

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Untersuchung der Auswirkungen einer hypertrophen Kardiomyopathie  
auf die aktive Kraftentwicklung isolierter Papillarmuskelpräparate nach  
transientem Verschluss der linken vorderen Herzkranzarterie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Yeşim Özçelik

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Meinen Eltern und meinem Bruder

in Liebe und Dankbarkeit

## Zusammenfassung

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste genetische Herzerkrankung, charakterisiert durch eine langsam progrediente linksventrikuläre Hypertrophie und interstitielle Fibrose des Myokards. Auslöser sind meist Mutationen von Sarkomerproteinen, die autosomal-dominant vererbt werden. Sie ist die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes junger Menschen und erhöht das Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss regionale Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Kraftentwicklung im nicht-ischämischen Myokard (*remote* Myokard) der genetisch vorbelasteten Herzmuskulatur hat. Das *remote* Myokard muss den Funktionsverlust des infarzierten Myokards kompensieren, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu gewährleisten.

Um die Auswirkungen der HCM auf das *remote* Myokard zu untersuchen, wurden zwei *knock-in* Mausmodelle mit humanen Mutationen im *Myh6*-Gen (R719W und R453C) verwendet. 24 Stunden nach operativer Induktion einer einstündigen regionalen Ischämie wurde mithilfe eines Organbads die aktive Kraftentwicklung der linksventrikulären hinteren Papillarmuskeln, die überwiegend dem *remote* Myokard zugehörig sind, unter elektrischer Stimulation (1 Hz) gemessen. Zur Ermittlung der Kraftreserve wurden die Muskelpräparate schrittweise mit steigenden Konzentrationen des beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin oder mit Steigerung der Vorspannung der Muskeln im Organbad stimuliert.

Bei 1 mN Vorspannung zeigte sich 24 Stunden nach I/R in allen Gruppen eine basal tendenziell geringere Kraftentwicklung des *remote* Myokards im Vergleich zu Papillarmuskeln scheinoperierter Mäuse. Unter Isoprenalin Stimulation waren in den HCM-Modellen die Beeinträchtigungen der Kraftentwicklung sowie der Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls im *remote* Myokard geringer als bei Wildtypen. Des Weiteren war bei den HCM-mutierten Mäusen, insbesondere bei den R453C *knock-in* Mäusen, für Isoprenalin die halbmaximale effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) niedriger. Eine Steigerung der Vorspannung ergab dagegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die maximale Kraftentwicklung bestand unter einer Vorspannung von 2 mN.

Zusammenfassend ist 24 Stunden nach I/R der Trend einer reduzierten Kraftgenerierung des *remote* Myokards in Mäusen aller Genotypen festzustellen. Unter zusätzlichem Isoprenalin-Stress ist die Kompensation bei den HCM-Modellen sogar besser, was für mehr Kraftreserven während der Kontraktion und Relaxation im *remote* Myokard spricht. Zudem reagierten die HCM-Mäuse sensitiver auf die Isoprenalin-Stimulation. Dagegen wurde eine gesteigerte Vorspannung vom *remote* Myokard mit und ohne HCM ähnlich gut kompensiert.

## Summary

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most frequent genetic cardiac disorder, characterized by slowly progressive left ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis of the myocardium. HCM is caused by mutations of sarcomere proteins that are inherited in an autosomal dominant trait. It is the most common cause of sudden cardiac death in young people and increases the risk of heart failure. The present work analyzed the consequences of regional myocardial ischemia and reperfusion (I/R) on the force generation of the non-ischemic myocardium (remote myocardium) of HCM hearts. The remote myocardium must compensate for the loss of function in the infarct zone in order to maintain sufficient cardiac output.

To investigate the effects of HCM on the remote myocardium, two knock-in mouse models with human mutations in the *Myh6* gene (R719W und R453C) were used. 24 hours after surgical induction of one hour of regional ischemia, the active force generation of the left ventricular papillary muscles, which predominantly comprise remote myocardium, was measured under electrical stimulation (1 Hz) using an organ bath apparatus. To determine the force generating capacities, the papillary muscles were gradually stimulated with increasing concentrations of the beta-adrenergic isoprenaline or by increasing the pretension of the muscles in the organ bath.

At 1 mN pretension, 24 hours after I/R all study groups showed lower force development in the remote myocardium by trend under basal conditions compared to sham-operated mice and a significant reduction. The impairment in the remote myocardium of the HCM models upon isoprenaline stimulation was lower compared to wildtypes, both for the maximum developed force and for the velocities of force increase and force decrease. Furthermore, the half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) of isoprenaline was lower in the HCM mutants, especially in the R453C knock-in mice. An increase in muscle pretension however showed no differences between groups. Maximum force generation was achieved at 2 mN pretension.

In summary, 24 hours after I/R force generation of the remote myocardium is reduced by trend in mice of all genotypes. Under additional isoprenaline stress, force generation is better in the HCM models, suggesting higher power reserves during contraction and relaxation in the remote myocardium. In addition, the HCM mice reacted more sensitive to isoprenaline stimulation. In contrast, increased pretension led to comparable stress compensation by remote myocardium with and without HCM causing mutations.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse; engl.: <i>Analysis of Variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DdH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser (Millipore-Wasser)
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
engl.	englisch
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
Hz	Hertz
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator, engl.: <i>Cardioverter-Defibrillator</i>
iPSC-CMs	aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten
I/R	Ischämie/Reperfusion
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LAD	linke vordere Koronararterie, engl.: <i>left anterior descending</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LVOT	linksventrikulärer Ausflusstrakt, engl.: <i>left ventricular outflow tract</i>
LVOTO	linksventrikuläre Ausflusstraktobstruktion, engl.: <i>left ventricular outflow tract obstruction</i>
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	schwere Kette des Myosins, engl.: <i>myosin heavy chain</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimol
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mN	Millinewton
MRT	Magnetresonanztomographie
MYBPC3	<i>Myosin-binding protein C3</i>
Myh6	<i>myosin heavy chain 6</i>
MYH7	<i>myosin heavy chain 7</i>
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
nM	Nanomol
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt, engl.: <i>non-ST-segment elevation myocardial infarction</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P	Phosphat
PCI	Perkutane Koronarintervention
RC/+	Arginin 453 Cystein Punktmutation (R453C) im <i>Myh6</i> Gen
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RW/+	Arginin 719 Tryptophan Punktmutation (R719W) im <i>Myh6</i> Gen
s	Sekunde
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STEMI	ST-Hebungsinfarkt, engl.: <i>ST-segment elevation myocardial infarction</i>
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TRP-Kanal	<i>transient receptor potential channel</i>
V <sub>max</sub>	Maximale Geschwindigkeit
V <sub>min</sub>	Minimale Geschwindigkeit
Wt	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie .....	1
1.1.1 Genetik der HCM .....	1
1.1.2 R453C und R719W Mutationen als Ursachen einer HCM .....	2
1.1.3 Klinik und Diagnostik der HCM .....	2
1.1.4 Therapie und Prävention der HCM .....	3
1.2 Das Sarkomer .....	4
1.2.1 Aufbau des Sarkomers .....	4
1.2.2 Kontraktionszyklus .....	5
1.3 Akuter Myokardinfarkt .....	6
1.3.1 Ischämisches Myokard und <i>remote</i> Myokard .....	7
1.3.2 Remodeling nach Myokardinfarkt .....	9
1.3.3 HCM und akuter Myokardinfarkt als Komorbiditäten .....	9
1.4 Tierversuchsmodelle des Myokardinfarktes .....	10
1.4.1 Permanente Ligatur .....	10
1.4.2 Ischämie/Reperfusion bei offenem Thorax .....	10
1.4.3 Ischämie/Reperfusion bei geschlossenem Thorax .....	11
1.5 Das Organbad .....	11
1.5.1 Beta-adrenerge Stimulation .....	12
1.5.2 Frank-Starling-Mechanismus .....	13
1.6 Fragestellung .....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Versuchstiere .....	15
2.2. Ischämie und Reperfusion .....	15
2.2.1 Voroperation .....	16
2.2.2 Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax .....	17
2.3 Organbad .....	19
2.3.1 Vorbereitung der Nährlösung .....	19
2.3.2 Isolation des Papillarmuskels .....	20
2.3.3 Aufbau des Organbads .....	24
2.3.4 Kontraktilitätsmessungen .....	25
2.3.4.1 Kontraktilitätsmessungen unter Einfluss von Isoprenalin .....	26

