling des Herzens, Fibrose, Hypertrophie und Herzversagen und Vorhofflimmern verantwortlich sein. (35)

Schaden an der mitochondrialen DNA (mtDNA) und Behinderung der mitochondrialen Biogenese

Mit steigenden Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien kommt es zu mitochondrialem Schaden und Dysfunktion: ROS sammelt sich verglichen zum Rest der Zelle vermehrt in den Mitochondrien, da sich die in der Atmungskette produzierten ROS hier ansammeln. (38) Die mtDNA wird durch ihre, im Vergleich zur nukleären DNA, schwächer ausgeprägten Reparaturmechanismen leichter beschädigt, zerstört und somit abgebaut (35,38). Infolgedessen kommt es ebenso zu einem Rückgang von mitochondrialer RNA (mtRNA) (38,39). Der daraus resultierende Verlust der an mtDNA-kodierenden Proteinen führt zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Biogenese (38,40).

Durch den hiermit verursachten Schaden an den Mitochondrien wird noch mehr ROS produziert, der wiederum mehr mitochondrialen Schaden anrichtet. Dies wird „ROS-induzierte ROS-Freisetzung“ genannt. (40)

ROS kann also direkt die DNA, die molekulare Struktur und Funktion von intrazellulären Molekülen beeinflussen. (23)

Oxidative Modifikation an Proteinen und Lipiden

Sauerstoffradikale sind sehr reaktive und instabile zelluläre Moleküle, welche leicht weiterreagieren und in stabilere Moleküle umgewandelt zu werden (28). Die Oxidation von Proteinen und damit auch Enzymen durch ROS kann deren Aktivität beeinflussen

und senken. Somit kommt es zu einer Beeinträchtigung der Stoffwechsellkapazität der Zelle. (40)

Außerdem kann ROS intrazelluläre Lipide beeinträchtigen, diese peroxidieren und dadurch die Stabilität der Zellmembran und Zellorganellen gefährden (23,35).

#### Molekularer Mediator von verschiedenen Signalwegen

Sauerstoffradikale sind in die zellulären Signalwege eingebunden. Wenn Signalwege von ROS beeinflusst werden, wird dies „Redox-Signal“ genannt (23). Sie können eine molekulare Brücke bilden, bei der die extrazellulären Signale nach intrazellulär in Form von ROS weitergeben werden.

Ebenso haben sie Einfluss auf die Modulation von Transkriptionsfaktoren und damit wiederum auf Signalwege. (23,40)

Dies kann unter Anderem zur Hypertrophie des Herzes und zum Herzversagen führen. (35)

#### Inflammation

Die schon beschriebene ROS-induzierte Schädigung der mtDNA kann über Veränderung in verschiedenen Signalwegen zu Inflammation der Myozyten führen. Dies geschieht, indem Sauerstoffradikale beispielweise die Produktion von proinflammatorischen Enzymen (Zytokinen) triggern. (23,40)

#### Einfluss auf Ionenkanäle und -transporter

Es werden beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von Sauerstoffradikalen beeinflusst. Bekanntlich modifizieren sie sowohl die SERCA, als auch Ryanodin-Rezeptoren. Da der intrazelluläre Calcium-Spiegel wichtig ist für die kardiale Reizweiterleitung, kann man davon ausgehen, dass ROS so die Kontraktilität des Herzens direkt beeinflussen kann. (23)

#### zelluläre Apoptose

Die Apoptose von Kardiomyozyten spielt über verschiedene Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Über

verschiedene Redox-sensitive Enzyme, wie beispielsweise ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), die die Apoptose von Zellen fördern, beeinflusst ROS den Zelltod. (23,28,35)

Vermehrte Sauerstoffradikale in den Mitochondrien steigern die Permeabilität der Mitochondrien. Das Anschwellen der Mitochondrien führt zum Riss der äußeren Membran. Damit können Moleküle, welche die Apoptose einleiten, aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien in die Zelle gelangen (z.B. Cytochrom c). (41)

### Vorhofflimmern

Oxidativer Stress ist u.a. für das Remodelling des Vorhofs verantwortlich (35). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Vorhofflimmern die oxidative Modifikation von myofibrillären Proteinen in Vorhofmyozyten erhöht ist. Diese oxidativ bedingte Veränderung hat zur Folge, dass es zu einem Funktionsverlust der fibrillären Proteine kommt, welcher das Vorhofflimmern bedingt. (42)

#### 1.2.5. Die Rolle von Mitochondrien

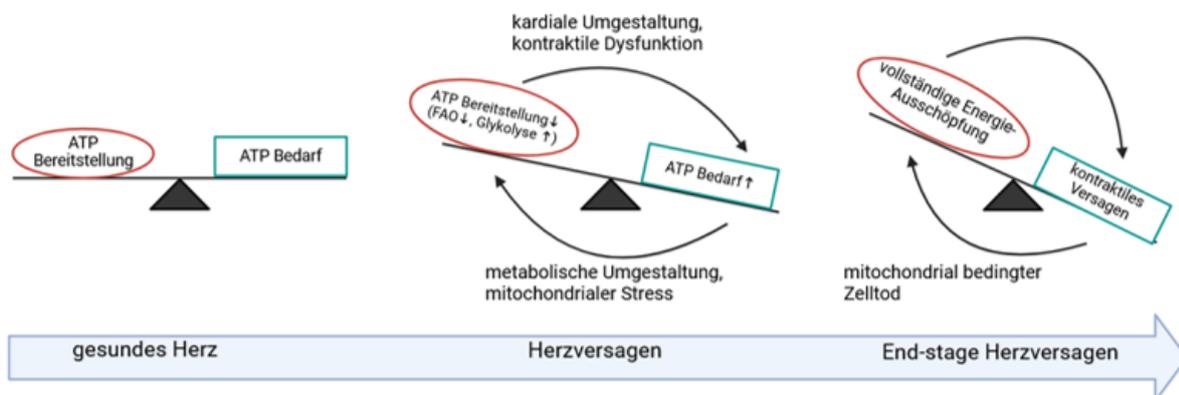
Das menschliche Herz verbraucht 10% der Energie des gesamten Körpers. Da eine kontinuierliche Energiebereitstellung gewährleistet sein muss, kann das Herz Glucose, Fettsäuren, und Laktat verstoffwechseln und bei schlechter Stoffwechsellage auf Aminosäuren, Ketonkörper und Pyruvat zurückgreifen. (43)

Dabei wird der Großteil (95%) der im Herz produzierten Energie in den Mitochondrien durch oxidative, also sauerstoffabhängige, Phosphorylierung hergestellt (22,24). Die Energie wird dabei vor allem durch Lipolyse beschafft und nur zu 5% durch Glykolyse, daher ist ein Hochregulieren des Stoffwechsels für mehr Energie hin zur Glykolyse kein effektives Mittel, um den Energiebedarf des Herzens zu decken (40).

Unter normalen Bedingungen kann das Herz je nach Energiebedarf seinen Metabolismus erheblich erhöhen und beispielsweise während sportlicher Belastung auf verschiedene Nährstoffe umstellen. Meistens kommt es mit seiner in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung bereitgestellten Energie in Form von ATP aus. Wenn das Gleichgewicht zwischen Energiebedarf und -bereitstellung unausgeglichen ist, beispielsweise bei Herzversagen, führt dies zu einer Veränderung

im Energiehaushalt. Das Level an ATP-Bedarf steigt an, während die ATP-Bereitstellung sinkt. Das Herz versucht die Energie durch eine gesteigerte Glykolyse bereitzustellen. Diese produziert relativ weniger ATP und reguliert die Oxidation der Fette (Lipolyse) herunter, welche mehr ATP produzieren würde. Das führt wiederum zu einem noch weniger ausgeglichenem Energiehaushalt, damit zu Stress und zu gesteigerter pathologischer Veränderung des Herzens. Damit ist eine Abwärtsspirale erreicht (siehe Abbildung 7), dessen Ursprung nicht mehr genau benannt werden kann: ist der Ursprung das Herzversagen oder das Energiedefizit durch mitochondrialen Stress, der beispielsweise durch ROS entsteht. (40,44)

Da der Energieverbrauch des Myokards so groß ist, ist auch die große Menge der Mitochondrien in Myokardzellen zu erklären, welche ungefähr 30% des Zellvolumens einnimmt (27). Somit spielen die Mitochondrien eine grundlegend wichtige Rolle für die Funktion und das Überleben von Kardiomyozyten (24).



**Abbildung 7:** Ungleichverteilung von Energiebedarf und -bereitstellung führt zu Herzversagen:

In einem gesunden Herzen entspricht die Energieproduktion dem Energiebedarf. Ein pathologischer Umbau des Herzens führt zu Ineffizienzen, die den Energiebedarf erhöhen, aber gleichzeitig die Kapazität für die Energieversorgung verringern. Die anschließende metabolische Umgestaltung ist der Versuch, die Energiehomöostase wiederherzustellen. Sie hält das ATP-Niveau im Herzen vorübergehend aufrecht, führt aber wahrscheinlich über maladaptive Kreisläufe, die mitochondrialen Stress erzeugen, zum Herzversagen. FAO = Fettsäureoxidation. Abgeändert aus Zhou et al. 2018 (1)

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

### 1.3. Kardial vorliegende Glucose

Bei kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie oder anderen pathologischen Stresssituationen, kann es zu einer Verschiebung des Herzmetabolismus von der bevorzugten Fettsäure Verstoffwechslung hin zum Glucose Metabolismus kommen (45–47). Eine veränderte Expression von Glucose Transportern und ein veränderter Glucose Haushalt können die ROS Produktion beeinflussen. Eine Hyperglykämie führt zu einer mitochondrialen Überproduktion von Superoxid in der Atmungskette, was wiederum andere Wege der Superoxidproduktion aktivieren kann. (36) Das hat zur Folge, dass das Redox-Gleichgewicht im hypertrophierten Herz gestört ist (47,48). Diese können dann den Schadensursprung der Glykämie amplifizieren. (36)

Das Muster der Expression von Glucose Transportern in verschiedenen Geweben hängt mit den spezifischen Stoffwechselanforderungen zusammen (47). Die für das Herz am relevantesten sind die GLUT-Familie und die Natrium-Glucose-Co-Transporter (SGLT) (46).

#### 1.3.1. Glucose Transporter der GLUT-Familie

GLUT-Transporter liegen in 14 Isoformen vor. Sie können ihre Substrate bidirektional transportieren und haben je nach Isoform verschiedene funktionale Charakteristiken. Die Proteine der GLUT-Familie und unter ihnen GLUT1 und GLUT4 sind die Hauptakteure des Glucose Transports im menschlichen Herz. GLUT1 ist vor allem in der Plasmamembran lokalisiert. GLUT4 liegt in intrazellulären Vesikeln vor und wird bei Insulin Stimulation in die Plasmamembran translokalisiert. Es ist ein zu Glucose hochaffines Protein durch das, bei seiner Translokalisierung in die Membran, die Glucose Aufnahme in die Zelle in kürzester Zeit um ein Vielfaches gesteigert werden kann. (47) Somit wird die Insulin-abhängige Aufnahme von Glucose in die Myokardzelle hauptsächlich von GLUT4 übernommen (36,46).

#### 1.3.2. Glucose Transporter der SGLT-Familie

Die Natrium-Glucose-Co-Transporter 1 und 2 liegen in verschiedenen Geweben vor. Die Glucose Aufnahme durch sie in der Niere und im Darm sind prominent. Das Vorhandensein des SGLT1 in menschlichen Herzzellen ist bekannt, jedoch ist seine genaue Funktion noch nicht ausreichend untersucht. (46)

Die Inhibition von SGLT2 wurde in klinischen Studien als kardioprotektiv durch verschiedene Mechanismen beschrieben (49). Unter anderem dadurch, dass es die Aktivität von SGLT1 senkt wodurch der Serumglukosegehalt und in der Folge der oxidativen Stress sinkt (35,50). Eine alternative Erklärung könnte darin bestehen, dass die Hemmung von SGLT2 direkt gegen die kardiale intrazelluläre Natriumüberladung wirken kann, die bei diabetischen und versagenden Herzmuskelzellen beobachtet wird. Dies könnte potenziell zu einer Verbesserung der mitochondrialen Energetik führen und oxidative Belastung verhindern. (51)

Das legt die Vermutung nahe, dass die SGLT-Familie ebenso einen Beitrag zur Entwicklung von Herzerkrankungen leisten kann.

#### 1.4. Ziel des Projekts

In dieser Doktorarbeit soll die mitochondriale Produktion von Sauerstoffradikalen (mtROS) und dessen möglicher Ursprung bei der ARVC untersucht werden. Die Experimente werden hierbei an humanen induzierten pluripotenten Stammzellen, welche zu Kardiomyozyten differenziert wurden (hiPSC-CM), einer symptomatischen ARVC Patientin durchgeführt. Diese Patientin ist Trägerin einer PKP2 Mutation, die mit der ARVC korreliert. Vergleichend zu dieser Indexpatientin werden hiPSC-CM einer unabhängigen Kontrollpatientin ohne Mutation auf dem PKP2 Gen untersucht, ebenso wie Zellen der Indexpatientin, welche eine Mutationskorrektur mittels CRISPR/Cas erhalten haben. Damit können potenzielle Unterschiede zwischen den Zelllinien herausgearbeitet werden. Dies könnte wertvolle Daten darüber liefern, ob ARVC-typische Symptome von mtROS ableitbar und somit regulierbar sind.

Es sollen mögliche mtROS Quellen identifiziert werden und die Beteiligung des Glucosestoffwechsels untersucht werden.

Daher sind die zentralen Fragen:

1. Ist die mitochondriale ROS Produktion in den Zellen der ARVC Patientin verändert?
2. Stehen die bekannten mitochondrialen ROS Quellen NOX2/4, Atmungskettenkomplexe oder das Antioxidans SOD2 mit der veränderten Produktion von Sauerstoffradikalen in Verbindung?
3. Spielen Veränderungen im Glucose Metabolismus eine Rolle bei der mtROS Produktion in den Zellen der ARVC-Patientin?

Die Beantwortung dieser Fragen könnte Licht auf bis dato unerforschte zelluläre Ursachen bei der Arrhythmogenese der ARVC werfen und somit neue therapeutische Wege eröffnen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Fluoreszenzmessung am Tecan

#### 2.1.1. Funktionsprinzip

Das Microplate Fluoreszenzmessgerät (Tecan InfiniteM200Pro) kann die Fluoreszenz, der bei 488nm angeregten Fluoreszenzfarbstoffen MitoSox™ Red über zwei Stunden alle 5 Minuten messen. Mit Hilfe der Software Tecan i-control™ werden die Daten aufgezeichnet und können im Folgenden ausgewertet werden.

#### 2.1.2. MitoSox™ Red

Es wird der Fluoreszenzfarbstoff MitoSox™ Red mitochondrial superoxid indicator for live cell imaging von Thermo Fischer verwendet (siehe Tabelle 8). Dieser wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, sodass er eine Konzentration von 5mM aufweist. Er sammelt sich in den Mitochondrien von lebenden Zellen schnell an und ist zur Bestimmung von Sauerstoffradikalen geeignet. Er wird selektiv von Superoxid oxidiert, markiert also nicht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RNS oder andere ROS. (52)

#### 2.1.3. Antimycin A

Antimycin A (siehe Tabelle 8) entkoppelt die Atmungskette im III. Komplex. Es dient als Positivkontrolle. Es wird in DMSO gelöst und zusammen mit den induzierten Kardiomyozyten (iCM) mit einer Konzentration von 7µM für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

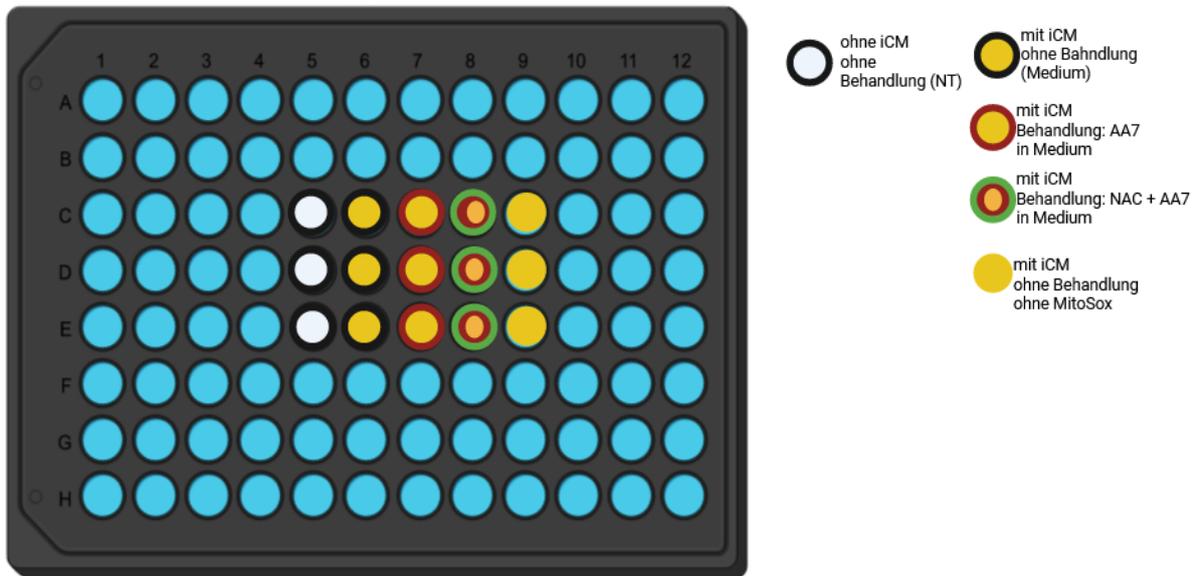
#### 2.1.4. N-Acetyl-Cystein

N-Acetyl-Cystein (NAC) ist ein ROS Inhibitor (siehe Tabelle 8). Es wird in Zellkulturmedium gelöst und auf den iCM für 2h bei 37°C inkubiert. Bei der gemeinsamen Inkubation der Zellen mit NAC (3mM) und Antimycin A (7 µM) wird die Bildung der ROS beobachtet.

#### 2.1.5. Messprotokoll

Es wird mit dem mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX™ Red die ROS Produktion im Microplate Fluoreszenzmessgerät (Tecan InfiniteM200Pro) gemessen. Dazu werden auf einer 96 well Platte (Greiner 96, Flat Black) die hiPSC-CM auf

Gelatine ausplattiert (40000 iCM pro well). Jeweils drei Kammern werden mit derselben Behandlung versehen (siehe Abbildung 8). Als Positivkontrolle wird Antimycin A (7  $\mu$ M) verwendet mit einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei 37°C. Der ROS Inhibitor NAC (3mM) wird für 2 Stunden bei 37°C zu den iCM gegeben und inkubiert, wobei in den letzten 30 Minuten Antimycin A (7 $\mu$ M) hinzugegeben wird. Die Zellen ohne Behandlung werden in dieser Inkubationszeit mit DS-CMM+2,5% FBS Medium (siehe Tabelle 5) behandelt, damit sie möglichst wenig Stress ausgesetzt sind. Im Folgenden werden alle Kammern mit MitoSOX<sup>TM</sup> Red für eine weitere halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschrinen mit 1xNormaltyrode (2mM CaCl; siehe Tabelle 7) werden sie mit dieser beladen. Die Kammern werden für 2h alle 5 Minuten mit einer Wellenlänge von 488nm und einer Anzahl von 25 Anregungsblitzen bei geschlossenem Deckel im Tecan gemessen. Dasselbe gilt auch für die Kammern, welche der Hintergrundmessung dienen und nur mit Gelatine aber ohne Zellen gemessen werden.