2.3.4.2 Kontraktilitätsmessungen unter Steigerung der Vorspannung .....	27
2.4 Normierung der Messwerte.....	27
2.5 Ausschlusskriterium.....	28
2.6 Auswertung und Statistik.....	29
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Kraftmessungen unter Basalbedingungen.....	31
3.2 Aktive Kraftentwicklung unter Stimulation mit Isoprenalin .....	33
3.2.1 Kraftentwicklung der Wildtypen unter Isoprenalin.....	33
3.2.2 Kraftentwicklung der RC/+ Mutanten unter Isoprenalin.....	35
3.2.3 Kraftentwicklung der RW/+ Mutanten unter Isoprenalin.....	38
3.2.4 Vergleich der Beeinträchtigung der Kraftentwicklung nach Ischämie und Reperfusion zwischen den Mausmodellen.....	41
3.2.5 Vergleich der EC <sub>50</sub> der Mausmodelle.....	44
3.3 Aktive Kraftentwicklung unter Steigerung der Vorspannung .....	46
3.3.1 Kraftentwicklung der Wildtypen unter Steigerung der Vorspannung.....	46
3.3.2 Kraftentwicklung der RC/+ Mutanten unter Steigerung der Vorspannung.....	48
3.3.3 Kraftentwicklung der RW/+ Mutanten unter Steigerung der Vorspannung.....	50
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>52</b>
4.1 Kraftentwicklung des <i>remote</i> Myokards unter beta-adrenerger Stimulation.....	52
4.2 Einfluss von HCM auf die Kraftentwicklung des <i>remote</i> Myokards unter beta-adrenerger Stimulation.....	54
4.2.1 Diastolische Dysfunktion .....	55
4.2.2 Ca <sup>2+</sup> -Kinetik.....	56
4.2.3 ATPase-Aktivität und ATP-Verbrauch .....	57
4.3 Einfluss von HCM auf die Kraftentwicklung und den Frank-Starling-Mechanismus.....	58
4.4 Limitationen der Arbeit.....	59
4.5 Schlussfolgerungen .....	60
4.6 Ausblick .....	60
<b>5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>62</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (englisch: *hypertrophic cardiomyopathy*; HCM) ist eine häufige hereditäre Herzmuskelerkrankung und die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes von jungen Menschen, insbesondere von jungen Leistungssportlern [1]. Vor etwa 60 Jahren, erstmals durch Braunwald et al. unter dem Namen „idiopathische hypertrophe subaortale Stenose“ beschrieben, wurde eine idiopathische Genese angenommen [2]. Heute ist bekannt, dass Mutationen in Proteinen des Sarkomers häufig Ursache sind [3]. Insbesondere in den letzten 30 Jahren ist die Forschung über die HCM stark vorangeschritten.

Die HCM ist gekennzeichnet durch eine meist asymmetrische, linksventrikuläre Hypertrophie mit überwiegender Beteiligung des Ventrikelseptums [4]. Histopathologisch zeigt sich eine gestörte Anordnung der Myozyten, eine Myozytenvergrößerung sowie myokardiale Fibrose [4, 5].

Die Erkrankung ist weltweit verbreitet mit einer Prävalenz von 1:500 [6, 7]. Weiterhin wird eine hohe Zahl an unbekanntem Fällen angenommen, da die Bestimmung der Prävalenz auf echokardiographischen Daten beruht [7] und Familienmitglieder der Betroffenen mit positivem Genotyp und (bisher) unauffälligem Phänotyp dabei nicht erfasst wurden. Werden diese Genträger berücksichtigt, so ist sogar von einer Prävalenz von etwa 1:200 auszugehen [8].

### 1.1.1 Genetik der HCM

HCM wird meist autosomal-dominant vererbt [9]. Seidman und Seidman haben 1990 die erste Mutation, R403Q im MYH7-Gen, entdeckt. Dieses kodiert die schweren Ketten des beta-Myosins (beta-MHC) [10]. Inzwischen sind mehr als 2000 unterschiedliche Mutationen in mindestens 11 Genen, die für verschiedene Proteine des Sarkomers kodieren, bekannt [11]. Zumeist handelt es sich um eine *Missense*-Mutation, d.h. eine Punktmutation, in der der Austausch einer Aminosäure zu einem Protein mit potenziell veränderter Funktion oder Struktur führt. In mindestens 40 % aller Fälle sind das MYH7-Gen oder das MYBPC3-Gen betroffen [12]. Letzteres kodiert das Sarkomerprotein Myosin-Bindungsprotein C.

Genvarianten, die mit linksventrikulärer Hypertrophie assoziiert sind und den Phänotyp einer HCM nachahmen können, werden Phänokopien genannt und sollten von einer HCM differenziert werden, da sie unterschiedliche Therapiemanagements erfordern und andere

Prognosen haben. Hierzu gehören z.B. Morbus Fabry, Amyloidose und Noonan-Syndrom [13].

### 1.1.2 R453C und R719W Mutationen als Ursachen einer HCM

Die R453C (RC/+) und R719W (RW/+) Mutationen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, liegen beide im MYH7-Gen. Die R453C Mutation ist ein Austausch der Aminosäure Arginin gegen Cystein in Position 453 im Exon 14. Bei der Punktmutation R719W ist Arginin in Position 719 im Exon 19 durch Tryptophan ersetzt [14]. Beide Mutationen sind als maligne bekannt [15] und tragen ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod [16, 17]. Bei der R453C Mutation sind zusätzlich ein früher Krankheitsbeginn und eine hundertprozentige Penetranz beschrieben [18], was bedeutet, dass die heterozygote Mutation in allen Fällen zur Ausprägung eines Phänotyps führt.

Beim Menschen stellt die schwere Kette des beta-Myosins die Hauptisoform des kardialen Myosins dar. Bei der Maus dagegen ist die alpha-Isoform vorherrschend, die durch das Gen *Myh6* kodiert wird. Beide Proteine haben eine Aminosäuresequenz-Identität von  $\geq 93\%$ , sodass die humanen Mutationen auf das *Myh6*-Gen der Maus gentechnisch übertragen wurden, um Mausmodelle für die humane Erkrankung zu generieren [19, 20].

### 1.1.3 Klinik und Diagnostik der HCM

Das klinische Spektrum der HCM ist groß. Da die systolische Pumpfunktion trotz pathologischer Morphologie und Histologie häufig uneingeschränkt ist, kann sie lebenslang asymptomatisch und damit unentdeckt bleiben. Sie kann sich aber auch durch Thoraxschmerzen (Angina pectoris), Dyspnoe, Palpitationen und Synkopen äußern und erhöht das Risiko für akute Herzinsuffizienz, den plötzlichen Herztod und Herzrhythmusstörungen [3, 21].

Gemäß der Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) wird die HCM definiert durch eine linksventrikuläre Wandverdickung  $\geq 15$  mm, die nicht allein durch einen pathologischen linksventrikulären Füllungsdruck zu erklären ist. Die Wanddicke wird mittels Bildgebung, meist 2D-Echokardiographie oder kardiale Magnetresonanztomographie (MRT), gemessen [13]. Zur Erstdiagnostik gehören eine Anamnese mit Familienanamnese, körperliche Untersuchung, Elektrokardiographie (EKG) und Echokardiographie. Je nach Befund kann eine erweiterte Diagnostik mittels Langzeit-EKG, kardialen MRT sowie Belastungstests sinnvoll sein [22].

In etwa 1/3 aller Fälle ist eine Obstruktion des linksventrikulären Ausflustraktes (engl.: *left ventricular outflow tract obstruction*, LVOTO) zu finden. Diese besteht bei einem maximal auslösbaren Spitzengradienten von  $\geq 30$  mmHg im linksventrikulären Ausflustrakt in den Dopplermessungen. Eine invasive Therapie wird bei einem Spitzengradienten von  $\geq 50$  mmHg als indiziert gesehen [22].

Familienmitgliedern von Betroffenen, bei denen ein positiver Genotyp bestätigt wurde, werden je nach Alter regelmäßige Kontrollen empfohlen. Zwischen 12 und 21 Jahren werden bildgebende, meist echokardiographische, Kontrollen alle 12 bis 18 Monate geraten [23]. Bei jüngeren und älteren Personen sind individuell auch größere Kontrollintervalle möglich [23].

#### 1.1.4 Therapie und Prävention der HCM

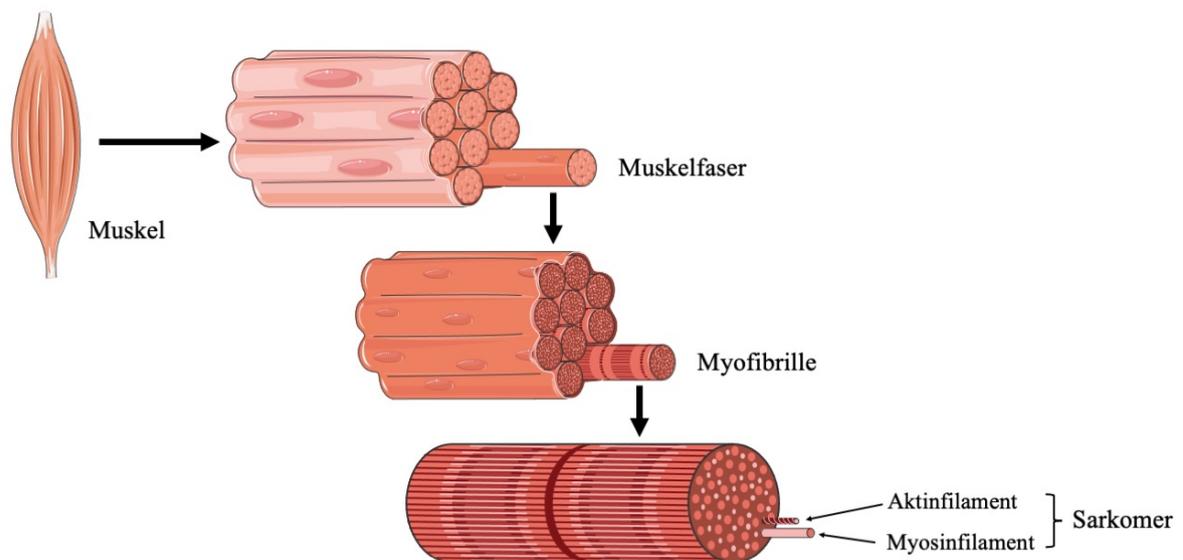
Es gibt verschiedene therapeutische Ansätze, die sich über die Jahre etabliert haben. Die Hauptziele sind hierbei Symptommanagement sowie Risikostratifizierung und Prävention eines plötzlichen Herztodes [22, 24]. Für einen medikamentösen Ansatz eignen sich beta-Adrenozeptor-Antagonisten (beta-Blocker) oder als Alternative L-Typ-Calciumkanalblocker. Bei Vorliegen einer ausgeprägten LVOTO ist eine operative septale Myektomie oder Alkoholablation des Septums empfohlen [22, 24].

Zur Primärprävention eines plötzlichen Herztodes bei Vorliegen von Hauptrisikofaktoren wird die Implantation eines ICD (engl.: *implantable cardioverter defibrillator*; implantierbarer Kardioverter-Defibrillator) empfohlen [22, 24]. Auch nach Reanimation bei bereits stattgehabtem Kreislaufstillstand ist die Implantation eines ICD zur Sekundärprävention möglich. Zu den Hauptrisikofaktoren gehören: Familienanamnese mit einem HCM-assoziierten plötzlichen Herztod, ungeklärte Synkope, multiple und repetitive nicht-beständige ventrikuläre Tachykardien, massive linksventrikuläre Hypertrophie  $> 30$  mm, linksventrikuläres apikales Aneurysma, ausgeprägte Verzögerung der myokardialen Gadolinium-Aufnahme im MRT und Ejektionsfraktion  $< 50$  %. Die ESC zählt auch einen erhöhten Durchmesser des linken Vorhofs und einen erhöhten linksventrikulären Ausflustraktgradienten zu den Risikofaktoren [25, 26].

## 1.2 Das Sarkomer

### 1.2.1 Aufbau des Sarkomers

Die einzelnen Muskelfasern der Herzmuskeln bestehen aus Bündeln mit Myofibrillen, die wiederum aus aneinandergereihten Sarkomeren bestehen, wie in Abb. 1 dargestellt.

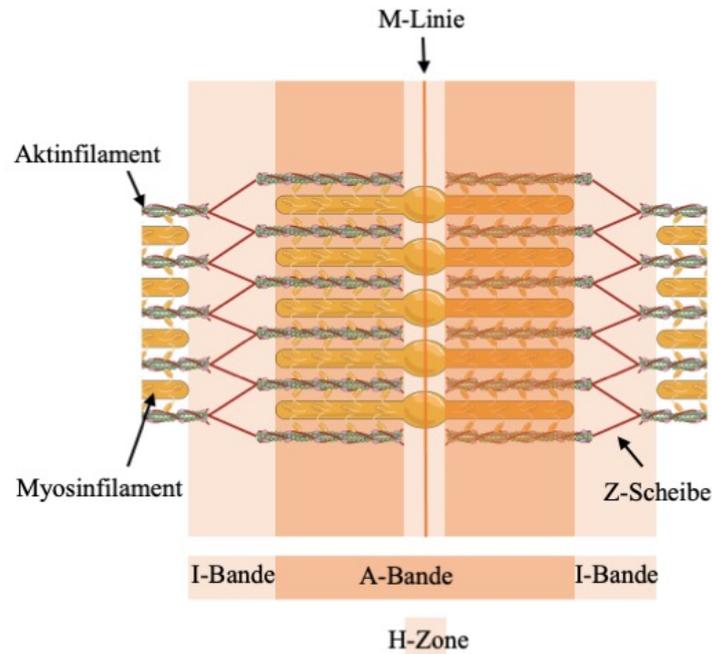


**Abb. 1: Organisation des Muskels in Muskelfasern, Myofibrillen und Sarkomeren**

Modifizierte Abbildung „*Muscle Anatomy*“, lizenziert unter CC BY 4.0 [27].

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit des Herzmuskels (siehe Abb. 1) [28]. Innerhalb des Sarkomers sind die dicken Myofilamente (Myosinfilamente) und dünnen Myofilamente (Aktinfilamente mit Tropomyosin und Troponinkomplex) regelmäßig angeordnet (siehe Abb. 2). Die Myosinfilamente reichen durch die gesamte A-Bande (anisotrop) und sind beidseits über Titinmoleküle in den benachbarten Z-Scheiben verankert. Mittig durch die H-Zone, in der sich die Myosinfilamente ohne Aktinfilamente befinden, zieht die M-Linie, in der wieder die Myosinfilamente verankert sind. Die Aktinfilamente sind über alpha-Aktinin an der Z-Scheibe verankert und reichen von der Grenze der H-Zone bis zur Z-Scheibe in der I-Bande (isotrop) hinein [28].

Laut der Gleitfilamenttheorie gleiten bei Längenänderung des Muskels Aktin- und Myosinfilamente aneinander entlang. Die Länge der Myofilamente bleibt dabei stets konstant, während sich die H-Zone und I-Bande gleichermaßen verschmälern [28].