**Abbildung 8:** Aufteilung der Platte

Die einzelnen Kammern der 96 well Platte wird mit Gelatine beschichtet und auf einen Teil werden die induzierten Kardiomyozyten (iCM) befestigt. Ein Teil ohne iCM dient als Hintergrund für die Berechnung der Fluoreszenz. Es werden von beiden Teilen jeweils Zellen mit Antimycin A ( $7\mu\text{M}$ ) (AA7), Zellen mit N-Acetyl-Cystein (NAC) und Antimycin A ( $7\mu\text{M}$ ) und Zellen ohne Behandlung (nur mit DS-CMM-Medium oder Normaltyrode) mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSox<sup>TM</sup> Red inkubiert. Außerdem werden auch iCM ohne Behandlung und MitoSox<sup>TM</sup> Red gemessen.

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

### 2.1.6. Material

#### a. Zellkulturmedium

Im Zellkulturmedium werden NAC, Antimycin A und die Fluoreszenzfarbstoffe gelöst und die Zellen damit inkubiert. Dadurch werden die iCM bei Behandlung mit diesen Reagenzien möglichst schonend behandelt.

**Tabelle 5:** Zellkulturmedium, gelöst in DMEM ohne Glucose

<b>Substanz</b>	<b>Benötigte Konzentration</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
DMEM ohne Glucose		11966025	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin	25µg/mL	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
D-(+)-Galactose	10mM	G0750-100G	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
100 mM Na-Pyruvat	1mM	S8636-100ml	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
HyClone®dialyzed FBS	2,5%	SH30071.03	GE Healthcare Life Sciences/Fisher Scientific

b. Normaltyrode

Als allgemeine Nährlösung für die Messungen am Tecan und am Konfokalmikroskop wird die Normaltyrode (NT) hergestellt. Sie wird zuerst als 10-fach Stock angefertigt, wobei die Bestandteile in deionisiertem, doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst werden, sodass die Gesamtmenge 500 ml beträgt (siehe Tabelle 6). Sie kann über mehrere Wochen gelagert werden.

Die einfache Normaltyrode wird vor jeder Messung frisch hergestellt und beinhaltet zusätzlich die in Tabelle 7 angegebenen Bestandteile. Ihre Calciumkonzentration beträgt 2mM und der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt.

**Tabelle 6:** 10-fach Normatyrode, geöst in ddH<sub>2</sub>O

<b>Substanz</b>	<b>Molarität</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Menge pro 500mL</b>
KCL	4mM	6781.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	1,496 g
NaCl	140mM	27810.295	VWR Chemicals, Darmstadt, Germany	40,908 g
MgCl <sub>2</sub>	1mM	KK36.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	0,476 g
HEPES	5mM	9105.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	5,958 g

**Tabelle 7:** 1-fach Normaltyrode, gelöst in ddH<sub>2</sub>O

<b>Substanz</b>	<b>Molarität</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Menge pro 500mL</b>
10-fach Normaltyrode (siehe Tabelle 6)				50mL
CaCl <sub>2</sub>	1mM	21115	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA	1000µL
Glucose	10mM	X997.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	0,901 g

## c. Reagenzien für Tecan Messung

Tabelle 8: Reagenzien für Tecan Messung

Substanz	Benötigte Konzentration	Bestellnummer	Firma
Antimycin A	7µM	A8674-25MG	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
NAC	3mM	A7250	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
MitoSox™ Red in DMSO gelöst (5mM)	5µM	M36008	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

## 2.1.7. Datenauswertung:

Die Software Tecan i-control öffnet nach dem Ende der Messung die Ergebnisse in einer Excel Tabelle. In dieser sind die einzelnen Wells (je ein Well entspricht einer Zeile) nach der Zeit (alle 5 Minuten eine Messung in einer Spalte) aufgetragen. Ebenso wird jedes Mal die Temperatur gemessen, wodurch man den Temperaturverlauf über die Zeit nachverfolgen kann. Für die Auswertung werden nur Daten der letzten Messung nach 2 Stunden genutzt. Es werden immer zwei Werte berechnet:

1. = absolute Werte der Fluoreszenz
2. = relative Werte der Fluoreszenz. Sie berechnen sich relativ zu den Werten bei den unbehandelten Zellen.

Die Berechnung der Werte erfolgt in Microsoft Excel (Version 2202) folgendermaßen:

(Abkürzungen: w/o iCM NT = ohne Zellen, Hintergrund mit Normaltyrode)

- Die Werte ( $X_1, Y_1$ ) der Zellen, welche unbehandelt sind (iCM ohne Behandlung mit DS-CMM, Fluoreszenz gemessen in NT):
  1. iCM (unbehandelt) – Hintergrund mit NT =  $X_1$
  2.  $Y_1 = \frac{X_1}{X_1} = 1$

- Die Werte  $(X_2, Y_2)$  der Zellen, welche mit Antimycin A (7 $\mu$ M) (AA7) behandelt wurden (iCM mit Behandlung AA7 in DS-CMM, Fluoreszenz gemessen in NT):
  1. iCM (AA7) – Hintergrund mit NT =  $X_2$
  2.  $Y_2 = \frac{X_2}{X_1}$
- Die Werte  $(X_3, Y_3)$  der Zellen, welche mit N-Acetyl-Cystein und Antimycin A (7 $\mu$ M) behandelt wurden (iCM mit Behandlung AA7 und NAC, Fluoreszenz gemessen in NT):
  1. iCM (NAC + AA7) – Hintergrund NAC =  $X_3$
  2.  $Y_3 = \frac{X_3}{X_1}$

Die folgende graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgt mit GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Zur Prüfung der statistischen Signifikanz, welche dem p-Wert entspricht, wird der ungepaarte t-Test verwendet. Bei der Untersuchung der Signifikanz zwischen mehr als zwei Gruppen wird die einfaktorielle ANOVA und daraufhin der Turkey Test durchgeführt. Ein Wert von  $p < 0,05$  wird als statistisch signifikant angenommen.

## 2.2. Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskopisch erfolgt die Bestimmung der zellulären ROS Produktion. Dabei wird mittels des mitochondrialen Farbstoffs MitoSOX<sup>TM</sup> Red in Kombination mit dem mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker<sup>TM</sup> Green die mitochondriale Lokalisation der ROS geprüft und bestätigt. Durch die hohe räumliche Auflösung des Konfokalmikroskops werden mehr Details sichtbar, was einen Vorteil dem Fluoreszenzmikroskop gegenüber darstellt.

### 2.2.1. Funktionsprinzip

Das hier verwendete Konfokalmikroskop ist das Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM700 mit der Imaging-Software ZEN black. Es entspricht einem speziellen Lichtmikroskop, das durch seine Funktionsweise eine besondere Tiefenschärfe aufweist. Die präzise Fokussierung und Detektion einer definierten Fokusebene der darzustellenden Zelle ist ein wichtiger Vorteil der Konfokalmikroskopie. Durch nur

selektive Visualisierung des Objekts in einer Fokusebene wird das Hintergrundrauschen minimiert und die Bildauflösung maximiert. Dabei läuft die Generation des Bildes in drei Schritten ab: Das line-by-line scanning des Objekts mit einem fokussierten Laserstrahl, die pixel-by-pixel Detektion der vom gescannten Objekt emittierten Fluoreszenz und die Digitalisierung der gescannten Information.

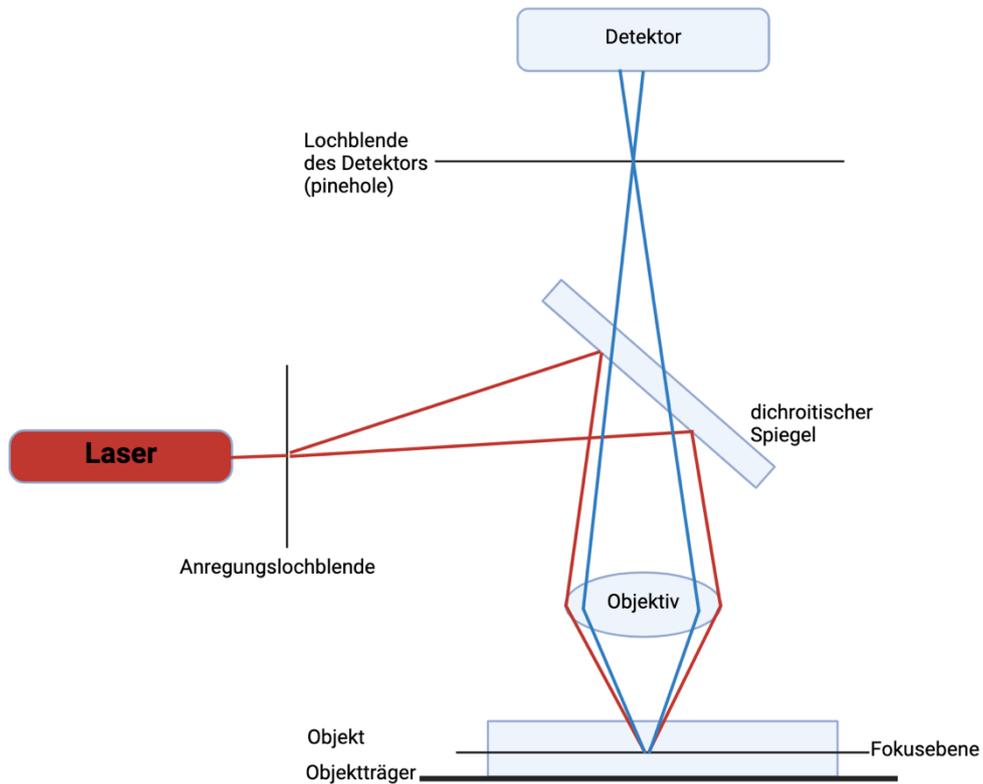
Es wird ein Argonlaser der Wellenlänge 488nm als Anregungslicht für die Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Dessen Licht wird gebündelt und über einen dichrotischen Spiegel zum Objektiv und Objekt geleitet. Der Spiegel ist nur für das langwellige Fluoreszenzlicht durchlässig, welches der Detektor erfassen kann.

Der Detektor selbst kann nur das Licht detektieren, das durch seine Lochblende (pinhole) hindurch gelangt ist. Der Durchmesser der Lochblende ist variabel. Somit wird das Fluoreszenzlicht nur an einem bestimmten Punkt des Objekts zur selben Zeit fokussiert. Es ist also möglich eine dünne, exakt definierte Schicht aufzunehmen. Denn das emittierte Fluoreszenzlicht von Schichten über und unter der Fokusebene wird nicht auf der Ebene der Lochblende des Detektors vereint. Damit wird es von der Detektion exkludiert.

Das Mikroskop trägt konfokal im Namen, da der Anregungspunkt und der Punkt der Emission in der Mitte der Lochblende des Detektors gleichzeitig im Fokus sind.

Abbildung 9 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Konfokalmikroskops, um den Verlauf des Lasers und des Lichts schematisch nachvollziehen zu können.

Die festgelegten Einstellungen des Mikroskops werden in Tabelle 9 aufgezeigt. Sie wurden bei allen Messungen gleich verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Werte wurden so gewählt, dass ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes durch zu hohe Laserintensität, minimiert wird und das Detektor-Rauschen möglichst geringgehalten wird. (53,54)



**Abbildung 9:** schematische Darstellung eines Konfokalmikroskop mit Lichtverlauf.

Der rote Strahlengang geht vom Laser aus, wird an der Anregungslochblende gebündelt und vom dichroitischen Spiegel auf das Objekt gespiegelt. Die mit Fluoreszenz Farbstoffen gekoppelten Moleküle absorbieren das Licht und emittieren Fluoreszenzlicht (blauer Strahl). Der Spiegel ist für Fluoreszenz Licht durchlässig, weshalb es vom Detektor erfasst wird.

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

### 2.2.2. MitoSox™ Red

Wie schon unter Kapitel 2.1.2 beschrieben dient es dazu die Sauerstoffradikale, speziell Sauerstoffoxid durch Fluoreszenz, welche vom Detektor erfasst werden kann, darzustellen.

### 2.2.3. MitoTracker™ Green

Der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker™ Green von ThermoFischer (invitrogen #M7514) ist besonders für lebende Zellen geeignet. Er wird in DMSO gelöst, dass er eine Konzentration von 1mM hat und sammelt sich unabhängig vom Membranpotenzial in den Mitochondrien. Sein emittiertes Licht hat eine Wellenlänge von 516nm.

### 2.2.4. Messprotokoll

Auf die iCM werden MitoSox™ Red und MitoSox™ Green, welche in Zellkulturmedium (siehe Tabelle 5) gelöst sind, gegeben. Diese werden für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin werden sie mit einfacher Normaltyrode (2mM CaCl; siehe Tabelle 7) dreimal gewaschen und am Konfokalmikroskop gemessen. Diese Schritte erfolgen unter lichtgeschützten Bedingungen. Es wird mit Hilfe der Software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) überprüft, ob die mtROS sich tatsächlich in den Mitochondrien ansammelt. Dies geschieht, indem die lokale Übereinstimmung der grün und rot fluoreszierenden Farbstoffe geprüft wird.

**Tabelle 9:** Einstellungen des Lasers am Konfokalmikroskop

<b>Einstellungen des Lasers</b>	<b>Wert</b>
Time series (Abrasterungsvorgänge)	1
Laserpower (Intensität)	7,8
Pinhole (Lochblende)	70,0
Gain (Verstärkung)	402
Wellenlänge des Lasers	488nm

**Tabelle 10:** Fluoreszenzfarbstoffe

<b>Substanz</b>	<b>Benötigte Konzentration</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
MitoSox™ Green in DMSO gelöst (1mM)	0,5µM	M7514	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
MitoSox™ Red in DMSO gelöst (5mM)	5µM	M36008	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

### 2.2.5. Datenauswertung

Die am Konfokalmikroskop entstanden Bilder der Zellen wurden mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, von denen der eine die Mitochondrien anfärbt (in Abbildung 16 grün), der andere ROS in den Mitochondrien (in Abbildung 16 rot). Um in Erfahrung zu bringen, ob die ROS tatsächlich in den Mitochondrien sind, werden diese beide Bilder übereinandergelegt und mit dem ColocalisazionThreshold PlugIn von der Software Image J (Image Processing and Analysis in Java) analysiert, um den Grad der Kolokalisierung der Farbstoffe zu bestimmen.

Bei der Anwendung „Colocalisazion Threshold“ von Image J, wird die Grenze (Threshold), ab der die Fluoreszenz der beiden Farbstoffe jeweils vom Hintergrund unterschieden wird, nach der sogenannten Costets Methode automatisch berechnet (55,56). Dies geschieht auf Grundlage einer Analyse, bei der der Bereich der Pixel bestimmt wird, bei denen der PCC (Pearsons correlation coefficient: vergleicht Intensität der Pixel) positiv ist (57). Die Statistik, die daraus entsteht, ergibt den „Mander’s colocalisations coefficient“ (MCC). Bei diesem bedeutet 100%, dass eine vollständige Korrelation besteht und 0%, dass keine Korrelation vorhanden ist (56,58). Dabei wird sowohl berechnet, wie viele rot fluoreszierende Pixel innerhalb des grün fluoreszierenden Bereichs sind, als auch umgekehrt. (57)

Mit Hilfe des Programms Microsoft Excel (Version 2202) wurde aus den ermittelten MCC Werten ein Mittelwert gebildet.

### 2.3. Real-Time PCR

Hierbei soll mittels PCR die Expression der ROS Quellen auf mRNA Ebene untersucht werden. Es werden die Proteine NOX2, SOD2, die Atmungskettenkomplexe II und III und SGLT1 auf mRNA Ebene analysiert. Es werden Zellpellets der kultivierten iCM verwendet. Ihre RNA wird isoliert und mittels reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese kann nun zur real-time PCR mit TaqMan Analyse verwendet werden.

#### 2.3.1. RNA Isolation

Die Extraktion der RNA aus den hiPSC-CMs erfolgt mittels TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, France) nach den Herstellerangaben. In verschiedenen Schritten wird die RNA hier aufgereinigt und von Proteinen, Zelltrümmern und anderen Verunreinigungen befreit. Nach der Homogenisierung der Zellpellets mit 0,4ml TRIzol wird 80 µL Trichlormethan-Chloroform hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Daraufhin werden die Proben 15 Minuten mit 500 U/min ebenfalls bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandenen Überstände werden in ein neues Tube überführt. Es folgt eine weitere Zugabe von 80µL Trichlormethan-Chloroform, welches wiederum für 10 Minuten inkubiert wird und daraufhin zentrifugiert wird für 15 Minuten mit 10000 U/min bei RT. Der Überstand wird ebenfalls in ein neues Tube überführt. Nach Zugabe von 200µL Isopropanol werden die Proben für 48h bei -20°C gelagert. Nach dieser Zeit werden die Proben bei 4°C für 10 Minuten mit 10000U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Hier ist nun das Pellet wichtig. Dieses wird zweimal mit EtOH 70% gewaschen und ein letztes Mal für 5 Minuten bei 4°C mit 10000U/min in die Zentrifuge gegeben, woraufhin es getrocknet wird. Im Folgenden werden 10µL RNase freies H<sub>2</sub>O hinzugegeben und auf Eis gestellt für 30 Minuten. Nun können die Proben bei -80°C gelagert werden. Die Bestimmung der verbliebenen RNA Konzentration erfolgt am NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

#### 2.3.2. cDNA Transkription

Die isolierte RNA kann anschließend durch reverse Transkription zu cDNA umgeschrieben werden. Dafür werden RNA, Random Primer (Promega, Madison, WI, USA) und Wasser für 3 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis

gestellt. Dadurch können die Primer an der RNA binden. Anschließend werden Nukleotide, reverse Transkriptase, RT Puffer und RNase Inhibitoren in Form des Mastermixes (siehe Tabelle 11) dazugegeben und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die reverse Transkription kann nun durch Inkubation für 2 Minuten bei 90°C gestoppt werden. Die so hergestellte cDNA kann für die Taq-Man Analyse genutzt werden.

**Tabelle 11:** Mastermix für reverse Transkription

<b>Substanz</b>	<b>Menge pro Probe</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Firma</b>
PCR Nucleotide Mix	1 µL	C1145	Promega, WI, USA
5 x RT buffer	4 µL	M531A	Promega, WI, USA
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	1 µL	N2115B	Promega, WI, USA
M-MLV RT 5x Buffer	1 µL	M531B	Promega, WI, USA
RNase free water	3 µL	RFW250	Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, United Kingdom

### 2.3.3. Real Time PCR und TaqMan Analyse

Anschließend folgt die Taq-Man Analyse. Dabei können Gene in Bezug auf ihre Expression im Gewebe mittels einer fluorogenen Sonde untersucht werden. Die TaqMan Sonden sind mit Fluoreszenz Farbstoff gekoppelte Oligonukleotide, die sequenz-spezifisch sind für die Ziel-DNA. Sie sind am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff und am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff ausgestattet. Solange die Sonde intakt ist, reduziert der Quencher-Farbstoff die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET). Sobald die Sonden an der zu ihnen komplementären cDNA binden, wird der Reporter-Farbstoff durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten. Dadurch wird der Quencher- und der Reporter-Farbstoff voneinander getrennt, wodurch das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs emittiert wird und gemessen werden kann.