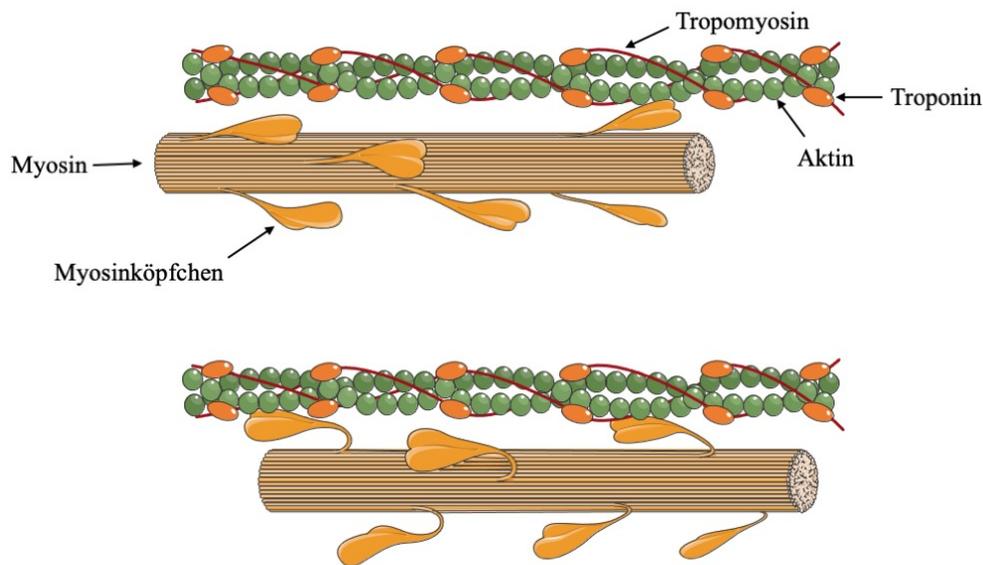
**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Sarkomers mit Anordnung der Myosin- und Aktinfilamente**

Modifizierte Abbildung „*Muscular Contraction*“, lizenziert unter CC BY 4.0 [27].

### 1.2.2 Kontraktionszyklus

Die Muskelkontraktion basiert auf der zyklischen Wechselwirkung von Myosinköpfchen mit Aktinfilamenten, wie in Abb. 3 dargestellt [28]. In Ruhe wird die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin durch Troponin T, Troponin C, Troponin I und Tropomyosin bedeckt. Ansteigendes  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol bindet an Troponin C ( $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Untereinheit). Dies führt zur Konformationsänderung des Troponin-Komplexes und das assoziierte Tropomyosin wird auf der Oberfläche des Aktinfilamentes umgelagert, sodass die Bindungsstelle für das Myosinköpfchen frei wird [28].

Ein ATP-Molekül bindet an das aktive Zentrum des Myosinköpfchens und durchbricht die hochaffine Bindung zum Aktinfilament. Das ATP wird hydrolysiert, also in ADP und anorganischem Phosphat gespalten. Darauf entsteht die niederaffine Bindung vom Aktin mit dem Myosinköpfchen. Nach weiteren Strukturumlagerungen folgt eine feste, hochaffine Bindung des Myosinköpfchens an Aktin. Es folgen der erste Kraftschlag unter Dissoziation vom anorganischen Phosphat und der zweite Kraftschlag unter Dissoziation von ADP. Der Querbrückenzyklus setzt sich fort, indem ein neues ATP-Molekül die feste Bindung zwischen dem nukleotidfreien Myosinkopf und Aktin löst [28].



**Abb. 3: Myosinfilament mit Myosinköpfchen und Aktinfilament mit Tropomyosin und Troponinkomplex**

Modifizierte Abbildung „Actin/Myosin System“, lizenziert unter CC BY 4.0 [27].

### 1.3 Akuter Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt ist definiert als eine akute Myokardschädigung mit Nachweis abnormer Biomarker und klinischem Nachweis einer Myokardischämie. Die Myokardschädigung gilt als akut, wenn ein Anstieg oder Abfall des kardialen Troponins vorliegt [29]. Die Ischämie kann anhand infarktspezifischer Symptomatik, neuen ischämischen EKG-Veränderungen, pathologischer Q-Zacken oder neu aufgetretenem Verlust von vitalem Myokard oder neu aufgetretener Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung festgestellt werden [29].

Klinisch ist eine Unterteilung in STEMI (engl.: *ST-segment elevation myocardial infarction*; ST-Streckenhebungsinfarkt) und Non-STEMI verbreitet. Eine weitere Einteilung wurde 2012 gemeinsam durch Fachgesellschaften, unter anderem durch die *European Society of Cardiology* (ESC), etabliert. Hierbei erfolgt eine Einteilung in 5 Typen nach der zugrundeliegenden Pathologie: Typ 1) atherosklerotische Plaqueruptur, Typ 2) Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf, Typ 3) Herztod mit typischer (vorangegangener) Klinik eines Myokardinfarktes ohne Biomarkerbestimmung, Typ 4) assoziiert mit einer perkutanen Koronarintervention (PCI), Typ 5) assoziiert mit einem koronaren Bypass [29, 30].

Mögliche Komplikationen sind akute Herzinsuffizienz, kardiogener Schock, Vorhofflimmern, ventrikuläre Arrhythmien, plötzlicher Herztod, Ventrikelwandruptur,

Papillarmuskelruptur und Perikarditis [31, 32]. In den letzten Jahren konnten das Ausmaß der Ischämie und die Rate an Komplikationen dank frühzeitiger Reperfusion durch interventionelle und pharmakologische Maßnahmen reduziert werden [33].

Auch die Mortalität ist in den letzten Jahren gesunken [31, 34]. Jedoch sind nach Bericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2023 Herz-Kreislaufkrankungen weiterhin mit 33,9 % die Haupttodesursache in Deutschland. Der akute Myokardinfarkt trägt mit einem Anteil von 12,6 % und insgesamt 43.839 Todesfällen signifikant dazu bei [35].

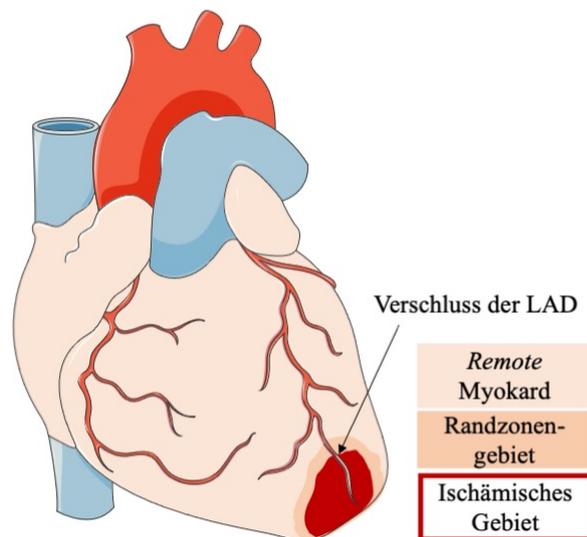
### 1.3.1 Ischämisches Myokard und *remote* Myokard

Bei vollständigem Gefäßverschluss ist nach 20 bis 40 Minuten bereits ein initialer Infarkt in den inneren Schichten des Myokards zu beobachten. Bei anhaltender Ischämie breitet sich der Infarkt transmural von innen nach außen sowie in Richtung des Randzonengebietes aus [36]. Je frühzeitiger eine Reperfusion stattfindet, desto kleiner ist das ischämische Gebiet und desto besser ist das klinische Ergebnis [37]. Jedoch wird dies teilweise relativiert durch einen wiederum entstehenden multifaktoriellen und komplexen Reperfusionsschaden [38, 39]. Ein Erklärungsansatz ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [40]. Auf den Sauerstoffmangel während der Ischämie folgt eine Umstellung auf einen anaeroben Zellstoffwechsel. Es akkumuliert Laktat und der pH-Wert sinkt, was wiederum Protonen über den  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher aus der Zelle ausscheiden lässt. Eine  $\text{Na}^+$ -Überladung führt zur Aktivierung des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers, was wiederum zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung führt. Die  $\text{Na}^+$ -Überladung wird zusätzlich verschlechtert durch die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, die während der Ischämie durch den ATP-Mangel nicht funktioniert. Während der Reperfusion wird die Elektronentransportkette reaktiviert. Dies führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Weitere Quellen für ROS sind die Xanthinoxidase in Endothelzellen und NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten. Durch ROS werden neutrophile Granulozyten angezogen und eine Entzündungsreaktion wird vermittelt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung schädigt die Zellmembran durch Lipidperoxidation, woraus eine Denaturierung der Enzyme folgt und die DNA oxidativ geschädigt wird [40]. Die Gesamtschädigung des Myokards nach I/R ist auf die Summe der Schäden durch die Ischämie und die Reperfusion zurückzuführen. Das Überleben Kardiomyozyten hängt von der Schwere und Dauer der Ischämie sowie von den pathologischen Ereignissen ab, die bei der Reperfusion ausgelöst werden [38].