Außerdem kann durch die Abspaltung der Sonde der Primer bis zum Ende des Stranges verlängert werden und die Sonde behindert dies nicht. Somit werden bei jedem Zyklus zusätzlich Reporter-Farbstoffe abgespalten. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität proportional zu Menge des Amplikons. (59)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Gene bestimmt: UQCR2 (Komplex III), SDHA (Komplex II), SOD2, SGLT1 und NOX2. Als Housekeeping Gene wurden GAPDH und ACTB verwendet. Dazu wird zu der cDNA der TaqMan® Gene Expression Master Mix von Thermo Fisher Scientific dazugegeben (siehe Tabelle 13). Der Master Mix enthält AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure), Uracil-DNA Glycosylase (UDG), Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) mit dUTP, ROX®, als passive Referenz, und Puffer Komponenten. Für die Analyse der mRNA Expressionsmessung wurde das ViiATM 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und die QuantStudio™ Software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) genutzt. Die Reaktion findet in folgendem Schema (siehe Tabelle 12) statt:

**Tabelle 12:** Schema der real time PCR

	UDG Inkubation	Denaturierung	AmpliTag Gold Enzym Aktivierung Annealing/Elongation	PCR (40 Zyklen)
Zeit (Minuten)	1:36	10:00	00:15	1:00
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C

**Tabelle 13:** Master-Mix für Real Time PCR

Substanz	Menge pro Probe	Artikelnummer	Firma
Oligonucleotide	1 µL		Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NOX2 (cybb)		Hs00166163_m1	
SDHA (Komplex II)		Hs00188166_m1	
UQCRC2 (Komplex III)		Hs00996395_m1	
SOD2		Hs00167309_m1	
SGLT1 (SGL5A1)		Hs01573793_m1	
GABDH		Hs99999905_m1	

ACTB		Hs01060665_g1	
TaqMan Gene Expression Master Mix	5 µL	10525395	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
cDNA (6,66ng/µL)	4µL		

#### 2.3.4. Datenauswertung

Die Anzahl der Zyklen, die gebraucht werden, um eine definierte Fluoreszenz-Schwelle (threshold) zu erreichen wird als „threshold cycle“ (Ct) bezeichnet. Die aus der Messung erhaltenen Ct Werte korrelieren mit der Menge der Nukleinsäuren in der zu analysierenden Probe. Die Bestimmung von  $\Delta\text{ct}$  ergibt sich aus der Differenz zwischen dem „Housekeeping Gen“ (GAPDH) und dem jeweiligen Zielgen. Um die mRNA Expression des Zielgens mit den anderen Genen vergleichen zu können, muss der  $\Delta\Delta\text{ct}$  berechnet werden. Dieser ergibt sich durch folgende Formel:

$$\Delta\Delta\text{ct} = 2^{-\Delta\text{ct}}$$

Die Berechnung der Werte erfolgt mit Hilfe des Programms Microsoft Excel (Version 2202) und die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung mit dem Programm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Für die Prüfung der Signifikanz wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet. Um die Zelllinien paarweise auf Signifikanz zu untersuchen, wird daraufhin der Turkey Test durchgeführt. Es werden Werte  $<0,05$  als signifikant bewertet.

## 2.4. Western Blot

Mittels Western-Blot wird die Expression der möglichen ROS Quellen NADPH Oxidase 2 und 4 (NOX2, NOX4), Superoxid Dismutase 2 (SOD2) und Atmungskettenkomplexe II und III bestimmt, sowie die der Glucose Transporter GLUT4 und SGLT1.

### 2.4.1. Herstellung von Zell Lysaten

Es werden ebenfalls Zellpellets der kultivierten iCM verwendet. Sie werden in einen Eppendorf-Cup gegeben zusammen mit Lysepuffer (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Zusammensetzung des Lysepuffers in ddH<sub>2</sub>O

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
Destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	
Natriumchlorid (NaCl)	200 mmol/l
Tris(Trishydroxymethyl-aminomethan)	20 mmol/l
Natriumfluorid (NaF)	20 mmol/l
Triton X-100 Puffer, 1%ig	1 Vol.-%
Natriumorthovanadat	1 mmol/l
1,4-Dithiothreitol	1 mmol/l
Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP EASYpack, Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 100 ml
Proteinase-Inhibitor (cOmplete Tablets EDTA-free, Cocktail Tablets, EASY-Pack, Roche Diagnostics GmbH)	1 Tablette / 200 ml

Die folgende Inkubationszeit von 30 Minuten mit diesem Puffer und das wiederholte Vibrationsmischen alle 5 Minuten hat das Ziel die Zellstrukturen aufzubrechen und die intrazellulären Proteine in Lösung zu bringen. Danach werden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 6600 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wird verworfen während der Überstand in einen neuen Cup überführt wird. Die Lysate werden auf Eis gekühlt.

Im Folgenden muss die Proteingesamtkonzentration in den Proben bestimmt werden und Probenverdünnungen mit gleicher Proteinkonzentration hergestellt werden. Dies gewährleistet, dass für die quantitative Bestimmung der gesuchten Proteine stets die gleiche Menge an Gesamtprotein in den Proben vorliegt. Mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Variante der Biuretreaktion kann die Proteinkonzentration bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Kupfer (II) zu Kupfer (I) in alkalischer Lösung durch Proteine, proportional zur Proteinkonzentration. BCA bildet einen farbigen Komplex mit Kupfer (I), welcher bei einer Wellenlänge von 564nm absorbiert und in einer Absorptionsmessung nachweisbar ist.

Mit einer Verdünnung von 1:10 werden die Proben zusammen mit einer Verdünnungsreihe als Proteinstandard und reinem Lysepuffer als Leerwert auf einer 96 well Platte in 3-facher Bestimmung aufgetragen. Zu ihnen wird die Lösung der Biuretreaktion zur Proteinbestimmung gegeben, welche in einem Verhältnis von 1:50 aus Kupfer(II)sulfat und BCA hergestellt wurde (Kit zur Proteinkonzentrationsbestimmung: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Platte wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach wird die Extinktion bei 540nm gemessen (Gerät: InfiniteM200PRO;

Software: Tecan i-control). Die Werte werden in Excel eingetragen, es wird eine Eichkurve berechnet und damit die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

Die Lysate werden nun mit PBS (Dublecco's phosphate buffered saline), Ladepuffer (siehe Tabelle 15) und Mercaptoethanol verdünnt, damit man fertige Proben für den Western Blot erhält. Dabei wird die Konzentration mit PBS auf Gesamtproteinmenge auf 1mg/ml eingestellt. Ladepuffer wird mit 18% und Mercaptoethanol mit 2% zugegeben. Nun werden die Proben für 5 Minuten auf 95°C im Thermomixer erhitzt und daraufhin kurz auf Eis abgekühlt. Die Proben werden bei -20°C zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung des Ladepuffers in ddH<sub>2</sub>O

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
Tris-Lösung, 0,5 mol/l SDS, pH 6,8 (37°C) (siehe Tabelle 18)	31,25 Vol.-%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,35 mol/l
Bromphenolblau Natriumsalz	0,07 mmol/l
Glyzerol	0,5 Vol.-%

#### 2.4.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese wird ein 8% SDS Gel verwendet. Für die Herstellung der Gele werden die in den Tabellen Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18 beschriebenen Substanzen benötigt. Die Gelkammern werden mit den Proben beladen, in Laufpuffer (siehe Tabelle 19) gestellt und für 2h bei 30mA pro Gel gestartet, limitiert auf die maximale Spannung von 150 V und die maximale Leistung von 50 W.

**Tabelle 16:** Trenngel für Gelelektrophorese

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
Polyacrylamid	5%, 8%, 10% bzw. 12,5%
1,5 mol/l Tris/SDS-Lösung, pH 8,8; (siehe Tabelle 18)	25 Vol.-%
Ammoniumpersulfat (APS)	4,4 nmol/l
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,1 Vol.-%

**Tabelle 17:** Sammelgel für Gelelektrophorese

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
Polyacrylamid	8 %
0,5 mol/l Tris /SDS-Lösung, pH 6,8 (siehe Tabelle 18)	25 Vol.-%
APS	4,4 nmol/l
TEMED	0,1 Vol.-%

**Tabelle 18:** Lösungen Tris/SDS, pH 6,8 und pH 8,8

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration für Tris 1,5 mol/l /SDS, pH 8,8</b>	<b>Konzentration für Tris 0,5 mol/l /SDS, pH 6,8</b>
Tris Base	1,5 mol/l	0,5 mol/l
SDS	14 mmol/l	14 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 8,8	Einstellung pH 6,8

**Tabelle 19:** Gelelektrophorese-Laufpuffer pH:8,3:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	25 mmol/l
Glycin	192 mmol/l
SDS	3,5 mmol/l
HCl	Einstellung pH 8,3

### 2.4.3. Blotting

Nach 2 Stunden wird die Elektrophorese beendet und das Gel von den Glasplatten gelöst. Es wird in ein Transfersystem überführt bestehend aus Schwämmen, Filterpapieren und Nitrocellulose-Membran. Das System wird in eine Kammer mit Transferpuffer (siehe Tabelle 20) gegeben und dort 2 Stunden bei 400mA auf Eis gestartet. Die maximale Spannung beträgt 150 V und die maximale Leistung 50W.

**Tabelle 20:** Transferpuffer

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	32,5 mmol/l
Glycin	192 mmol/l
Methanol	20 Vol.-%
SDS	0,35 mmol/l
HCl 37%	Einstellung pH 8,3

#### 2.4.4. Immunmarkierung und Detektion

Nach dem Transfer wird die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und daraufhin mit destilliertem Wasser gewaschen, um zu kontrollieren, ob der Transfer funktioniert hat und sich die Proteinbanden rot gefärbt haben. Im Folgenden wird die Membran beschriftet und zerschnitten. Dies geschieht nach Lokalisation des gesuchten Proteins und der GAPDH-Bande. So können die Membranstücke in unterschiedlichen Antikörperlösungen inkubiert werden. Die Membran wird in Trennschälchen gelegt und auf einem Schwenkschüttler dreimal mit TBS-T (siehe Tabelle 21) gewaschen. So wird der komplette rote Farbstoff entfernt.

**Tabelle 21:** TBS-T (Tris-Buffered Saline mit Tween 20)

Substanz	Konzentration
Tris	0,02 mol/l
NaCl	0,15 mol/l
HCl 37%	Einstellung pH 7,5
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	0,1 Vol.-% ml

Daraufhin werden die Antikörperbindestellen geblockt, indem die Membran mit 5% Milchpulver in TBS-T für eine Stunde inkubiert wird. Das verhindert die Bindung von unspezifischen Antikörpern. Daraufhin werden die primären Antikörper hinzugegeben. Diese sind ebenso in 5% Milchpulversuspension gelöst, um die höchstmögliche spezifische Bindung der primären Antikörper (siehe Tabelle 22) zu erreichen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C unter ständiger Agitation auf einem Schüttler wird die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 23) in 5% Milchpulverlösung in TBS-T wird nun auf die Membran hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden werden die ungebundenen Antikörper wiederum dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T abgewaschen.

Um die Proteine sichtbar zu machen, wird nun eine Entwicklerlösung (Immobilon™Western, Chemieluminescent HRP Substrate Lösungen A und B im Mischverhältnis 1:1) für 5 Minuten auf die Membran hinzugegeben. Die Horseradish Peroxidase (HRP), die mit dem sekundären Antikörper verbunden ist, katalysiert die Oxidation von Luminol, welches in der Detektionslösung enthalten ist. Nach der Inkubationszeit werden die Membranen abgetupft, um die Entwicklerlösung zu

entfernen. Die Membranstücke werden nun auf eine Folie geklebt, welche wiederum mit Tabe auf die Entwicklerkassette geklebt wird. In die Kassetten werden Röntgenfilme gegeben und diese entwickelt.

Nach ihrer Entwicklung werden die Röntgenfilme in ein Bildgebungssystem (ChemieDoc™ MP Imaging System) übertragen. Die Aufnahmen von den Proteinbanden werden mit Hilfe des Programms ImageLab 5.2 erstellt.

**Tabelle 22:** primäre Antikörper

<b>Substanz</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
Anti-CYPP/NOX-2 AK	Kaninchen (monoklonal)	1:1000	NBP2-67680	Novus Biologicals, Littleton, Co, USA
Anti-NOX-4 AK Anti-SLC34A1-AK	Maus (monoklonal)	1:100	MBS668216	MyBioSource, Inc, San Diego, CA, USA
Anti-SDHA-AK	Kaninchen (monoklonal)	1:1000	#11998	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Anti-UQCR2-AK	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	MBS129218	MyBioSource, Inc, San Diego, CA, USA
Anti-SOD2/Mn-SOD-AK	Kaninchen (monoklonal)	1:2000	NBP2-67879	Novus Biologicals, Littleton, Co, USA
Anti-SGLT1-AK	Kaninchen (polyklonal)	1:500	Ab14686	Abcam, Cambridge, UK
Anti-GLUT4-AK	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	Ab33780	Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 23:** sekundäre Antikörper

Substanz	Spezies	Bestellnummer	Firma
Amersham ECL™ Mouse igG Horseradish Peroxidase linked whole antibody	Anti-Maus	NA931-1ML	Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough, USA
Amersham ECL™ Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody	Anti-Kaninchen	NA934-1ML	Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough, USA

#### 2.4.5. Datenauswertung

Für die Datenauswertung wird das Programm Image J (Image Processing and Analysis in Java) verwendet. Hiermit kann man die Schwärzung (= Intensität) der Banden quantifizieren. Die Werte, welche der Intensität der Banden entsprechen werden in Microsoft Excel (Version 2202) eingetragen und von ihnen die Hintergrundsignale abgezogen. Daraufhin erfolgt ihr Normierung auf GAPDH. Die so entstandenen Zahlenwerte entsprechen denen der Expression der Proteine und besitzen keine Maßeinheit. Es wird von einem metrischen Skalenniveau ausgegangen. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgt mit Hilfe des Programms GraphPad Prism9 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Die Prüfung auf Signifikanz erfolgt mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA. Auch hier wird daraufhin der Turkey Test durchgeführt, um die Zelllinien paarweise zu auf Signifikanz zu untersuchen. Es werden Werte  $p < 0,05$  als signifikant bewertet.

#### 2.5. Kultur der hiPSC Kardiomyozyten und Differenzierung zu iCM

Für alle Experimente werden iCM einer symptomatischen Patientin (Indexpatientin) verwendet, ebenso wie die einer unabhängigen Kontrollpatientin ohne Mutation auf dem PKP2-Gen (Kontrollpatientin) und die mittels CRISPR/Cas korrigierten Zellen der Indexpatientin (Indexkontrolle).

Aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) dieser Personen wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) induziert und kultiviert nach einem etablierten Protokoll von Fuerstenau-Sharp et. al. 2015 (60). Die kultivierten hiPSC

werden daraufhin zu Kardiomyozyten (iCM) differenziert. Nach weiteren 3 Monaten Reifung können diese Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

#### 2.5.1. Differenzierung zu iCM

Die kultivierten stabilen Kolonien der induzierten Pluripotenten Stammzellen werden in 28 Tagen zu induzierten Kardiomyozyten differenziert. Dafür werden wie in Tabelle 24 dargestellt zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene Medien verwendet. Diese dienen der zeitgemäßen optimalen Differenzierung zu Kardiomyozyten und ihrer Aufreinigung. Aufgereinigt werden die Kardiomyozyten mit Laktat, da nur diese Laktat verstoffwechseln können und somit im Gegensatz zu anderen Zellen überleben. Es werden „ultra low attachment“ Flaschen (Corning®UltraLow Attachment Surface) verwendet und ab Tag 24 die mit Gelatine beschichteten „slides“ (FluoroDish Cell Culture Dish von WPI, Berlin). Die Medien sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Die Variabilität der Zellreihen ist äußerst gering, wodurch eine hohe Vergleichbarkeit erreicht wird.

Trotzdem ist es für alle Experimente notwendig Zellen aus mindestens zwei bis drei unterschiedlichen Differenzierungen einzusetzen, um etwaige Artefakte, die möglicherweise während der Differenzierung auftreten könnten, auszuschließen.

**Tabelle 24:** zeitliche Anwendung von Medien und Wachstumsbedingungen zur Differenzierung der human induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) zu induzierten Kardiomyozyten (iCM)

Tag	Medium	Wachstumsbedingungen
Tag 0	Verwendung von in AFM-Medium	Hypoxie Brutschrank: 37°C, 7%CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Tag 1	Mediumwechsel zu ATM-Medium	Schüttler (15Upm), Hypoxie Brutschrank: 37°C, 7%CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Tag 2	Mediumwechsel zu CIM-50-Medium	Schüttler (15Upm), Hypoxie Brutschrank: 37°C, 7%CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Tag 3 bis Tag 7	Mediumwechsel zu CIM-50-Medium+A6B10 (an <b>Tag 3</b> : 1:2 Splitten)	Schüttler (15Upm), Hypoxie Brutschrank: 37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Tag 8 bis Tag 16	Mediumwechsel zu CMM-Medium alle 2 Tage	Schüttler (15Upm), Hypoxie Brutschrank: 37°C, 7%CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>  ab <b>Tag 14</b> : 37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>
Tag 17 bis Tag 23	Mediumwechsel zu CMM + 1% DL Laktat, täglich	37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>
Tag 24	<i>Ausplattieren der Herzzellen auf mit Gelatine beschichteten Flaschen oder slides und Kontrolle mittels TnT-FACS</i>  Verwendung von CMM + 1% DL Laktat (TnT < 90%)  Oder: DS-CMM + 10% FBS (TnT > 90%)	37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>
Tag 25 und 26	Kein Mediumwechsel	37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>
Tag 27 und 28	Verwendung von CMM + 1% DL Laktat (TnT < 90%) oder DS-CMM + 2,5% FBS (TnT > 90%)	37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>
ab Tag 29	Mediumwechsel zu DS-CMM + 2,5% FBS 2 x pro Woche	37°C, 7% CO <sub>2</sub> , 20% O <sub>2</sub>

**Tabelle 25:** verschiedene Medien zur Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu induzierten Kardiomyozyten

<b>Substanz</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
<b>AFM-Medium</b>		
TeSR-Medium	5870	Stem Cell Technologies, Saint Égrève, Frankreich
H1152	2414	BioTechne GmbH, Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt Deutschland
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
<b>ATM-Medium</b>		
TeSR-Medium	5870	Stem Cell Technologies, Saint Égrève, Frankreich
DMEM Low Glucose	D6046	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FBS characterized	SH30071.03	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
H1152	2414	Tocris
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FGF 100µg/ml	100-18B	Peprtech GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>CIM-Medium</b>		
DMEM Low Glucose	D6046	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FBS characterized	SH30071.03	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FGF 100 µg/ml	100-18B	Peprtech GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>CIM-50-Medium</b>		
DMEM Low Glucose	D6046	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

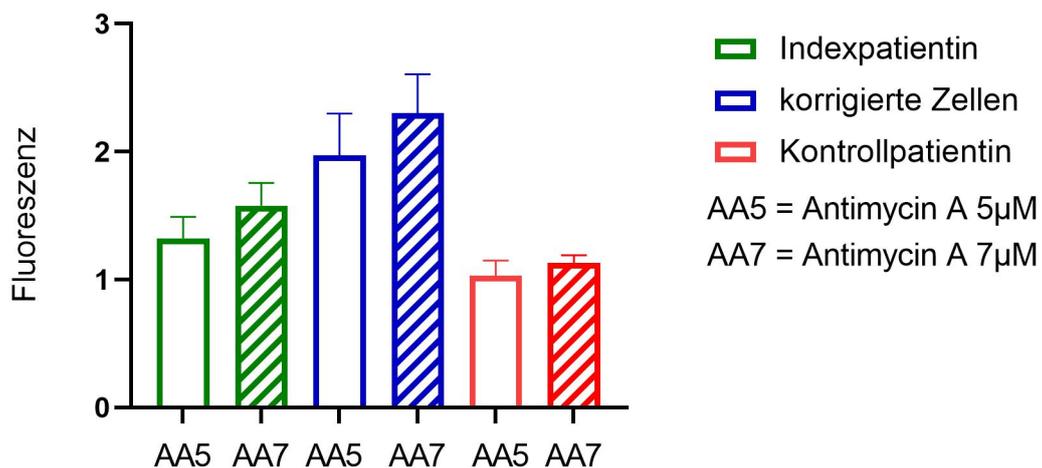
FBS characterized	SH30071.03	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FGF 100 µg/ml	100-18B	Peprotech GmbH, Hamburg, Deutschland
Activin A 6µg/ml	120-14E	Peprotech GmbH, Hamburg, Deutschland
BMP-4 10µg/ml	120-05	Peprotech GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>CMM-Medium</b>		
DMEM Low Glucose	D6046	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FBS characterized	SH30071.03	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
<b>CMM + 1% DL-Laktat</b>		
DMEM Low Glucose	D6046	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
FBS characterized	SH30071.03	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
0,4M DL-Laktat	L7900-100ml	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
<b>DS-CMM + FBS</b>		
DMEM No Glucose	11966-025	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
D-(+)-Galactose	G0750-100G	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
100mM Na-Pyruvate	S8636-100ml	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
HyClone® Dialyzed Fetal Bovine Serum	SH30079,02	Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, USA
Gentamycin 50mg/ml	G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Fluoreszenz-Messung der mitochondrialen Sauerstoffradikale im Tecan

##### 3.1.1. Optimierung des Versuch-Aufbaus

Als Positivkontrolle wurde der Atmungsketten-Entkoppler Antimycin A (AA) verwendet. Es wurden die zwei Konzentrationen 5 $\mu$ M und 7 $\mu$ M verglichen, um den Versuchsaufbau zu optimieren. Da die Konzentration von 7  $\mu$ M eine stärkere mtROS Produktion in den Mitochondrien auslöste, wurden zur weiteren statistischen Auswertung diese Werte verwendet (siehe Abbildung 10). So steigt durch Erhöhung von AA5 (5  $\mu$ M ) auf AA7 (7  $\mu$ M) bei der Indexpatientin die mtROS im Mittel von 1,578 um 19,19%, bei den korrigierten Zellen von 1,972 um 16,74% und bei den Kontrollzellen von 1,028 um 10,10%.

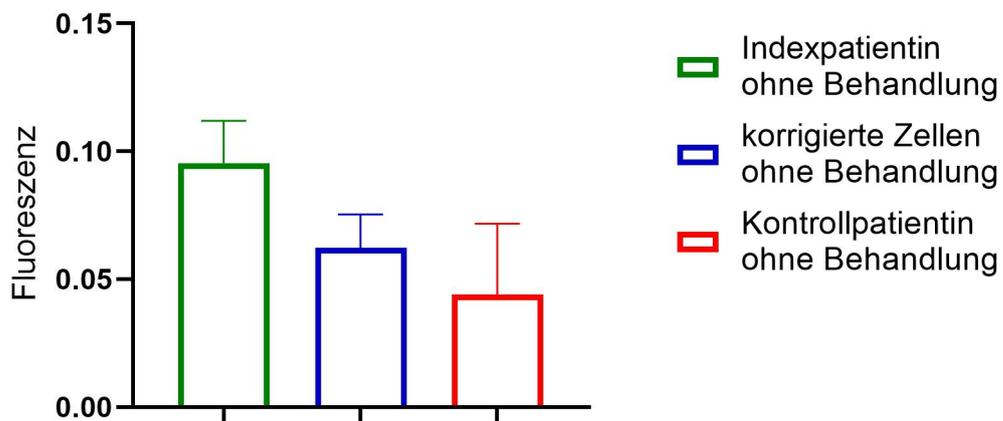


**Abbildung 10:** Anstieg der relativen mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (mtROS) bei der Erhöhung der Konzentration von Antimycin A von 5 $\mu$ M auf 7 $\mu$ M.

Die Abbildung zeigt bei den Zellen der Indexpatientin (grüne Balken), bei denen der korrigierten Zellen (blaue Balken) und bei denen der Kontrollpatientin (rote Balken) eine Erhöhung der relativen Fluoreszenz bei Erhöhung der Konzentration des Atmungsketten-Entkopplers Antimycin A von 5  $\mu$ M (jeweils leerer Balken) auf 7  $\mu$ M (jeweils quergestreifter Balken). Die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

### 3.1.2. Verhalten der mtROS bei den Zellen ohne Behandlung

In Abbildung 11 ist erkennbar, dass im Mittel die mitochondrialen Sauerstoffradikale bei den unbehandelten Zellen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,09539 \pm 0,01653$ ) höher sind als bei denen der korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,06237 \pm 0,01294$ ) und diese wiederum höher als bei denen der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,04393 \pm 0,02783$ ).

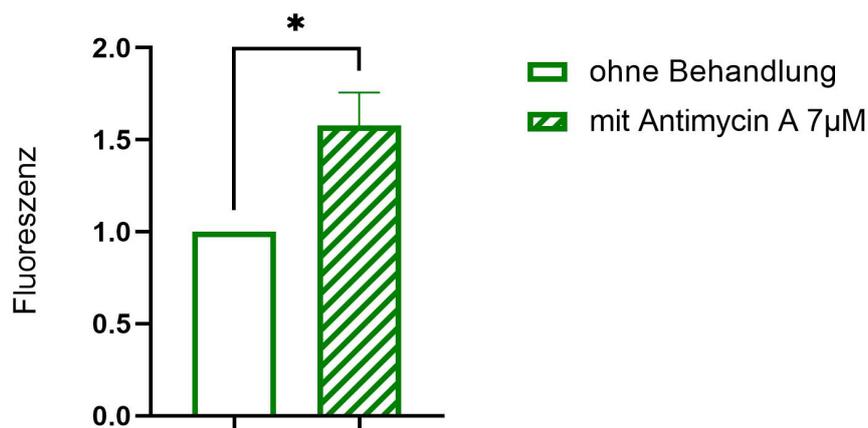


**Abbildung 11:** Vergleich der absoluten mtROS Fluoreszenzwerte von den Zellen der Indexpatientin, den korrigierten Zellen und den Zellen der Kontrollpatientin jeweils ohne Behandlung.

Die Fluoreszenz der mtROS ist am höchsten bei den Zellen der Indexpatientin (grüner Balken), gefolgt von den korrigierten Zellen (blauer Balken). Am geringsten ist diese bei den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken). Die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

### 3.1.3. Anstieg von mtROS bei Behandlung mit Antimycin A

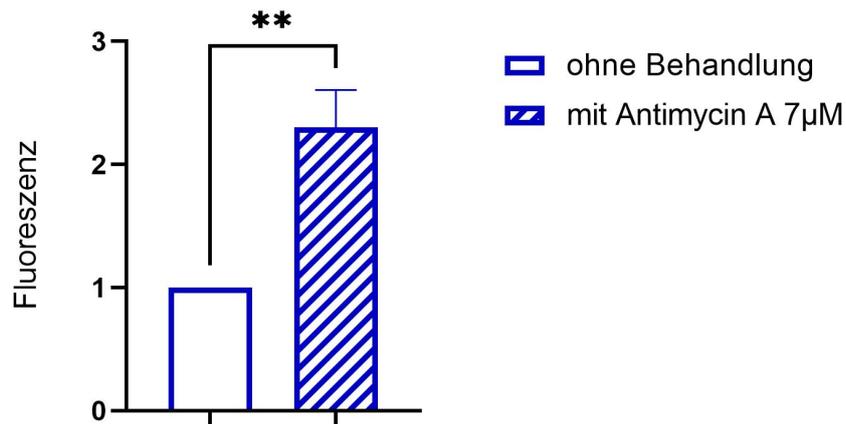
Um die Unterschiede in der Produktion von Sauerstoffradikalen zwischen den Zellen der Indexpatientin, den korrigierten Zellen und den Zellen der Kontrollpatientin herauszuarbeiten, wurde der Anstieg der mtROS nach Behandlung mit Antimycin A verglichen. In den Abbildung 12 und Abbildung 14 ist zu erkennen, dass es zu einem steileren Anstieg von mtROS bei den korrigierten Zellen (siehe Abbildung 14) kommt als bei den Zellen der Indexpatientin (siehe Abbildung 12). Somit kommt es bei den Kardiomyozyten mit PKP2 Mutation (Indexpatientin) mit einem Mittel von  $0,5783 \pm 0,1789$  zu einem signifikanten (p-Wert: 0,0120) Anstieg von 57,8%. Bei den korrigierten Zellen kommt es mit  $1,302 \pm 0,3036$  im Mittel zu einem signifikanten (p-Wert: 0,0016) Anstieg von 130,2%. Die Messung der Zellen der Kontrollpatientin ergibt einen sehr geringen Anstieg nach Behandlung mit Antimycin A von 13,2% mit einem Mittel von  $0,1323 \pm 0,06015$  (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 12:** Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der Zellen der Indexpatientin mit Antimycin A 7µM:

Hier ist der relative Anstieg der mtROS der Zellen der an ARVC erkrankten Patientin zu sehen. Man erkennt, dass die Zellen, welche mit Antimycin A behandelt wurden (quergestreifter Balken) einen Anstieg an ROS von 57,8 % zu den Zellen ohne Behandlung (leerer Balken) haben. Die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

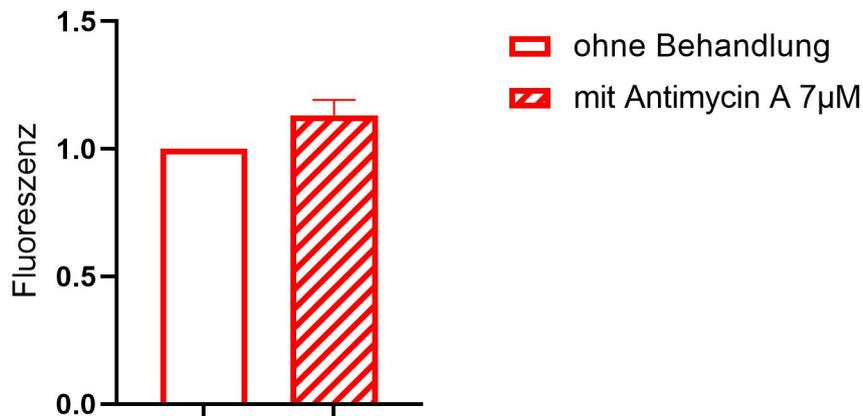
Statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$



**Abbildung 14:** Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der korrigierten Zellen mit Antimycin A 7 µM:

Hier ist der relative Anstieg der mtROS der korrigierten Zellen zu sehen. Man erkennt, dass die Zellen, welche mit Antimycin A behandelt wurden (quergestreifter Balken), einen Anstieg an ROS von 130,2 % zu den Zellen ohne Behandlung (leerer Balken) haben. Die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$ ; \*\* d.h.  $p < 0,01$

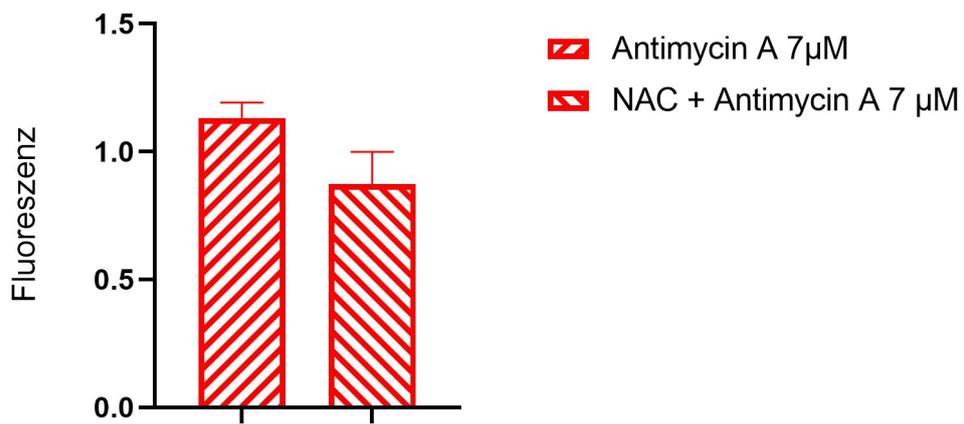
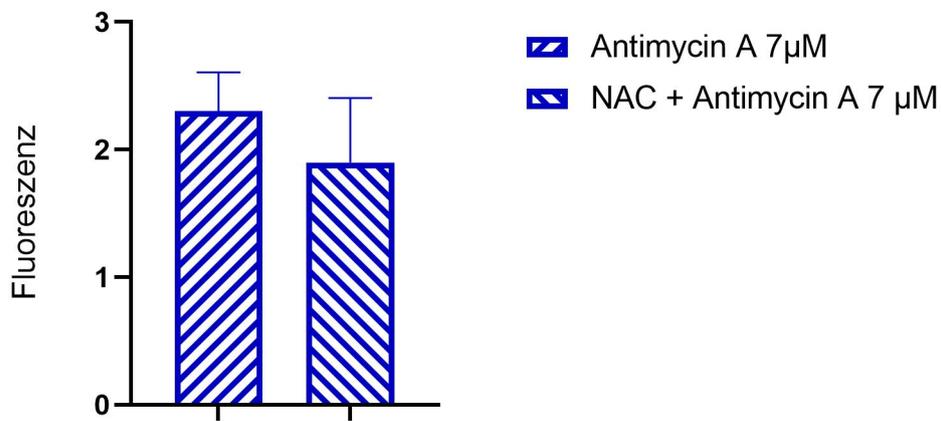
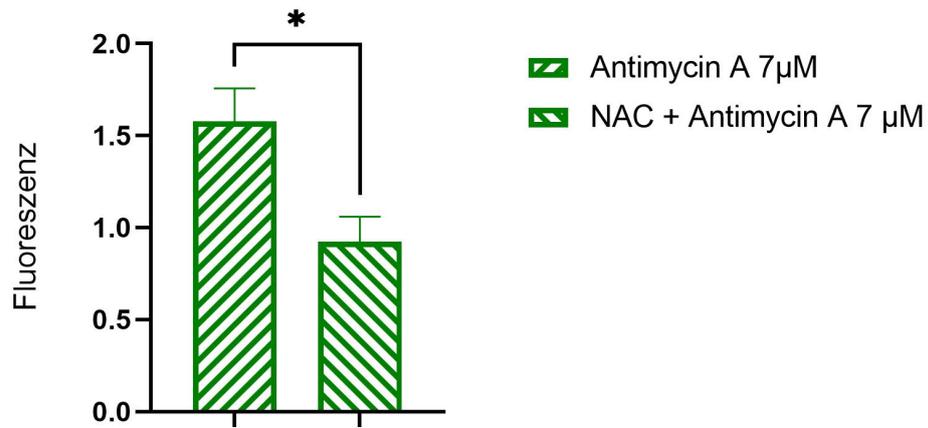


**Abbildung 13:** Anstieg der relativen Fluoreszenz der mtROS nach Behandlung der Zellen der Kontrollpatientin mit Antimycin A 7 µM:

Hier ist der relative Anstieg der mtROS der Zellen der Kontrollpatientin zu sehen. Man erkennt, dass die Zellen, welche mit Antimycin A behandelt wurden (quergestreifter Balken) einen Anstieg an ROS von 13,2% zu den Zellen ohne Behandlung (leerer Balken) haben. Die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

#### 3.1.4. Hemmung der ROS durch Zugabe von NAC

Mit Hilfe von N-Acetyl-Cystein (NAC) kann die Bildung von ROS gehemmt werden. Anhand der folgenden Abbildung 15 ist erkennbar, dass durch Zugabe von NAC zu den Zellen, welche mit Antimycin A (7  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, die Sauerstoffradikale gehemmt werden und somit deren Fluoreszenz sinkt. Wie in der Abbildung zu erkennen, ist dies bei allen drei Zelllinien zu beobachten. Am stärksten und damit signifikant mit einem p-Wert von 0,0271 sinkt die Fluoreszenz der mtROS bei den Zellen der Indexpatientin. Verglichen zu der Behandlung der Zellen mit nur Antimycin A sinkt die Fluoreszenz bei Zugabe von zusätzlich NAC um 41,6%, also im Mittel um  $-0,6559 \pm 0,2355$ . Die Fluoreszenz bei den Zellen mit Mutationskorrektur sinkt um 17,5% um im Mittel  $-0,4029 \pm 0,5889$  und die der Zellen der Kontrollpatientin mit einem Mittel von  $-0,2598 \pm 0,1401$  um 23,0%.



**Abbildung 15:** Hemmung der mitochondrialen Sauerstoffradikale durch Zugabe von N-Acetyl-Cystein (NAC) zu den Zellen.

Die hier gezeigte relative Fluoreszenz entspricht der Fluoreszenz der mitochondrialen Sauerstoffradikale (mtROS).

Die Zellen der Indexpatientin (grün) reagieren am stärksten auf die Zugabe von NAC zu den mit Antimycin A (7 $\mu$ M) behandelten Zellen. Sie zeigen eine Reduktion der Fluoreszenz der mtROS um 41,6%. Auch die korrigierten Zellen (blau) und die Zellen der Kontrollpatientin (rot) reagieren mit einer Runterregulierung der mtROS von 17,5% und 23,0%.