Das Randzonengebiet liegt, wie in Abb. 4 dargestellt, zwischen dem nicht-kontraktiven, narbigen, infarzierten Myokard und dem kontraktiven, vitalen *remote* Myokard [41] und steht

am meisten unter Belastung. Durch mechanische Scherkräfte, die durch das narbige Gewebe auf die Kardiomyozyten ausgeübt werden, entstehen oxidativer sowie nitrosativer Stress. Diese haben wiederum eine Apoptose der Kardiomyozyten zur Folge. Das Gewebe wird durch Fibrose ersetzt und das ischämische Gebiet breitet sich aus [41].

Das *remote* Myokard ist von der Ischämie zunächst nicht betroffen. Jedoch muss dieser Teil des Myokards auf Dauer den Funktionsverlust des ischämischen Areals kompensieren. Abhängig von der Infarktgröße, Art, Lokalisation, Reperfusion, Komorbiditäten und weiteren Faktoren resultiert eine reaktive Hypertrophie des Myokards [41]. Es wird angenommen, dass dieses Gebiet ursächlich für das hohe Risiko einer Herzinsuffizienz ist. Dies wurde bereits 1967 durch Wyatt et al. beschrieben, welche konträr zu den vorherigen Forschungsergebnissen eine gestörte Funktion im *remote* Myokard festgestellt haben [42]. In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe konnten bereits in der Frühphase nach Myokardinfarkt Veränderungen auf zellulärer Ebene detektiert werden. Es zeigten sich im *remote* Myokard eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik sowie eine gestörte Sarkomerfunktion [43]. Auch sind Veränderungen der Sarkomerproteine in der Literatur beschrieben. Versuche von Kötter et al. zeigten, dass durch posttranslationale Modifikationen des Titins eine rasch zunehmende Steifigkeit der Kardiomyozyten im *remote* Myokard entsteht [44].



**Abb. 4: Myokardinfarkt durch Verschluss der linken vorderen Herzkranzarterie (LAD, engl.: *left anterior descending artery*)**

Dargestellt ist das durch den Verschluss der LAD resultierende ischämische Gebiet (dunkelrot) mit unmittelbar angrenzendem Randzonengebiet (orange), umgeben vom nicht-ischämischen *remote* Myokard (hell-orange). Modifizierte Abbildung „*Apical infarct*“, lizenziert unter CC BY 4.0 [27].

### 1.3.2 *Remodeling* nach Myokardinfarkt

Nach einem stattgehabten Myokardinfarkt finden im ischämischen Gebiet des Myokards Umbauprozesse (*Remodeling*) statt, die das Randzonengebiet und nicht-ischämische *remote* Myokard ebenfalls involvieren [45]. Es lassen sich drei Phasen unterscheiden [46, 47]. In den ersten Stunden bis Tagen findet die inflammatorische (entzündliche) Phase statt. Durch den Entzündungsprozess strömen neutrophile Granulozyten und Monozyten innerhalb weniger Stunden in das ischämische Gebiet ein. Innerhalb 72 Stunden beseitigen Makrophagen die abgestorbenen Myokardzellen und Überreste der Matrix [48]. Dabei werden verschiedene pro-inflammatorische Zytokine, beispielsweise TNF-alpha und Proteasen ausgeschüttet [46]. In der anschließenden Reparaturphase, auch proliferative Phase genannt, wird der Entzündungsprozess 72 Stunden bis 7 Tage nach Myokardinfarkt unter anderem durch anti-inflammatorische Zytokine beendet. Es werden Myofibroblasten zum Aufbau einer extrazellulären Matrix aktiviert [46]. Hierbei wird das untergegangene Myokard durch Kollagen ersetzt. Durch Endothelzellen beginnt eine Gefäßneubildung. Das fibröse Gewebe entwickelt sich an Tag 7 bis 14 in der dritten Phase, der Reifungsphase, in eine stabile Kollagenarbe [46].

Findet jedoch eine übermäßige Inflammation oder Fibrose statt, so kann eine diastolische Dysfunktion, systolische Dysfunktion oder Arrhythmie entstehen [46]. Zudem werden im *remote* Myokard Hypertrophie und Fibrose durch erhöhte Wandspannung weiter begünstigt [36]. Folglich besteht ein erhöhtes Risiko für eine Herzinsuffizienz und eine erhöhte Mortalität [49].

### 1.3.3 HCM und akuter Myokardinfarkt als Komorbiditäten

Bis zu 20 % aller Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie haben eine weitere Herzkreislauferkrankung. Davon sind knapp 0,1 % von einem akuten Myokardinfarkt betroffen [50]. Im Vergleich hierzu beträgt die Lebenszeitprävalenz in Deutschland eines akuten Myokardinfarktes 4,7 % (bei 40- bis 79-Jährigen) [51].

In einer klinischen Studie wurden PatientInnen mit und ohne Vorliegen einer HCM untersucht. PatientInnen nach akutem Myokardinfarkt bei gleichzeitigem Vorliegen einer HCM zeigten ein schlechteres Langzeitüberleben als Betroffene ohne HCM. Die Mortalität der Patienten mit HCM betrug 27,5 % und lag damit höher als bei den Patienten ohne Vorliegen einer HCM mit einer Mortalität von 13 %. Als führende Todesursachen sind Herzinsuffizienz (11 %) und plötzliche Herztode (5,5 %) beschrieben. In 6,6 % endete der

Myokardinfarkt letal [52]. Die Kurzzeitfolgen während des Krankenhausaufenthaltes sind dagegen vergleichbar gewesen [52]. Eine weitere und deutlich größere Studie zeigte sogar, dass die Kurzzeitfolgen bei HCM-Patienten nach Myokardinfarkt geringer ausfallen und das 1-Jahres-Überleben höher liegt als bei Betroffenen ohne HCM. Die 1-Jahres-Mortalität mit Vorliegen einer HCM betrug 28 %, ohne Vorliegen einer HCM 39,5 % [53]. Beide Studien beziehen sich auf die asiatische Bevölkerung.

## 1.4 Tierversuchsmodelle des Myokardinfarktes

*In vivo*-Modelle ermöglichen realitätsnahe Untersuchungen an einem Organismus. Als *in vivo*-Mausmodell zur Untersuchung des Myokardinfarktes hat sich die operative Ligatur der linken vorderen Herzkranzarterie (LAD) etabliert [54]. Eine Möglichkeit ist eine permanente Ligatur der LAD zur Ischämieinduktion. Da heutzutage klinisch eine möglichst zügige Reperfusion des Infarktgebiets angestrebt wird, erfolgt in zwei anderen Ansätzen eine transiente Ligatur der LAD für eine Ischämie mit anschließender Reperfusion bei offenem Thorax bzw. bei geschlossenem Thorax.

### 1.4.1 Permanente Ligatur

In diesem Modell wird unter Narkose und nach Thorakotomie die LAD der Maus mit einem Faden vollständig verschlossen. Es wird eine alleinige Ischämie ausgelöst ohne folgender Reperfusion. Der Vorteil dieses Modells ist, dass das Infarktgebiet 24 Stunden nach Induktion klar definiert ist. Es macht etwa 40 % des gesamten linken Ventrikels aus [55-57]. Außerdem besteht durch die klar definierte Infarktgröße eine bessere Vergleichbarkeit [58]. Jedoch werden nur Infarktgebiete unter 30 % von der Maus gut toleriert. Ein größeres Infarktgebiet hat eine schlechtere Überlebensrate, ein höheres Risiko für akute Herzinsuffizienz oder eine Ventrikelruptur zur Folge [54, 57]. Auch zu beachten gilt, dass dieses Modell durch die fehlende Reperfusion nicht dem klinischen Alltag entspricht, in dem in möglichst kürzester Zeit durch Interventionen eine Reperfusion angestrebt wird.