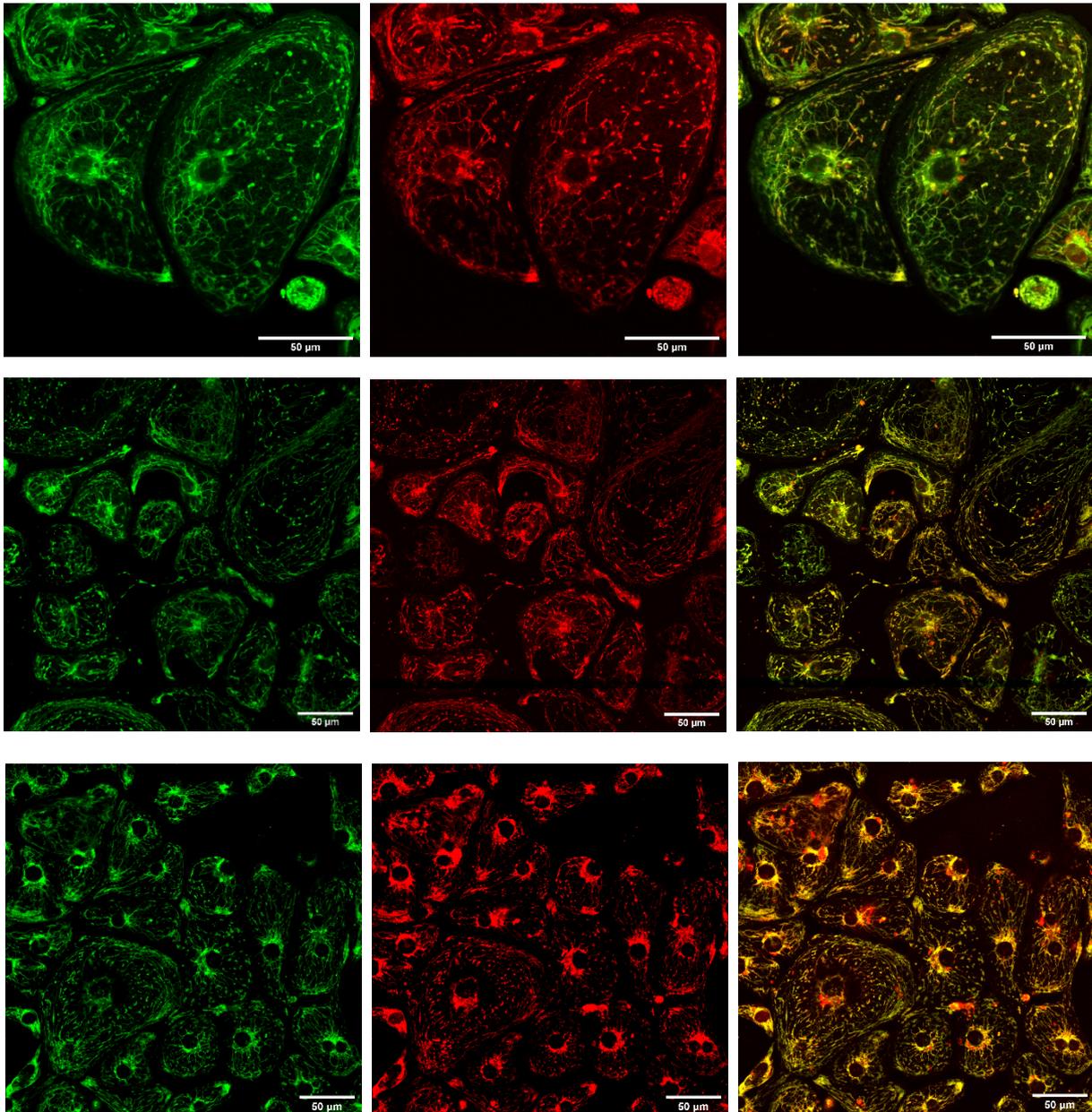
Die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt. Statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$

### 3.2. Kolokalisation der ROS in den Mitochondrien

Die Kardiomyozyten aller drei Zellreihen wurden mit dem mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker<sup>TM</sup> Green angefärbt und fluoreszieren bei einer Wellenlänge von 516 nm (in Abbildung 16 grün dargestellt). Gleichzeitig wurden bei den iCM die mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSox<sup>TM</sup> Red angefärbten Sauerstoffradikale in den Mitochondrien beobachtet, welche bei einer Wellenlänge von 488 nm fluoreszieren (in Abbildung 16 rot dargestellt). Mit Hilfe von Image J (Image Processing and Analysis in Java) wurden diese beiden Färbungen übereinandergelegt und somit die Kolokalisation der ROS in den Mitochondrien dargestellt.

Mit Hilfe des Colocalisation Threshold Plugin bei ImageJ wurde der Manders Kolokalisation Koeffizient (MCC) berechnet. Durch die dort integrierte Costes Methode wurde der Schwellenwert automatisch berechnet. Dieser entspricht dem Intensitätslevel, ab dem bei beiden Kanälen die Farben kolokalisiert sind.

Die Werte aller Bilder wurden in Excel (Version 2202) eingetragen und der Mittelwert berechnet. Im Mittel liegt der MCC über allen gemessenen Bildern bei 89,9%.



**Abbildung 16:** Mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Kardiomyozyten verschiedener Zellreihen, welche die Kolokalisation der Sauerstoffradikale in den Mitochondrien darstellen.

Es sind Kardiomyozyten der Indexpatientin (oberste Reihe), der korrigierten Zellen (mittlere Reihe) und der Kontrollpatientin (unterste Reihe) zu erkennen. Man kann jeweils ganz links die mit MitoTracker™ Green angefärbten Mitochondrien und in der Mitte die mit MitoSox™ Red angefärbten mitochondrialen Sauerstoffradikale sehen. Ganz rechts sind beide Farben übereinandergelegt worden, um die Kolokalisation der ROS in den Mitochondrien zu dazustellen.

### 3.3. Proteinbestimmung mit Western Blot und Expression der mRNA durch die qPCR

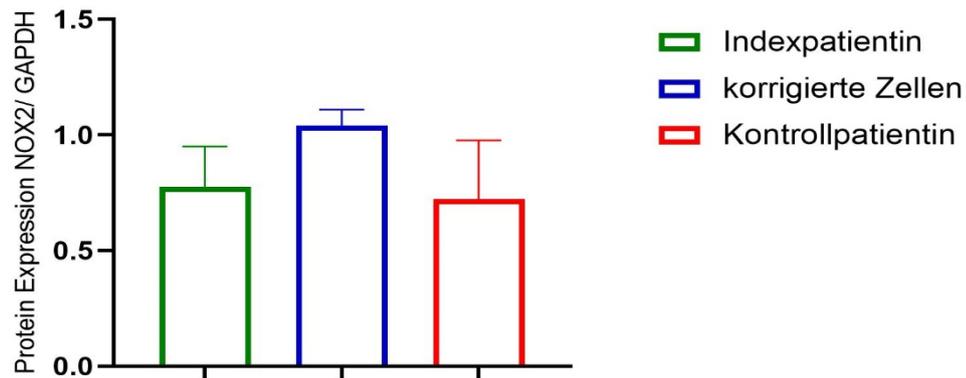
Mit Hilfe des Western Blots wurde die Expression der Proteine NADPH-Oxidase 2 und 4, die Atmungskettenkomplexe II und III, die Sauerstoff-Dismutase 2 und die Glukosetransporter GLUT 4 und SGLT1 bestimmt. Durch die qPCR wurde die Expression der mRNA derselben Proteine bestimmt mit Ausnahme von GLUT4 und NOX4.

#### 3.3.1. NADPH-Oxidasen (NOX)

##### a. NOX2

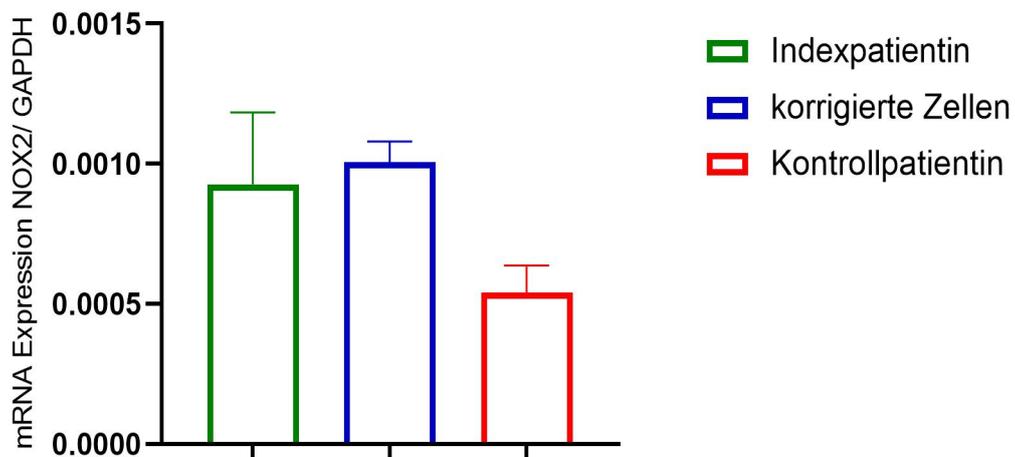
In der Auswertung des Western Blots fällt ein tendenziell leicht erhöhtes Vorliegen von NOX2 bei den korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM:  $1,041 \pm 0,06936$ ) im Vergleich zu denen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,7741 \pm 0,1770$ ) auf. Die Werte der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,7213 \pm 0,2552$ ) weisen im Mittel am ehesten die wenigste Menge an NOX2 auf (siehe Abbildung 17).

Die Expression der mRNA der einzelnen Zelllinien (siehe Abbildung 18) stimmt im Verhältnis mit der des Western Blots insofern überein, dass die Zellen der Kontrollpatientin im Mittel am wenigsten NOX2 (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,541 \times 10^{-3} \pm 0,09566 \times 10^{-3}$ ) auf mRNA-Ebene exprimieren. Die Zellen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,9265 \times 10^{-3} \pm 0,2565 \times 10^{-3}$ ) und korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM:  $1,006 \times 10^{-3} \pm 0,07366 \times 10^{-3}$ ) exprimieren im Mittel mehr NOX2 auf mRNA-Ebene.



**Abbildung 17:** Expression der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Es fällt ein erhöhtes Vorliegen der Protein Expression NOX2 bei den korrigierten Zellen (blauer Balken) im Vergleich zu denen der Indexpatientin (grüner Balken) und denen der Kontrollpatientin (roter Balken) auf.

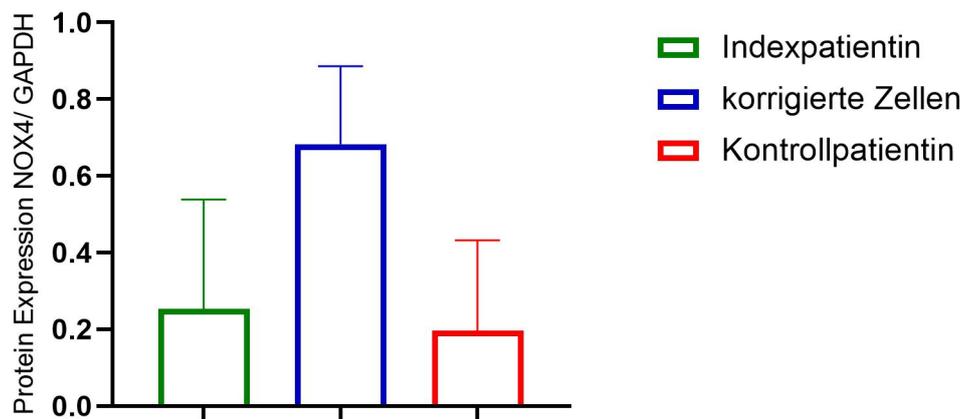


**Abbildung 18:** Expression der mRNA der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Es liegt im Mittel eine erhöhte NOX2 Proteinexpression bei den Zellen der Indexpatientin (grüner Balken) und den korrigierten Zellen (blauer Balken) im Vergleich zu den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) vor.

## b. NOX4

Es liegt im Mittel am meisten des Proteins NOX4 bei den korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,6828 \pm 0,2032$ ) vor. In den Zellen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,2538 \pm 0,2851$ ) liegt tendenziell etwas mehr als in den Zellen der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,1963 \pm 0,2356$ ) vor (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Expression der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

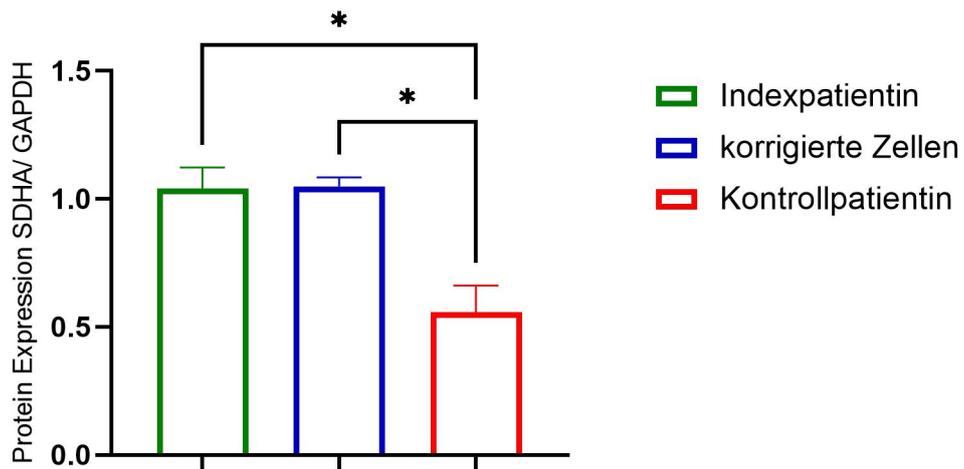
Es zeigt sich ein erhöhtes Vorliegen der Protein Expression von NOX4 bei den korrigierten Zellen (blauer Balken) im Vergleich zu denen der Indexpatientin (grüner Balken) und der Kontrollpatientin (roter Balken).

### 3.3.2. Komplexe der Atmungskette

#### a. Komplex II (SDHA)

Die Zelllinien der mit ARVC erkrankten Patientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $1,040 \pm 0,08267$ ) und der korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM:  $1,050 \pm 0,03498$ ) zeigen auf Proteinebene kaum einen Unterschied in ihrer Expression, während beide signifikant mehr SDHA exprimieren als die Zellen der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,5563 \pm 0,1054$ ). Dies ist in Abbildung 20 erkennbar. Die Kontrollpatientin unterscheidet sich statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0123 von der Indexpatientin und mit einem p-Wert von 0,0112 von den korrigierten Zellen.

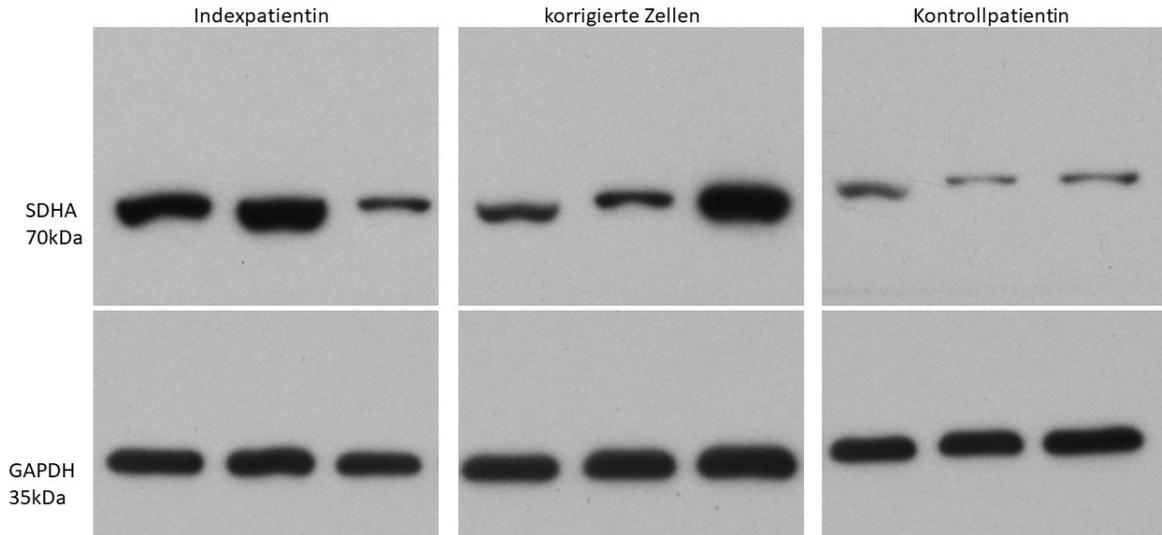
Auch in den Ergebnissen der qPCR (siehe Abbildung 21) ist ersichtlich, dass die Zellen der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,01050 \pm 1,957 \times 10^{-3}$ ) am wenigsten SDHA auf mRNA Ebene exprimieren, verglichen mit den anderen Zelllinien (Indexpatientin Mittel  $\pm$  SEM:  $0,01379 \pm 1,481 \times 10^{-3}$ ; korrigierte Zellen Mittel  $\pm$  SEM:  $0,01720 \pm 5,54 \times 10^{-3}$ ).



**Abbildung 20:** Expression der SDHA (Komplex II) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt. Statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$

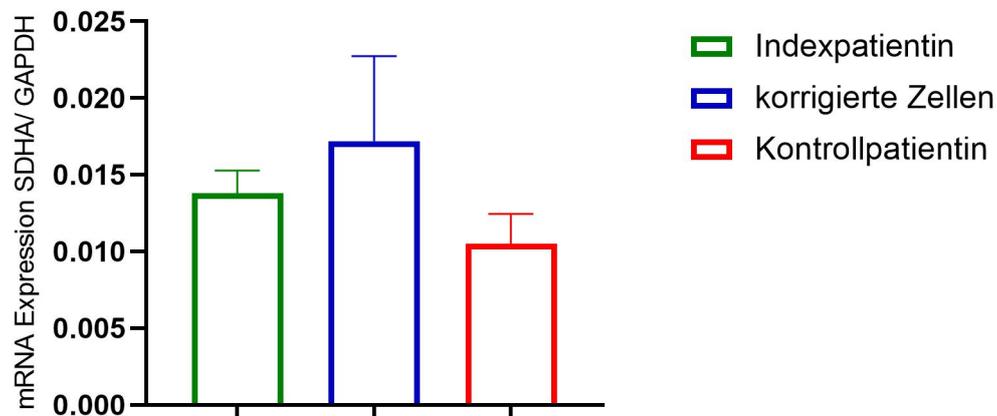
Die Zellen der Indexpatientin (grüner Balken) und der korrigierten Zellen (blauer Balken) haben auf Proteinebene keinen Unterschied in der Expression von SDHA. Jedoch exprimieren sie signifikant mehr SDHA als die Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken).

p-Wert der Indexpatientin zur Kontrollpatientin: 0,0123, p-Wert der korrigierten Zellen zur Kontrollpatientin: 0,0112.



**Abbildung 22:** Originalregistrierung des Komplex II (SDHA) der Atmungskette (obere Reihe) und von GAPDH (untere Reihe) im Western Blot.

Die Kontrollpatientin hat im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien eine schwächer ausgeprägte SDHA Expression.