### 1.4.2 Ischämie/Reperfusion bei offenem Thorax

In dem Modell der Ischämie/Reperfusion bei offenem Thorax wird unter Narkose und nach Thorakotomie, wie in dem Modell der permanenten Ligatur, ein Faden um die LAD der Maus geschlungen und zugezogen. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass nach einer bestimmten Ischämiezeit, der Faden gelöst und eine Reperfusion eingeleitet wird. Das

Infarktgebiet ist dadurch variabler und inkomplett [59]. Die Ischämiezeit wird in der Literatur zwischen 15 Minuten und 2 Stunden gewählt [54]. Die Infarktgröße nach 30-minütiger Ischämie ist geringer als unter permanenter Ligatur und beträgt je nach Studie etwa 12-13 % [56, 60] bis hin zu 30 % [55], sodass insgesamt eine niedrigere Mortalität besteht.

Ein Vorteil der Ischämieinduktion während des offenen Zugangs zum Thorax ist eine direkte Überwachungsmöglichkeit des LAD-Verschlusses und der eintretenden Ischämie durch makroskopisches Erblässens des ischämischen Myokardgebietes [61].

### 1.4.3 Ischämie/Reperfusion bei geschlossenem Thorax

Um das Operationstrauma geringer zu halten, wurden von Nossuli et al. ein Modell zur Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax entwickelt [62]. Hierbei wird unter Narkose und nach Thorakotomie eine Schlinge um die LAD gelegt. Nach Verschluss des Thorax werden die Fadenenden in einer subkutanen Tasche belassen. Im Anschluss an eine Rekonvaleszenz von mindestens 3 Tagen wird unter einer zweiten Narkose eine Ischämie der LAD induziert, indem Zug auf die frei präparierten Fadenenden ausgeübt wird, ohne erneutes Öffnen des Thorax und unter EKG-Überwachung (siehe Kapitel 2.2.2). Dadurch sind der invasive operative Eingriff und die Ischämieinduktion zeitlich klar getrennt, sodass eine selektive Untersuchung der Auswirkungen von I/R möglich ist. Es ist erwiesen, dass während der Rekonvaleszenzzeit die Entzündungsmediatoren aus der ersten Operation vollständig rückläufig sind [62]. Auch ist insgesamt eine geringere Mortalität zu beobachten [57]. Schließlich wurde zur gezielten Untersuchung von I/R diese Methode für die vorliegende Arbeit gewählt.

## 1.5 Das Organbad

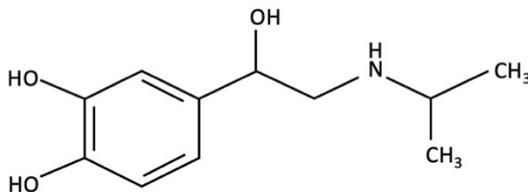
Das Organbad hat sich für funktionelle Messungen an isoliertem Gewebe unter variierbaren pathologischen und physiologischen Untersuchungsbedingungen bewährt [63, 64]. Die Methodik wurde erstmals von Rudolf Magnus 1904 beschrieben [65]. Otto Loewi hat im Rahmen seiner Organbadversuche Acetylcholin als endogenen Neurotransmitter entdeckt und erhielt dafür gemeinsam mit Sir Henry Dale 1936 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin [65].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Organbad zur gut etablierten Untersuchung der Herzmuskelkontraktilität an Papillarmuskeln *in vitro* gewählt. Verglichen mit Muskelstreifenpräparaten können Papillarmuskel ohne schwere Schädigung des Gewebes

im Ganzen präpariert werden [64]. Im Organbad können *in vivo* Einflussfaktoren wie die Variabilität von Blutdruck, neurohumoraler Stimulation sowie physischer oder metabolischer Belastung ausgeschlossen werden [64]. Andere Einflussfaktoren, wie beispielsweise die Stimulationsfrequenz, hingegen können willkürlich festgelegt und geändert werden, sodass die Versuche insgesamt gut reproduzierbar und kontrollierbar sind [64].

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Organbadversuchen wurde als pharmakologische Stimulation Isoprenalin und als mechanische Stimulation die Änderung der Vorspannung gewählt (siehe Kapitel 2.3).

### 1.5.1 Beta-adrenerge Stimulation



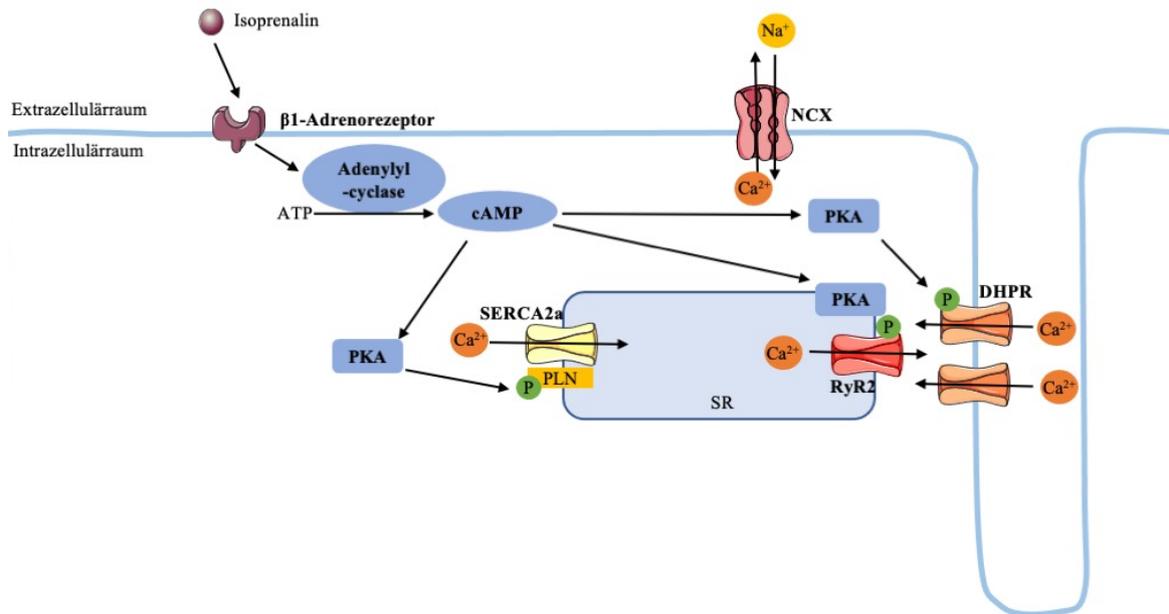
**Abb. 5: Strukturformel von Isoprenalin**

Katecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin, werden unter Belastungsbedingungen endogen über die Aktivierung der beta-Adrenozeptoren ausgeschüttet [64]. Für *in vitro* Untersuchungen hat sich Isoprenalin (siehe Abb. 5) als ein Derivat des Noradrenalins bewährt. Durch den pharmakologischen Stress können unter Basalbedingungen nicht zu messende funktionelle Einschränkungen des untersuchten Gewebes sichtbar gemacht werden.

Das Isoprenalin wirkt positiv inotrop, steigert also die Kontraktionskraft, und positiv lusitrop, beschleunigt die Relaxation. Aufgrund der voreingestellten Stimulationsfrequenz im Organbad wird die positive Chronotropie des Isoprenalins unterbunden.

Nach beta-adrenerger Stimulation kommt es über den Adenylylzyklase-cAMP-Proteinkinase A Signalweg zur Phosphorylierung und Öffnen der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (DHPR, Dihydropyridin-Rezeptor) (siehe Abb. 6) [66, 67]. Durch diese kann  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytosol der Herzmuskelzelle eingeschleust werden.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet nun an die Ryanodin-Rezeptoren 2 (RyR2) und bewirkt wiederum eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Das im Zytosol angestiegene  $\text{Ca}^{2+}$  kann nun an das Troponin C binden und der Querbrückenzyklus beginnt [66, 68].