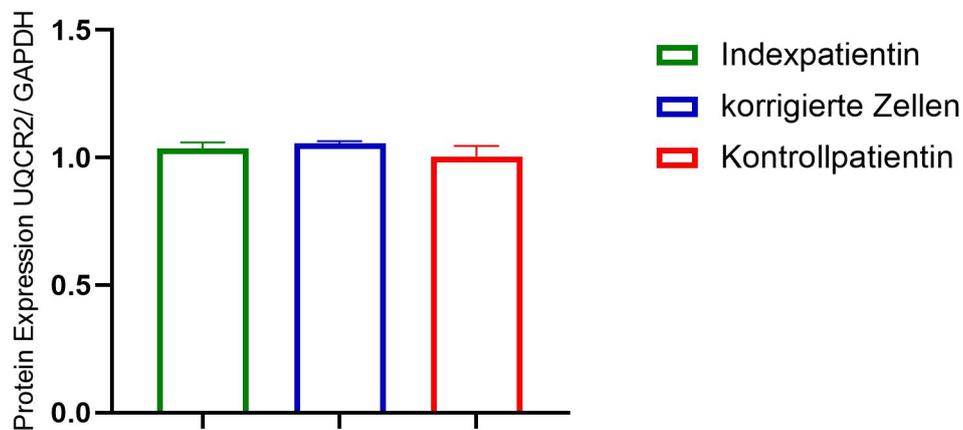


**Abbildung 21:** Expression der mRNA der SDHA (Komplex II) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Die Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) haben verglichen mit den Zellen der Indexpatientin (grüner Balken) und den korrigierten Zellen (blauer Balken) tendenziell die geringste Expression an mRNA des Komplex II. Der Unterschied ist nicht signifikant.

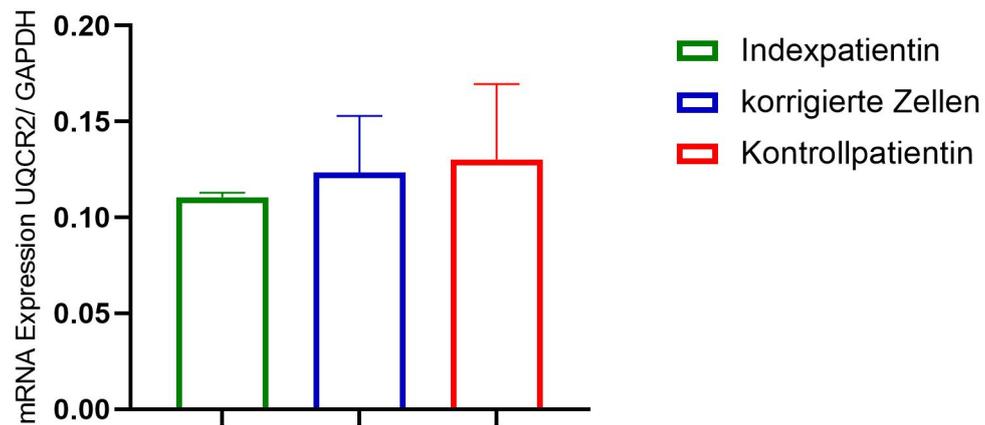
## b. Komplex III (UQCR2)

Es sind im Westen Blot und in der qPCR keine Unterschiede beim Komplex III der Atmungskette zwischen den einzelnen Zelllinien aufgefallen (siehe Abbildung 23, Abbildung 24). Der Mittelwert  $\pm$  SEM des Western Blots bei der Indexpatientin beträgt  $1,035 \pm 0,02373$ , der der korrigierten Zellen  $1,055 \pm 9,295 \times 10^{-3}$  und der der Kontrollpatientin  $1,005 \pm 0,04038$ . Der Mittelwert  $\pm$  SEM der qPCR beträgt bei der Indexpatientin  $0,1105 \pm 2,438 \times 10^{-3}$ , bei den korrigierten Zellen  $0,1234 \pm 0,02951$  und bei der Kontrollpatientin  $0,1302 \pm 0,0393$ .



**Abbildung 23:** Expression der UQCR2 (Komplex III) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

Es fallen tendenziell keine Unterschiede in der Expression des Proteins zwischen den Zellen Indexpatientin (grüner Balken), den korrigierten Zellen (blauer Balken) und den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) auf.



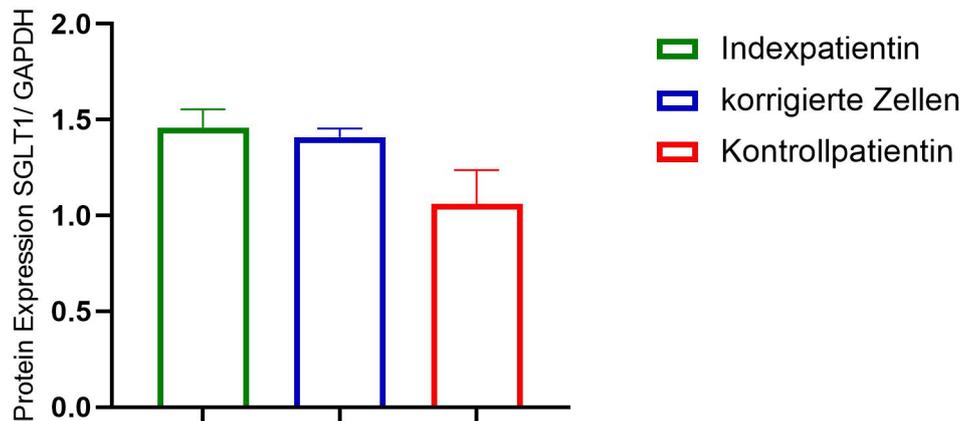
**Abbildung 24:** Expression der mRNA der UQCR2 (Komplex III) bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Es fallen keine wesentlichen Unterschiede in der Expression der mRNA zwischen den Zellen Indexpatientin (grüner Balken), den korrigierten Zellen (blauer Balken) und den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) auf.

### 3.3.3. Glukosetransporter

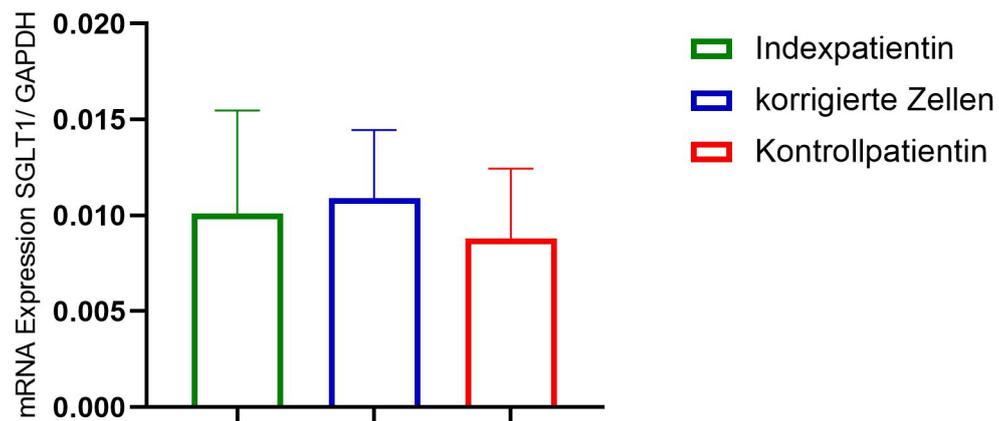
#### a. Natrium-Glucose-Ko-Transporter 1 (SGLT1)

Bei der Expression des Glucose Transporters SGLT1 sind sowohl im Western Blot als auch bei der qPCR zwischen den Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $1,46 \pm 0,09398$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $0,01012 \pm 5,359 \times 10^{-3}$ ) und den korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $1,410 \pm 0,04468$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $0,01090 \pm 3,561 \times 10^{-3}$ ) aufgefallen. Man kann erkennen, dass die Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $1,059 \pm 0,1793$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $8,789 \times 10^{-3} \pm 3,646 \times 10^{-3}$ ) bei beiden Messungen tendenziell am wenigsten des SGLT1 exprimiert (siehe Abbildung 25, Abbildung 26).



**Abbildung 25:** Expression der SGLT1 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

Es liegt kein Unterschied in der Expression von SGLT1 zwischen der Indexpatientin (grüner Balken) und den korrigierten Zellen (blauer Balken) vor. Die Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) exprimieren tendenziell weniger.

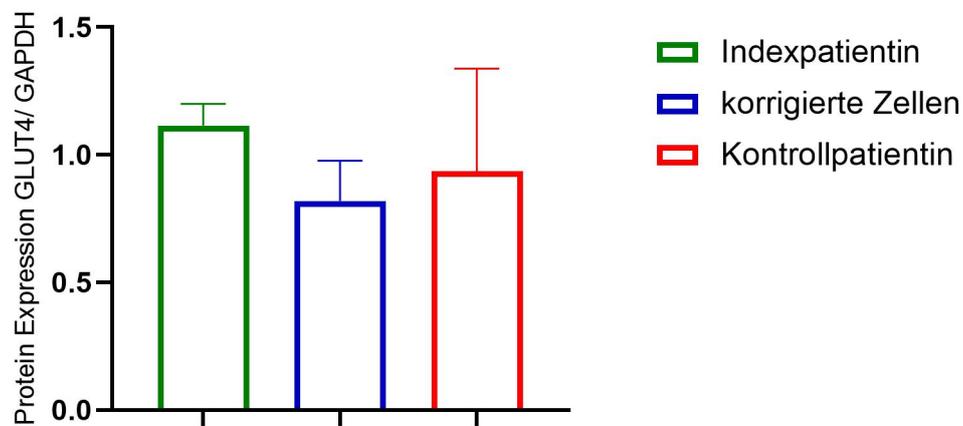


**Abbildung 26:** Expression der mRNA der SGLT1 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt

Es liegt kein Unterschied in der Expression von SGLT1 zwischen der Indexpatientin (grüner Balken), den korrigierten Zellen (blauer Balken) vor und den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken) vor.

## b. Glukose Transporter 4 (GLUT4)

Die korrigierten Zellen zeigen eine geringere Expression auf Proteinebene als die Zellen der Indexpatientin. Obwohl die Zellen der Kontrollpatientin stärkere Schwankungen zwischen den Messungen aufweisen (Mittel  $\pm$  SEM:  $0,9355 \pm 0,4023$ ) als die anderen beiden Zelllinien (Mittel  $\pm$  SEM der Indexpatientin:  $1,114 \pm 0,08590$ ; Mittel  $\pm$  SEM der korrigierte Zellen  $0,8188 \pm 0,1579$ ), haben sie tendenziell eine leicht erniedrigte Expression gegenüber der Indexpatientin (siehe Abbildung 27).

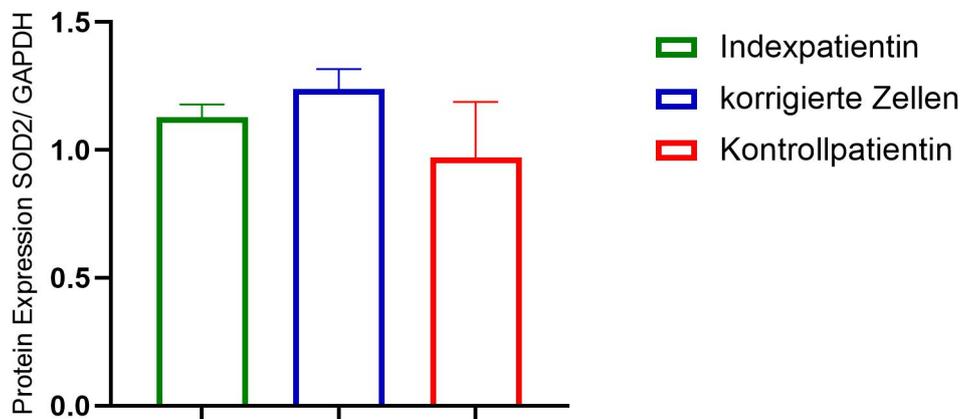


**Abbildung 27:** Expression des GLUT4 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

Die Zellen der Indexpatientin (grüner Balken) haben eine leicht erhöhte Expression des Proteins gegenüber den korrigierten Zellen (blauer Balken) und den Zellen der Kontrollpatientin (roter Balken).

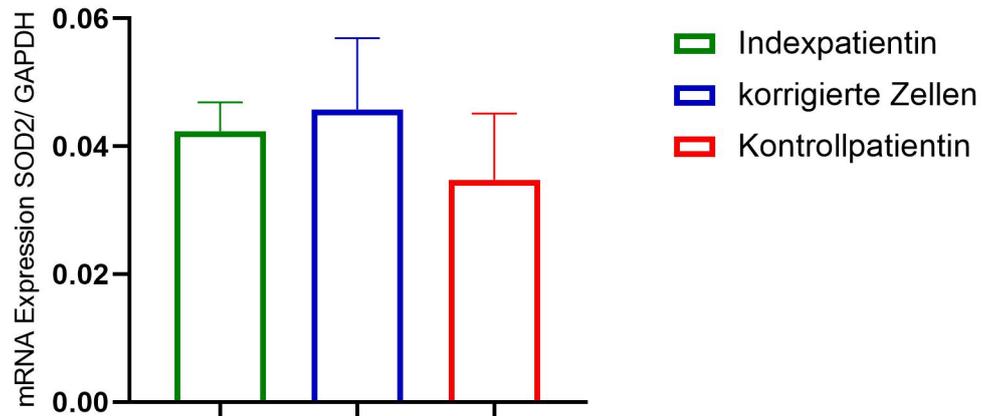
### 3.3.4. Superoxid-Dismutase 2 (SOD2)

Die Messung des Proteins SOD2 und der dazugehörigen mRNA ergeben übereinstimmende Ergebnisse. Die Zellen der Indexpatientin (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $1,128 \pm 0,05081$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $0,04235 \pm 4,522 \times 10^{-3}$ ) und die korrigierten Zellen (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $1,238 \pm 0,07925$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $0,04576 \pm 0,01114$ ) sowie die Zellen der Kontrollpatientin (Mittel  $\pm$  SEM im Western Blot:  $0,9704 \pm 0,218$ ; Mittel  $\pm$  SEM in der qPCR:  $0,03475 \pm 0,01040$ ) weichen kaum voneinander ab in ihrer Expression. (siehe Abbildung 28, Abbildung 29)



**Abbildung 28:** Expression der SOD2 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Das Protein ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel  $\pm$  SEM gezeigt.

Es liegt kein wesentlicher Unterschied in der Expression von SOD2 zwischen der Indexpatientin (grüner Balken), den korrigierten Zellen (blauer Balken) und der Kontrollpatientin (roter Balken) vor.



**Abbildung 29:** Expression der mRNA der SOD2 bei der Indexpatientin verglichen mit den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin. Die mRNA ist genormt auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Daten werden im Mittel +/- SEM gezeigt.

Es liegt kein wesentlicher Unterschied vor in der Expression zwischen der Indexpatientin (grüner Balken), den korrigierten Zellen (blauer Balken) und der Kontrollpatientin (roter Balken).

## 4. Diskussion

### 4.1. Unterschiede der mitochondrialen ROS zwischen den Zelllinien

Die Zellen der an ARVC erkrankten Patientin zeigen im Vergleich zu den korrigierten Zellen und denen der Kontrollpatientin tendenziell höhere Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Abbildung 11). Dies kann man in Verbindung zu den durch ROS ausgelösten Symptomen bringen, welche mit einer symptomatischen ARVC übereinstimmen. Beispielsweise kann oxidativer Stress durch vermehrte Sauerstoffradikale zu Zellschädigung, Apoptose, Inflammation und kontraktile Dysfunktion führen und für Fibrose, Hypertrophie, Herzversagen, Vorhofflimmern und andere kardiale Erkrankungen verantwortlich sein (35). Da die mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies bei den Zellen mit Mutationskorrektur und denen der Kontrollpatientin, tendenziell eher geringer sind, könnte die Bildung der ROS tatsächlich durch das bei der ARVC Patientin defekte PKP2 Gen bedingt sein.

Bei Inkubation der Zellen mit dem Atmungsketten-Entkoppler Antimycin A, welcher die mitochondriale ROS Produktion maximal aktiviert, verhalten sich die Zellen der Zelllinien unterschiedlich (siehe Abbildung 12, Abbildung 14, Abbildung 13). Das mtROS der Indexpatientin und der korrigierten Zellen steigt signifikant unter Behandlung mit Antimycin A verglichen zu den unbehandelten Zellen. Die Zellen der Kontrollpatientin zeigen durch Zugabe von Antimycin A mit 13,2% kaum eine Erhöhung der mitochondrialen ROS (siehe Abbildung 13). Dadurch lassen sich Rückschlüsse ziehen auf die Dynamik der mtROS Produktion in Zellen einer ARVC Patientin verglichen mit den mutationskorrigierten Zellen und den Zellen der Kontrollpatientin.

Ein Ungleichgewicht zwischen den mtROS bildenden und mtROS abhaltenden Enzymen könnte eine Ursache sowohl für die von Grund auf unterschiedliche mtROS Menge (siehe Abbildung 11), als auch für die unterschiedliche Reaktion auf den Atmungskettenentkoppler Antimycin A sein.

Diese veränderte Expression von mit mtROS in Verbindung zu bringenden Enzymen kann durch Mechanismen, die im Folgenden noch genauer erläutert werden, ROS potenzieren hin zu noch mehr ROS. Damit ist das Verhalten der Zellen auf Antimycin A erklärbar. Es ist nicht abschließend geklärt, warum die mtROS in den korrigierten

Zellen mit dem mtROS-Induktor Antimycin A schneller und stärker ansteigen als die Zellen der Indexpatientin (siehe Abbildung 12 und Abbildung 14).

Wichtige Sauerstoffradikal bildende Enzyme sind NADPH-Oxidasen und die Komplexe der Atmungskette. Ein wichtiges Sauerstoffradikal abhaltendes Enzym ist beispielsweise die Superoxiddismutase (SOD). Außerdem spielen Glukose Transporter eine Rolle bei der Bildung von ROS. Ob eine veränderte Ausprägung dieser Enzyme vorliegt, wurde in der Expressionsmessung der dafür kodierenden mRNA durch die real time PCR und durch Proteinmessung im Western Blot untersucht.

#### 4.2. Schutz vor ROS durch das Antioxidans N-Acetyl-Cystein

N-Acetyl-Cystein (NAC) ist ein bekanntes Antioxidans. Es verringert durch NOX produzierte mtROS, stellt das Redox-Verhältnis des Antioxidans Glutathion her und hemmt damit die Apoptose. Es fungiert also als Radikalfänger und erhöht die intrazelluläre antioxidative Kapazität, da es zusätzlich selbst eine Vorstufe des Glutathions ist. (61)

Dieses Prinzip ist auch bei den induzierten Kardiomyozyten nachweisbar. Die Produktion von Sauerstoffradikalen, ausgelöst durch den Atmungskettenentkoppler Antimycin A, wurde mit NAC gehemmt. Dies ist in Abbildung 15 zu erkennen.

Auffallend ist, dass NAC besonders starke Auswirkungen bei den Zellen der Indexpatientin zeigt. Hier sinkt die Fluoreszenz der mtROS nach Inkubation der Zellen, welche mit Antimycin A behandelt wurde, mit NAC signifikant um 41,6%. Bei den korrigierten Zellen sinkt diese um 17,5% und bei den Kontrollzellen um 23,0%.

In den Zellen der Patientin mit ARVC manifestiert sich gemäß der Darstellung in Abbildung 11 tendenziell erhöhte mtROS. Die beobachtete erhöhte Präsenz von mtROS ermöglicht wiederum eine verstärkte Neutralisation durch die antioxidativen Eigenschaften von N-Acetyl-Cystein. Dies unterstreicht die zuvor diskutierte Erkenntnis, dass die Zellen der untersuchten ARVC-Patientin die höchste mitochondriale mtROS Produktion aufweisen.

### 4.3. Einfluss von NADPH-Oxidasen

Die unterschiedliche Expression der NADPH-Oxidasen zwischen den Zelllinien, lässt auf eine mögliche Ursache für das Verhalten der mtROS in den Zellen bei Behandlung mit dem Atmungskettenentkoppler Antimycin A schließen (siehe Abbildung 12, Abbildung 14, Abbildung 13).

#### 4.3.1. NADPH-Oxidase 2 (NOX2)

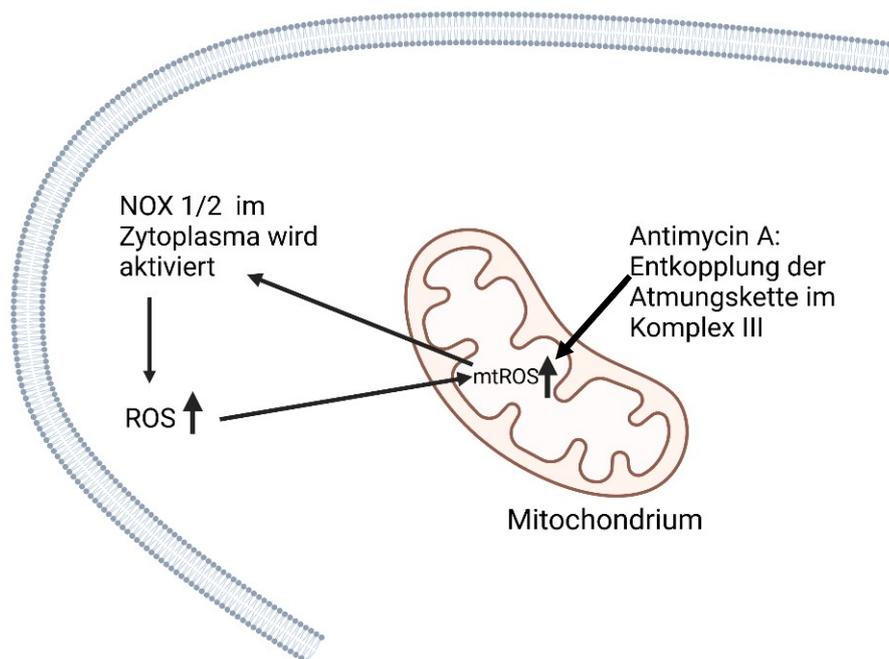
S. Dikalov (2011) zeigte einen Kommunikationsmechanismus zwischen den Mitochondrien und den NADPH Oxidasen im Zytoplasma (NOX1 und 2) auf. Sie beschreibt einen Mechanismus, bei dem durch den Anstieg der  $O_2^-$  Konzentration in den Mitochondrien, die NOX2 im Zytoplasma aktiviert wird und es auch hier zu einer Steigerung von Sauerstoffradikalen kommt. Dies hat wiederum Einfluss auf die ROS Produktion der Mitochondrien. (33)

In Abbildung 18 liegt eine tendenziell vermehrte Expression von NOX2 bei der Indexpatientin und den korrigierten Zellen auf mRNA-Ebene vor. In geringerem Ausmaß ist dies auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 17) besonders bei den korrigierten Zellen erkennbar. Diese Beobachtung könnte das steilere Ansteigen der mitochondrialen Sauerstoffradikale nach Zugabe von Antimycin A (siehe Abbildung 14) erklären: Durch Inkubation der korrigierten Zellen und der Zellen der Indexpatientin mit dem Atmungsketten-Entkoppler Antimycin A, steigen die ROS in den Mitochondrien stark an. Dies hat durch den eben beschriebenen Kommunikationsmechanismus zwischen den Mitochondrien und dem Zytoplasma Auswirkung auf das hier in größeren Mengen vorliegende NOX2 im Zytoplasma. Dort steigen dadurch die Sauerstoffradikale mehr an. Diese lassen wiederum die ROS in den Mitochondrien stärker ansteigen (siehe Abbildung 30).

Die Zellen der Kontrollpatientin exprimieren sowohl auf Protein wie auch auf mRNA Ebene weniger NOX2 als die beiden anderen Zelllinien (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Durch den genannten Mechanismus steigt die mtROS nach Zugabe von Antimycin A bei der Kontrollpatientin folglich weniger an (siehe Abbildung 12, Abbildung 14, Abbildung 13). In Abhängigkeit von der Intensität der Reaktion auf ROS-

induzierende Faktoren lassen sich also Schlussfolgerungen über die Menge von NADPH-Oxidase 2 ziehen. Umgekehrt gilt ebenfalls: Je mehr NOX2, desto ausgeprägter ist die Reaktion auf ROS-auslösende Faktoren.

Auffällig ist weiterhin, dass besonders die Zellen der Kontrollpatientin auf mRNA Ebene wenig NOX2 exprimieren. Dies könnte darauf schließen lassen, dass nicht im PKP2 Gen, sondern in einem anderen Gen, eine Mutation vorliegt, die zu vermehrter NOX2 Expression führt.



**Abbildung 30:** Ausschnitt aus einer schematischen Darstellung eines Kardiomyozyten mit Mitochondrium:

Kommunikationsmechanismus zwischen den Mitochondrien durch von Antimycin A ausgelösten mtROS mit den NADPH-Oxidasen 1 und 2 im Zytoplasma. Dadurch kommt es hier zum ROS Anstieg, welcher wiederum das mitochondriale ROS ansteigen lässt.

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

#### 4.3.2. NADPH-Oxidase 4

Die Ergebnisse in der Abbildung 19 zeigen eine erhöhte Expression des Proteins NOX4 bei den korrigierten Zellen verglichen zu den Zellen der Indexpatientin und der Kontrollpatientin. Trotz der starken Schwankungen der Messungen, sichtbar an den Fehlerbalken der Abbildung, lassen sich beim Western Blot eindeutige Tendenzen erkennen.

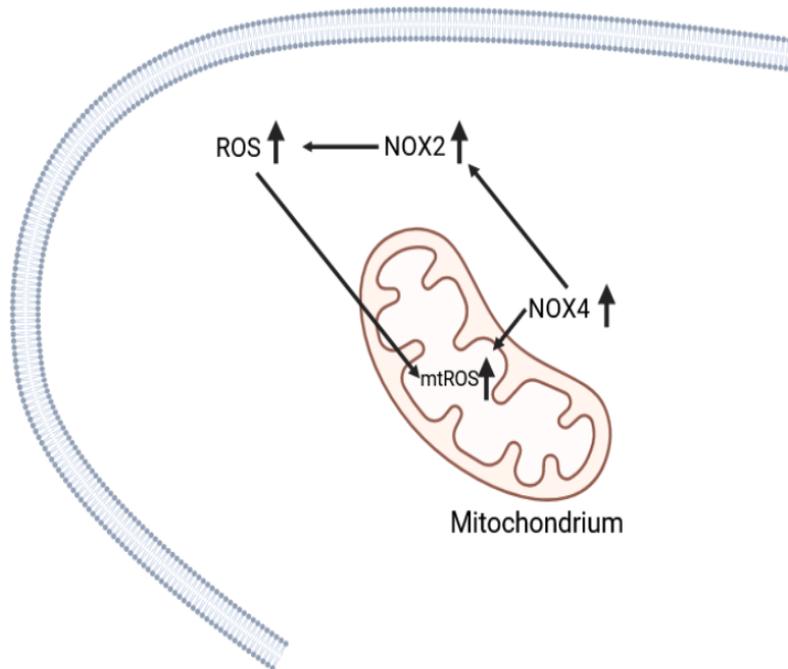
NOX4 liegt unter anderem im Zytoplasma und in den Mitochondrien vor und ist für die Herstellung von  $H_2O_2$  zuständig. Es wird vermutet, dass eine Aktivierung von zytoplasmatischem NOX4 zu einer redox-sensitiven Hochregulierung der mitochondrialen ROS Produktion führt und außerdem NOX2 aktivieren kann. (33)

Um diese Erkenntnisse in Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen zu bringen, muss man einschränkend bedenken, dass  $H_2O_2$  nicht vom verwendeten Fluoreszenz Farbstoff MitoSox™ Red erfasst wird.

Allerdings hat NOX4 indirekt Einfluss auf das mitochondriale Vorliegen von Sauerstoffradikalen durch eben genannte Mechanismen: durch die Aktivierung von NOX2 und durch die redox-sensitive Hochregulierung der mitochondrialen ROS Produktion (siehe Abbildung 31).

Somit könnte man hier, wie schon bei der NADPH-Oxidase 2, das steilere Ansteigen der Sauerstoffradikale bei den korrigierten Zellen erklären (siehe Abbildung 14).

Fraglich bleibt weiterhin, warum NOX4 nur in den korrigierten Zellen vermehrt exprimiert wird und nicht in denen der Indexpatientin ebenfalls. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch die Mutationskorrektur an anderer Stelle dieses ROS-Produzierende Enzym hochreguliert wurde.



**Abbildung 31:** Ausschnitt aus einer schematischen Darstellung eines Kardiomyozyten mit Mitochondrium:

Vermehrtes mtROS durch zytoplasmatische NOX4 Hochregulierung. Ebenso durch eine von NOX4 ausgelöste NOX2 Hochregulierung, welche zu einer Steigerung des ROS im Zytoplasma und dieses wiederum zu einer Steigerung des mtROS beiträgt.

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

#### 4.4. Einfluss durch die Komplexe der Atmungskette

Es sind im Western Blot und in der qPCR keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien den Komplex III der Atmungskette betreffend aufgefallen (siehe Abbildung 23, Abbildung 24). Der Komplex II der Atmungskette (SDHA) hat im Western Blot (siehe Abbildung 20) einen signifikanten Unterschied ergeben zwischen den Zellen der Kontrollpatientin und den anderen beiden Zellreihen. Auch bei der Expressionsanalyse der mRNA durch qPCR (siehe Abbildung 21) ist dieser Trend zu beobachten: Die mRNA und das Protein des zweiten Komplexes der Atmungskette sind bei der Kontrollpatientin deutlich geringer exprimiert.

Von den Komplexen II und III ist bekannt, dass sie an der Produktion der mitochondrialen Sauerstoffradikale beteiligt sind (29). Vor allem, wenn eine Mutation im Komplex II vorliegt, hat diese nach Zhao et al. (2019) eine hohe Kapazität ROS zu produzieren (29). Kommt es zu einem veränderten Auftreten durch eine Mutation in Komplex II, kann das zu einer Vielzahl von klinischen Symptomen führen (62). Redout, Wagner et. al. (2007) beschreibt das vermehrte Auftreten des Komplex II der Atmungskette bei Herzversagen in Kombination mit erhöhtem ROS (63).

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen lässt sich feststellen, dass die gesunde Kontrollpatientin neben einer geringen Expression von Komplex II (siehe Abbildung 20, Abbildung 21) auch die geringsten Mengen an mitochondrialen ROS aufweist (siehe Abbildung 11). Dies legt einen möglichen Zusammenhang zwischen Komplex II und mtROS nahe. Die niedrige Präsenz des zweiten Komplexes der Atmungskette könnte für die geringen mtROS-Mengen verantwortlich sein. Ebenso lässt sich ableiten, dass die Zellen der Indexpatientin und die korrigierten Zellen eine erhöhte Expression von Komplex II der Atmungskette und eine vermehrte Anwesenheit von mtROS aufweisen.

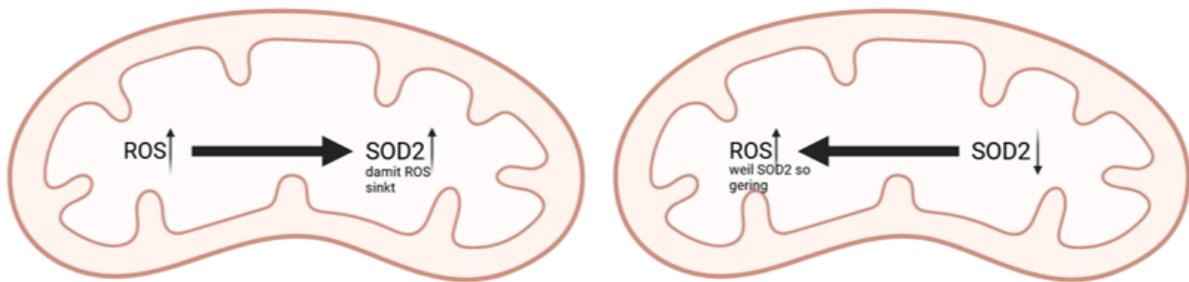
Der Ursprung dieses veränderten Auftretens des Komplex II liegt dabei vermutlich nicht im PKP2 Gen. Allerdings deutet dieses Ergebnis es darauf hin, dass durch einen unbekanntem Mechanismus bei der ARVC Patientin mehr ROS durch Komplex II gebildet wird.

#### 4.5. Einfluss durch die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2)

Die SOD2 ist ein in den Mitochondrien vorliegendes Enzym, das Superoxidradikale in  $H_2O_2$  umwandelt, welches dann durch die Katalase zu Wasser weiterreagiert. Damit trägt es zum oxidativen Gleichgewicht innerhalb der Zelle bei. Ist das Gleichgewicht gestört durch ein defektes oder zu wenig SOD2 in der Zelle kommt es zum Anstieg von ROS (64). Außerdem deutet eine Überexpression von SOD2 auf eine Freisetzung von  $O_2^-$  hin (65). Die Zelle versucht also mit Hilfe dieses  $O_2^-$ -ausgleichenden Enzyms die Sauerstoffradikale zu verringern. Die Superoxiddismutase 2 kann folglich zum

einen die Folge von erhöhtem ROS und zum anderen die Ursache von erhöhtem ROS sein (siehe Abbildung 32). (64,65)

Die Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen, dass alle drei Zellreihen eine vergleichbare Menge an SOD2 exprimieren. In Abbildung 11 wird ersichtlich, dass bei der Indexpatientin tendenziell höhere mtROS-Werte vorliegen als bei den anderen beiden Zellreihen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur Annahme, dass eine geringere Expression von SOD2 mit erhöhten ROS-Werten einhergeht. Auch ist keine deutliche SOD2 Erhöhung bei der Indexpatientin (siehe Abbildung 28, Abbildung 29) zu erkennen trotz erhöhtem ROS (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 32:** Bild einer schematischen Darstellung eines Mitochondriums.

Auf der linken Seite ist zu sehen, dass zuerst ROS erhöht ist und dadurch SOD2 steigt. Auf der rechten Seite wird zuerst zu wenig SOD2 exprimiert und daraufhin steigt ROS.

Abbildung hergestellt mit Hilfe von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Kontrollpatientin eine angemessene Menge von Superoxiddismutase 2 (SOD2) aufweist, was zu einer Reduzierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Im Gegensatz dazu könnte bei der Indexpatientin diese gleiche SOD2 Produktion unzureichend sein, um die Sauerstoffradikale zu neutralisieren, was zu einer anhaltenden Zunahme der ROS führt.

#### 4.6. Einfluss von Glukosetransportern

Eine vermehrte mtROS Produktion, kann man unter anderem durch einen veränderten Glucose Metabolismus erklären. Dieser kann entweder durch einen zu hohen Glukosespiegel oder durch eine vermehrte Expression eines Glukose Transporter auftreten. (36)

##### 4.6.1. SGLT1

Durch eine vermehrte Expression des SGLT1 Transporters wird mehr Natrium in die Zelle transportiert. Damit kommt es über den Natrium-Calcium Austauscher NCX zu einer Steigerung des intrazellulären Calciums. Dies wiederum führt zu reduzierter Kontraktilität, triggert Tachykardie und aktiviert Calcium sensitive Hypertrophie Signalwege. (66) Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration kann außerdem zu oxidativem Stress und damit zu Apoptose führen (67).

Der SGLT1 Transporter wird normalerweise bei einem hohen Glucosespiegel im Körper hochreguliert, um somit mehr Glucose in die Zelle aufnehmen zu können (66). In vorliegenden Ergebnissen haben die Zellen der Indexpatientin und die korrigierten Zellen unabhängig von ihrer Glukose Exposition eine höhere SGLT1 Expression als die Zellen der Kontrollpatientin. Die unterschiedliche Ausprägung dieses Transporters fällt auf Proteinebene und tendenziell auch auf mRNA Ebene auf (siehe Abbildung 25, Abbildung 26).

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass SGLT1 verantwortlich gemacht werden könnte für die eben genannten Symptome, welche durch den veränderten Calciumhaushalt erklärbar sind und welche zum Krankheitsbild der ARVC passen. Auch die erhöhten mitochondrialen Sauerstoffradikale in den Zellen der Indexpatientin (siehe Abbildung 11) kann man mit der vermehrten intrazellulären Calciumkonzentration erklären, welche die SGLT1 Überexpression hervorruft.

Die Mutationskorrektur des PKP2 Gens hat keinen Unterschied auf die SGLT1 Expression der korrigierten Zellen verglichen zu den Indexzellen gezeigt. Daher hat in diesem Fall die PKP2 Mutation vermutlich keinen Einfluss auf die SGLT1 Expression.

#### 4.6.2. GLUT4

Der GLUT4 wird vermehrt von den Kardiomyozyten bei einem hohen Insulinspiegel und bei mechanischer Arbeit exprimiert. Er ist somit ein wichtiger Regulator der Glukoseaufnahme in die Zellen. (46,47)

Bowman, Smith et. al. 2019 hat die Glukose Transporter 1 und 4 in iPSC-CM unter Insulin Einfluss untersucht und festgestellt, dass sich GLUT 4 nicht durch Insulin hoch regulieren lässt. (68) Somit muss man die Aussagekraft der Glukosetransporter bei iPSC kritisch betrachten. Es ist noch nicht abschließend geklärt, wie genau die Expression der Glukosetransporter reguliert wird und welche Auswirkungen diese hat.

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden die verschiedenen Zellreihen keinen unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt, welche einen gesteigerten Stoffwechsel bedürfen, und unter denselben Grundbedingungen mit denselben Nährmedien behandelt. Daher kann man davon ausgehen, dass die Expression dieses Proteins unabhängig von den äußeren Bedingungen auftritt.