In der Diastole wird über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a (*sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) das  $\text{Ca}^{2+}$  zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum transportiert [69]. Nach beta-adrenerger Stimulation wird Phospholamban phosphoryliert und seine inhibitorische Wirkung auf SERCA2a aufgehoben.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Einflusses von Isoprenalin auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kreislauf in Kardiomyozyten**

ATP = Adenosintriphosphat;  $\text{Ca}^{2+}$  = Calcium-Ion; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; DHPR = Dihydropyridin-Rezeptor/L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle; NCX = Natrium-Calcium-Austauscher; P = Phosphat; PLN = Phospholamban; PKA = Proteinkinase A; RyR2 = Ryanodin-Rezeptor 2; SERCA2a = Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums; SR = Sarkoplasmatisches Retikulum

Abbildung wurde erstellt mit [27], lizenziert unter CC BY 4.0. Modifiziert nach [70].

### 1.5.2 Frank-Starling-Mechanismus

Otto Frank beschrieb 1895 erstmals den Einfluss der Vorspannung auf die Spannungsentwicklung des Myokards. Bis zu einer optimalen Vordehnung von  $2,2 \mu\text{m}$  kommt es zu einer ansteigenden Kraft. Bei einer Überdehnung nimmt die Kraft wieder ab. Diese zunehmende Kraftentwicklung entsteht durch 1) eine Änderung der Aktin-Myosin-Überlappung und 2) eine dehnungsabhängige Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente [71, 72].

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen Auswirkungen der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM), der häufigsten genetischen Herzmuskelerkrankung, auf das *remote* Myokard untersucht werden. Hierzu wurden zwei *knock-in* Mausmodelle mit humanen Mutationen im *Myh6*-Gen (RW/+ und RC/+) verwendet. 24 Stunden nach operativer Induktion einer einstündigen Ischämie wurde mithilfe eines Organbads die aktive Kraftentwicklung der linksventrikulären hinteren Papillarmuskeln, die überwiegend dem *remote* Myokard zugehörig sind, unter elektrischer Stimulation gemessen. Zur Ermittlung der Kraftreserve wurden die Muskelpräparate schrittweise mit steigenden Konzentrationen des beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin stimuliert sowie die Vorspannung der Muskeln im Organbad erhöht.

Ziel der Arbeit ist die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Welche Auswirkungen hat das Vorliegen einer HCM auf die Kontraktion und Relaxation der Papillarmuskeln 24 Stunden nach einstündigem LAD-Verschluss?
2. Besteht eine Beeinträchtigung der aktiven Kraftgenerierung und/oder der Relaxation im *remote* Myokard unter Isoprenalin-Stimulation? Ist ein Unterschied zwischen Wildtypen und den HCM-Modellen festzustellen?
3. Welche Auswirkungen hat die mechanische Erhöhung der Vorlast auf die Kontraktion und Relaxation des *remote* Myokards in den unterschiedlichen Versuchsgruppen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Modellorganismus wurde die Maus gewählt, da die operative Induktion des Myokardinfarktes und die Isolation des Papillarmuskels in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) gut etabliert ist. Außerdem verfügt die Arbeitsgruppe über gut charakterisierte Mausmodelle mit Punktmutationen im *Myh6* Gen, die als Krankheitsursache für die hypertrophe Kardiomyopathie beim Menschen identifiziert wurden.

Für die Versuche wurden 129/SvEv Mäuse mit zwei unterschiedlichen krankheitsauslösenden *knock-in* Mutationen gewählt. Eine Gruppe trug die Arginin 453 Cystein (RC/+), eine weitere die Arginin 719 Tryptophan (RW/+) Punktmutation im *Myh6* Gen. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtyp-Geschwister-Mäuse. Insgesamt wurden 60 männliche Mäuse im Alter von 10 bis 12 Wochen untersucht.

Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Die Tierversuche wurden gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes nach §8 durchgeführt. Der zugehörige Tierversuchsantrag wurde unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2017.A145 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt. Der versuchstierkundliche Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde vor Beginn der Versuche am 11.01.2019 erworben.

### 2.2. Ischämie und Reperfusion

Bei dem induzierten Myokardinfarkt handelt es sich um eine transiente Ischämie mit darauffolgender Reperfusion, erzeugt durch eine Ligatur des absteigenden Astes der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior*; engl.: *left anterior descending*, LAD). Die Ischämie/Reperfusion (I/R) erfolgte nach der sogenannten *closed-chest* Methode in zwei Abschnitten (Kapitel 1.4.3). Zunächst wurde eine Voroperation mit Anlage eines Ligaturfadens um die LAD durchgeführt. Nach einer Rekonvaleszenz von 3 bis 7 Tagen wurde durch Zug auf den Faden die 60-minütige Ischämie induziert. Diese etablierte Methode der gezielten Ischämieinduktion erzeugt ein ischämisches Areal an der Herzspitze. Die Herzbasis und mindestens die basalen 2/3 der Papillarmuskeln sind, wie histologische

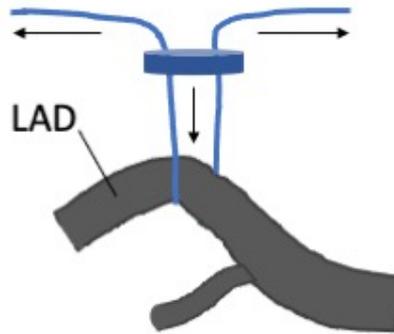
Vorversuche von Frau Dr. rer. nat. Simone Gorreßen (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) gezeigt haben, von der Ischämie nicht betroffen und sind daher dem *remote* Myokard zuzuordnen.

### 2.2.1 Voroperation

Für die Narkose wurde den Tieren intraperitoneal Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Sie wurden in Rückenlage intubiert und an ein Beatmungsgerät (Minivent Mircoventilator, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen. Es wurden ein Hubvolumen von etwa 250 µl und eine Beatmungsfrequenz von 140 Atemzügen pro Minute eingestellt. Beatmet wurde mit einer Mischung aus 2/3 Druckluft und 1/3 Sauerstoff. Die Körpertemperatur der Tiere wurde mithilfe einer Wärmeplatte möglichst konstant bei 37°C gehalten. Gemessen wurde sie mit einer Sonde, die vorsichtig nach Beginn der Narkose endorektal eingeführt wurde.

Zur perioperativen Analgesie wurde Buprenorphin (0,1 mg/kg) subkutan appliziert. Das zu operierende Hautareal wurde rasiert und mit einer Betaisodona® Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) desinfiziert. Die Mäuse wurden unter mikroskopischer Sicht (Leica M50 Stereomikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) zwischen der 3. und 4. Rippe links parasternal thorakotomiert. Nach Entfernung des Perikards wurde die LAD 1 mm entfernt von der Spitze des linken Herzohres mit 7-0 Prolene® Nahtmaterial (Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) vorsichtig umstoßen (Abb. 7). Die beiden Enden des Fadens wurden durch einen 1 mm dicken Polyethylenring (PE-10) gefädelt. Nach der so entstandenen Schlaufe um die LAD wurden die Fadenenden aus dem Thorax herausgeführt und der Thorax mit 4-0 Prolene® (Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Fadenenden wurden rechts in einer subkutanen Tasche platziert. Die Haut wurde mit 5-0 Prolene® (Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Tiere wurden aus der Narkose ausgeleitet und die Beatmung abgestellt. Sie wurden bis zum vollständigen Erwachen engmaschig kontrolliert und gewärmt. Die Applikation von Buprenorphin zur Analgesie wurde in der gleichen Dosis wie perioperativ (0,1 mg/kg) bis einschließlich zum dritten postoperativen Tag zweimal täglich im Abstand von mindestens 6 Stunden fortgeführt.

Die Voroperationen wurden von Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.