Glukose induzierte Sauerstoffradikale werden gebildet durch ein Elektronen Leck in der Atmungskette. Dieses kommt zustande, indem durch das vermehrte Vorliegen von Glukose mehr Reduktionsäquivalente (NADH und FADH<sub>2</sub>) gebildet werden, welche wiederum mehr Elektronen an die Atmungskette abgeben. Dadurch wird ein kritischer Schwellenwert des Elektronengradienten der inneren Mitochondrienmembran erreicht. Dieser führt dazu, dass die Elektronen in Komplex III der Atmungskette nicht mehr weitergereicht werden können und an O<sub>2</sub> abgegeben werden, wodurch O<sub>2</sub><sup>-</sup> entsteht. (69)

In Abbildung 27 erkennt man, dass die Expression des Proteins GLUT4 bei den Indexzellen im Mittel tendenziell erhöht ist, gegenüber denen der korrigierten Zellen und der Kontrollpatientin. Die Zellen nehmen also mehr Glucose auf, wodurch es zu Glucose induzierten oxidativem Stress kommen kann (36,69). Dies deckt sich wiederum mit den Ergebnissen, dass die Zellen der ARVC Patientin vermehrt mtROS produzieren (siehe Abbildung 11).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Zellen einer ARVC Patientin mit denen einer gesunden Kontrollpatientin und mit mutationskorrigierten Zellen der ARVC Patientin in Hinblick auf die Produktion von mitochondrialen Sauerstoffradikalen verglichen. Mit Hilfe der hiPSC-CM wurden Unterschiede zwischen den Zelllinien herausgearbeitet und mögliche Begründungen der veränderten mtROS Produktion geklärt. Dabei zeigte sich eine tendenziell erhöhte Bildung von mtROS bei der ARVC-Patientin.

Da die Bildung von Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien komplex ist, lies sich diese Beobachtung nicht klar auf eine oder mehrere Ursachen beschränken. Es wurden wichtige mtROS bildende und antioxidative Proteine in den Zelllinien vergleichend untersucht.

Ursachen für die Unterschiede der mitochondrialen Sauerstoffradikalbildung zwischen den Zelllinien konnten in vorliegender Dissertationsarbeit herausgearbeitet werden. Zum einen konnte der Atmungskettenkomplex II als möglicher mtROS-Bildner bei der ARVC Patientin aufgedeckt werden. Auch haben die Unterschiede in der Ausprägung der Glukosetransporter SGLT1 und GLUT4 sowie des Antioxidans SOD2 mögliche Ursachen in der vermehrten mtROS Produktion der ARVC Zelllinien aufgebracht. Außerdem kann die Expression der NADPH Oxdasen 2 und 4 das unterschiedliche Verhalten der Zellen in Stresssituationen klären.

Die Zellen mit Mutationskorrektur zeigen keine Unterschiede zu den Zellen der Indexpatientin in Bezug auf die mtROS-bildenden Proteine NOX4, Komplex II und SGLT1. Man kann also davon ausgehen, dass die Ursache für erhöhte Sauerstoffradikale, die auf diese Enzyme zurückzuführen sind, eher nicht auf dem PKP2 Gen liegt.

## 6. Ausblick

Nach der zeitaufwendigen und erfolgreichen Etablierung der Methoden stehen nun alle Mittel bereit, um die Signalwege im Detail zu untersuchen. Diese müssen in Folgeprojekten genau betrachtet werden. Dazu gehört die Erhöhung der n-Zahl, um die teils feinen Unterschiede herauszuarbeiten. Weiterhin müssen funktionelle Untersuchungen folgen, die die Auswirkungen auf die Funktionsweise der Zellen analysieren. Da hier aber auch gezeigt wurde, dass die PKP2 Mutation nicht für alle Veränderungen verantwortlich sein kann, müssen in der Folge auch weitere potenzielle Mutationen untersucht werden.

## 7. Referenzen

1. Corrado D, Link MS, Calkins H. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2017;376(1):61–72. doi:10.1056/NEJMra1509267 Cited in: PubMed; PMID 28052233.
2. Cho Y. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Arrhythm.* 2018;34(4):356–68. doi:10.1002/joa3.12012 Cited in: PubMed; PMID 30167006.
3. Mattesi G, Zorzi A, Corrado D, Cipriani A. Natural History of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *J Clin Med.* 2020;9(3). doi:10.3390/jcm9030878 Cited in: PubMed; PMID 32210158.
4. Romero J, Mejia-Lopez E, Manrique C, Lucariello R. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clin Med Insights Cardiol.* 2013;797–114. doi:10.4137/CMC.S10940 Cited in: PubMed; PMID 23761986.
5. Basso C, Bauce B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 2011;9(4):223–33. doi:10.1038/nrcardio.2011.173 Cited in: PubMed; PMID 22124316.
6. Cristina Basso, Domenico Corrado, Frank I Marcus, Andrea Nava, Gaetano Thiene. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet.* 2009;373(9671):1289–300. doi:10.1016/S0140-6736(09)60256-7 Cited in: PubMed; PMID 19362677.
7. Elias Neto J, Tonet J, Frank R, Fontaine G. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D) - What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. *Arq. Bras. Cardiol.* 2019;112(1):91–103. doi:10.5935/abc.20180266 Cited in: PubMed; PMID 30673021.
8. Cerrone M, Montnach J, Lin X, Zhao Y-T, Zhang M, Agullo-Pascual E, Leo-Macias A, Alvarado FJ, Dolgalev I, Karathanos TV, Malkani K, van Opbergen CJM, van Bavel JJA, Yang H-Q, Vasquez C, Tester D, Fowler S, Liang F, Rothenberg E, Heguy A, Morley GE, Coetzee WA, Trayanova NA, Ackerman MJ, van Veen TAB, Valdivia HH, Delmar M. Plakophilin-2 is required for transcription

- of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm. *Nat Commun.* 2017;8(1):106. doi:10.1038/s41467-017-00127-0 Cited in: PubMed; PMID 28740174.
9. Paul M, Wichter T, Gerss J, Arps V, Schulze-Bahr E, Robenek H, Breithardt G, Weissen-Plenz G. Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013;111(10):1488–95. doi:10.1016/j.amjcard.2013.01.299 Cited in: PubMed; PMID 23465095.
  10. Sen-Chowdhry S, Morgan RD, Chambers JC, McKenna WJ. Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med.* 2010;61:233–53. doi:10.1146/annurev.med.052208.130419 Cited in: PubMed; PMID 20059337.
  11. Thiene G, Corrado D, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;245. doi:10.1186/1750-1172-2-45 Cited in: PubMed; PMID 18001465.
  12. Steinmetz M, Krause U, Lauerer P, Konietschke F, Aguayo R, Ritter CO, Schuster A, Lotz J, Paul T, Staab W. Diagnosing ARVC in Pediatric Patients Applying the Revised Task Force Criteria: Importance of Imaging, 12-Lead ECG, and Genetics. *Pediatr Cardiol.* 2018;39(6):1156–64. doi:10.1007/s00246-018-1875-y Cited in: PubMed; PMID 29754204.
  13. Iqbal M, Kamarullah W, Achmad C, Karwiky G, Akbar MR. The pivotal role of compelling high-risk electrocardiographic markers in prediction of ventricular arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis. *Curr Probl Cardiol.* 2024;49(2):102241. doi:10.1016/j.cpcardiol.2023.102241 Cited in: PubMed; PMID 38040211.
  14. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MGPJ, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DMY, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation.* 2010;121(13):1533–41.

- doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.840827 Cited in: PubMed; PMID 20172911.
15. Corrado D, Wichter T, Link MS, Hauer RNW, Marchlinski FE, Anastasakis A, Bauce B, Basso C, Brunckhorst C, Tsatsopoulou A, Tandri H, Paul M, Schmied C, Pelliccia A, Duru F, Protonotarios N, Estes NM, McKenna WJ, Thiene G, Marcus FI, Calkins H. Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation*. 2015;132(5):441–53. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017944 Cited in: PubMed; PMID 26216213.
  16. Al-Aidarous S, Protonotarios A, Elliott PM, Lambiase PD. Management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart*. 2024;110(3):156–62. doi:10.1136/heartjnl-2023-322612 Cited in: PubMed; PMID 37433658.
  17. Zareba W, Tichnell C, Rosero SZ, Cerrone M, Zipse MM, Marchlinski FE, Sun AY, Indik JH, James CA, Mestroni L, Cutter K, Peterson DR, McNitt S, Polonsky B, Daubert JP, Haigney MC, Needleman M, Oakes D, Delmar M, Calkins H. CE-452779-3 RANDOMIZED PLACEBO-CONTROLLED TRIAL OF FLECAINIDE IN PATIENTS WITH ARRHYTHMOGENIC RIGHT VENTRICULAR CARDIOMYOPATHY. *Heart Rhythm*. 2023;20(5):S24. doi:10.1016/j.hrthm.2023.03.246
  18. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115(3):500–8. doi:10.1172/JCI24408 Cited in: PubMed; PMID 15765131.
  19. Paul Held. An Introduction to Reactive Oxygen Species: Measurement of ROS in Cells [Internet]. 2010 [updated 2010; cited 2022 Feb 16]; [21 p.]. Available from: [https://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/ROS%20White%20Paper.pdf](https://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS%20White%20Paper.pdf)
  20. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909–50. doi:10.1152/physrev.00026.2013 Cited in: PubMed; PMID 24987008.
  21. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:395–418. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938 Cited in: PubMed; PMID 14527285.

22. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(7):777–93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003 Cited in: PubMed; PMID 21236334.
23. Moris D, Spartalis M, Tzatzaki E, Spartalis E, Karachaliou G-S, Triantafyllis AS, Karaolanis GI, Tsilimigras DI, Theocharis S. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann Transl Med.* 2017;5(16):324. doi:10.21037/atm.2017.06.17 Cited in: PubMed; PMID 28861421.
24. Martín-Fernández B, Gredilla R. Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age (Dordr).* 2016;38(4):225–38. doi:10.1007/s11357-016-9933-y Cited in: PubMed; PMID 27449187.
25. Okonko DO, Shah AM. Heart failure: mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(1):6–8. doi:10.1038/nrcardio.2014.189 Cited in: PubMed; PMID 25421167.
26. Stowe DF, Camara AKS. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(6):1373–414. doi:10.1089/ars.2008.2331 Cited in: PubMed; PMID 19187004.
27. Schubert S. *Biochemie*. 2nd ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer · Stuttgart; 2021. (utb basics). deutsch.
28. Akhigbe R, Ajayi A. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids Health Dis.* 2021;20(1):23. doi:10.1186/s12944-021-01435-7 Cited in: PubMed; PMID 33639960.
29. Zhao R-Z, Jiang S, Zhang L, Yu Z-B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3–15. doi:10.3892/ijmm.2019.4188
30. Müller-Esterl W. *Biochemie: Oxidative Phosphorylierung - Elektronentransport und ATP-Synthese*. Deutschland: Springer-Verlag GmbH; 2018. deutsch.
31. Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC de, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):333–43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004 Cited in: PubMed; PMID 19427899.

32. Augsburger F, Filippova A, Rasti D, Seredenina T, Lam M, Maghzal G, Mahiout Z, Jansen-Dürr P, Knaus UG, Doroshov J, Stocker R, Krause K-H, Jaquet V. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. *Redox Biol.* 2019;26:101272. doi:10.1016/j.redox.2019.101272 Cited in: PubMed; PMID 31330481.
33. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1289–301. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033 Cited in: PubMed; PMID 21777669.
34. Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, Zablocki D, Ohishi M, Sadoshima J. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:116–22. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.019 Cited in: PubMed; PMID 25305175.
35. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, Laviola L, Giorgino F. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:5732956. doi:10.1155/2020/5732956 Cited in: PubMed; PMID 32509147.
36. Shah MS, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res.* 2016;118(11):1808–29. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306923 Cited in: PubMed; PMID 27230643.
37. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183–97. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008 Cited in: PubMed; PMID 26233704.
38. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, Del Monte F, Tian R. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res.* 2010;106(9):1541–8. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.212753 Cited in: PubMed; PMID 20339121.
39. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ*

- Res. 2001;88(5):529–35. doi:10.1161/01.res.88.5.529 Cited in: PubMed; PMID 11249877.
40. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3716–26. doi:10.1172/JCI120849 Cited in: PubMed; PMID 30124471.
  41. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*. 2003;93(4):292–301. doi:10.1161/01.RES.0000087542.26971.D4 Cited in: PubMed; PMID 12933700.
  42. Michael J. Mihm, PhD, Fushun Yu, PhD, Cynthia A. Carnes, PharmD, PhD, Peter J. Reiser, PhD, Patrick M. McCarthy, MD, David R. Van Wagoner, PhD, and John Anthony Bauer, PhD. Impaired Myofibrillar Energetics and Oxidative Injury During Human Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2001;104(2):174–80. doi:10.1161/01.cir.104.2.174 Cited in: PubMed; PMID 11447082.
  43. Deussen A. Herzstoffwechsel und Koronardurchblutung. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 211–9.
  44. Sabbah HN. Targeting the Mitochondria in Heart Failure: A Translational Perspective. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(1):88–106. doi:10.1016/j.jacbts.2019.07.009 Cited in: PubMed; PMID 32043022.
  45. Chen Z, Liu M, Li L, Chen L. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2839–49. doi:10.1002/jcp.25998 Cited in: PubMed; PMID 28488732.
  46. Banerjee SK, McGaffin KR, Pastor-Soler NM, Ahmad F. SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovasc Res*. 2009;84(1):111–8. doi:10.1093/cvr/cvp190 Cited in: PubMed; PMID 19509029.
  47. Shao D, Tian R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr Physiol*. 2015;6(1):331–51. doi:10.1002/cphy.c150016 Cited in: PubMed; PMID 26756635.
  48. Hecker PA, Lionetti V, Ribeiro RF, Rastogi S, Brown BH, O'Connell KA, Cox JW, Shekar KC, Gamble DM, Sabbah HN, Leopold JA, Gupte SA, Recchia FA,

- Stanley WC. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency increases redox stress and moderately accelerates the development of heart failure. *Circ Heart Fail.* 2013;6(1):118–26. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969576 Cited in: PubMed; PMID 23170010.
49. Chin KL, Ofori-Asenso R, Hopper I, Lueder TG v., Reid CM, Zoungas S, Wang BH, Liew D. Potential mechanisms underlying the cardiovascular benefits of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors: a systematic review of data from preclinical studies. *Cardiovasc Res.* 2019;115(2):266–76. doi:10.1093/cvr/cvy295 Cited in: PubMed; PMID 30475996.
50. Papakitsou I, Vougiouklakis G, Elisaf MS, Filippatos TD. Differential pharmacology and clinical utility of dapagliflozin in type 2 diabetes. *Clin Pharmacol.* 2019;11133–43. doi:10.2147/CPAA.S172353 Cited in: PubMed; PMID 31572020.
51. Bertero E, Prates Roma L, Ameri P, Maack C. Cardiac effects of SGLT2 inhibitors: the sodium hypothesis. *Cardiovasc Res.* 2018;114(1):12–8. doi:10.1093/cvr/cvx149 Cited in: PubMed; PMID 29016751.
52. MitoSox Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging [Internet] [cited 2022 Mar 21]; [3 p.]. Available from: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp36008.pdf>
53. Konfokalmikroskop [Internet] [cited 2022 Mar 10]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop>
54. Stefan Wilhelm, Bernhard Gröber, Martin Gluch, Hartmut Meinz. Confocal Laser Scanning Microscopy [Internet] [cited 2022 Mar 10]. Available from: <https://zeiss.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf>
55. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J.* 2004;86(6):3993–4003. doi:10.1529/biophysj.103.038422 Cited in: PubMed; PMID 15189895.

56. Colocalization Analysis [Internet] [cited 2022 Mar 18]. Available from: <https://imagej.net/imaging/colocalization-analysis>
57. Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(4):C723-42. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010 Cited in: PubMed; PMID 21209361.
58. E.M.M Manders. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*. 1993;(169).
59. Essentials of Real Time PCR [Internet] [cited 2022 Mar 10]. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf>
60. Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME, Stark K, Jentsch N, Klingenstein M, Drzymalski M, Wagner S, Maier LS, Hehr U, Baessler A, Fischer M, Hengstenberg C. Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126596. doi:10.1371/journal.pone.0126596 Cited in: PubMed; PMID 25970162.
61. Peng Y-W, Buller CL, Charpie JR. Impact of N-acetylcysteine on neonatal cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury. *Pediatr Res*. 2011;70(1):61–6. doi:10.1203/PDR.0b013e31821b1a92 Cited in: PubMed; PMID 21427628.
62. Hoekstra AS, Bayley J-P. The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(5):543–51. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.005 Cited in: PubMed; PMID 23174333.
63. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJP, van Hardeveld C, Paulus WJ, Simonides WS. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):770–81. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.012 Cited in: PubMed; PMID 17582388.

64. Almomani R, Herkert JC, Posafalvi A, Post JG, Boven LG, van der Zwaag PA, Willems PHGM, van Veen-Hof IH, Verhagen JMA, Wessels MW, Nikkels PGJ, Wintjes LT, van den Berg MP, Sinke RJ, Rodenburg RJ, Niezen-Koning KE, van Tintelen JP, Jongbloed JDH. Homozygous damaging SOD2 variant causes lethal neonatal dilated cardiomyopathy. *J Med Genet.* 2020;57(1):23–30. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106330 Cited in: PubMed; PMID 31494578.
65. Sundqvist M, Christenson K, Björnsdóttir H, Osla V, Karlsson A, Dahlgren C, Speert DP, Fasth A, Brown KL, Bylund J. Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Redox Imbalance in Human NADPH-Oxidase-Deficient Phagocytes. *Front Immunol.* 2017;8:1828. doi:10.3389/fimmu.2017.01828 Cited in: PubMed; PMID 29375548.
66. Ng K-M, Lau Y-M, Dhandhanian V, Cai Z-J, Lee Y-K, Lai W-H, Tse H-F, Siu C-W. Empagliflozin Ameliorates High Glucose Induced-Cardiac Dysfunction in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):14872. doi:10.1038/s41598-018-33293-2 Cited in: PubMed; PMID 30291295.
67. Kumar S, Kain V, Sitasawad SL. High glucose-induced Ca<sup>2+</sup> overload and oxidative stress contribute to apoptosis of cardiac cells through mitochondrial dependent and independent pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):907–20. doi:10.1016/j.bbagen.2012.02.010 Cited in: PubMed; PMID 22402252.
68. Bowman PRT, Smith GL, Gould GW. GLUT4 expression and glucose transport in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS ONE.* 2019;14(7):e0217885. doi:10.1371/journal.pone.0217885 Cited in: PubMed; PMID 31344028.
69. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615–25. doi:10.2337/diabetes.54.6.1615 Cited in: PubMed; PMID 15919781.

## 8. Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bedanken...

... bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lars Maier für das Überlassen dieses interessanten und aktuellen Dissertationsthemas sowie für die Begutachtung dieser Promotionsarbeit.

... bei Dr. Karin Hammer, dass ich Teil dieses Projekts sein konnte und die vielen Methoden erlernen durfte und für ihren geduldigen und hilfsbereiten Umgang mit mir, ihre Erreichbarkeit und ihre Unterstützung.

... bei dem gesamten Labor Team und besonders bei Teresa Hainz für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Einsatz für mich und diese Arbeit.

... bei der deutschen Herzstiftung, die mich im Rahmen des Kaltenbachstipendiums gefördert haben, wodurch ich mit voller Energie und Konzentration diese Dissertation beenden konnte.

... bei meinen Freunden und Verwandten, die mir den Rücken freigehalten haben, mir Motivation und Zuversicht gegeben und mich mit ihrem Verständnis und Rücksichtnahme unterstützt haben.