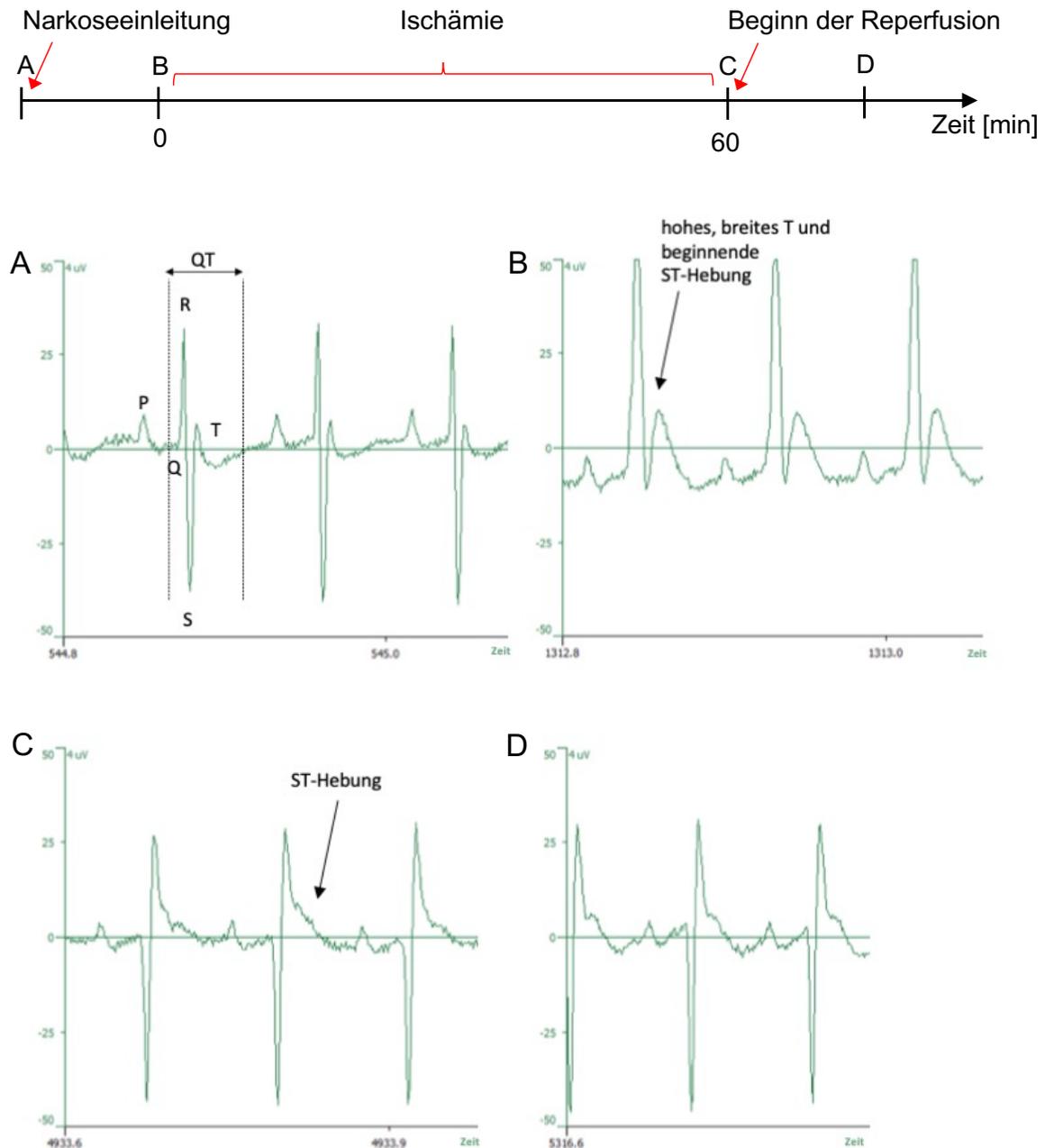
**Abb. 7: Schematische Darstellung der Ligatur um die LAD (modifiziert nach [62])**

Es wurde mit einem Faden eine Schlaufe um die LAD gelegt. Die beiden Fadenenden durch ein Polyethylenring (blau) gezogen. Nach Zug an den Fadenenden wurde durch diesen Polyethylenring eine Okklusion der LAD und somit eine Ischämie des peripheren Gefäßabschnittes hervorgerufen (siehe Kapitel 2.2.2).

### 2.2.2 Ischämieinduktion bei geschlossenem Thorax

Die Induktion der Ischämie erfolgte nach einer Erholungszeit von 3 bis 7 Tagen nach der Voroperation. Die Mäuse wurden über eine Inhalationsmaske mit Isofluran (Fluovac, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) narkotisiert. Initial wurden die Mäuse mit einem Luftgemisch aus 2/3 Druckluft und 1/3 Sauerstoff, versetzt mit 3 Vol.-% Isofluran, beatmet. Nach der Einleitung wurde das Isofluran zur Erhaltung auf 2 Vol.-% erniedrigt. Das Isofluran wurde mithilfe eines Veterinary Fluosorber (Fluovac Harvard Apparatur, Edenbridge, Kent, UK) abgesaugt. Die Inhalationsnarkose hat den Vorteil, dass möglichst physiologische Atem- (etwa 100 pro Minute) und Herzfrequenzen (etwa 600 pro Minute) vergleichsweise aufrechterhalten werden.

Nach Beginn der Erhaltungsphase der Narkose wurde die Maus auf den Rücken gelegt und mit Klebestreifen an den Pfoten fixiert. Mithilfe Wärmeplatte wurde auch hier die Körpertemperatur, die mit einer endorektalen Sonde gemessen wurde, reguliert und möglichst konstant auf 37°C gehalten. Zur Überwachung des Kreislaufs und Kontrolle des induzierten Myokardinfarktes wurde ein Elektrokardiogramm (EKG; Hugo Sachs Harvard-Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) abgeleitet. Dazu wurden drei Elektroden für die Extremitätenableitungen und eine Erdungselektrode subdermal appliziert. Über die gesamte Zeit wurde das abgeleitete EKG mit der Basic Data Acquisition Software (BDAS; Harvard Apparatus, Holliston Massachusetts, USA) aufgezeichnet. In Abb. 8 sieht man beispielhafte Ausschnitte eines EKG zu verschiedenen Zeitpunkten der Intervention. Die Bestätigung der ST-Streckenhebung mittels EKG stellt eine wichtige Kontrolle der erfolgten Okklusion der LAD und somit der Myokardischämie dar.



**Abb. 8: EKG-Ausschnitte einer Maus**

Oben: Zeitstrahl mit zeitlicher Einordnung der EKG-Abbildungen A-D. Unten: A: Basales EKG zu Beginn der Intervention; B: EKG zu Beginn der Ischämie mit einer hohen, breiten T-Welle und einer beginnenden ST-Streckenhebung; C: EKG am Ende der Ischämie bzw. zu Beginn der Reperfusion mit einer noch persistierenden ST-Streckenhebung; D: EKG am Ende der Intervention bei Ausleitung der Narkose.

Die Maus wurde mit einem sterilen Lochtuch bedeckt. Für die Sicht wurde ein Leica M50 Stereomikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Der voroperierte Bereich am Thorax wurde mit einer Betaisodona® Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) desinfiziert und die vorherigen Hautnähte vorsichtig gelöst. Nachdem die Haut eröffnet wurde, wurden die Ligaturfäden aus der subkutanen Tasche vorsichtig und ohne

Zugspannung mobilisiert und herausgeholt. Die Fäden wurden jeweils rechts und links am Thorax möglichst orthogonal zum Körper an Magnetsäulen befestigt. Es wurde ein beidseitig gleichmäßiger Zug auf die Fäden ausgeübt, bis eine ST-Hebung im EKG zu erkennen war. Die Ischämie wurde 60 Minuten aufrechterhalten und die Zugspannung hierzu mindestens alle 10 Minuten kontrolliert. Nach den 60 Minuten wurden ebenfalls unter EKG-Kontrolle die Fäden thoraxnah durchtrennt. Die dadurch erfolgte Wiederöffnung der LAD und somit beginnende Reperfusion zeigte sich nach einigen Minuten in einer Normalisierung der ST-Strecke. Die Haut wurde mit der Betaisodona<sup>®</sup> Lösung angefeuchtet und mit 5-0 Prolene<sup>®</sup> (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) zugenäht. Darauf wurde die verschlossene Haut erneut mit Betaisodona<sup>®</sup> desinfiziert und die Maus aus der Narkose ausgeleitet.

Bei den Mäusen der Kontrollgruppe erfolgte hingegen eine Schein-Operation. Sie wurden auf gleicher Weise über eine Maske mit einem Atemgasgemisch aus 2/3 Druckluft, 1/3 Sauerstoff und 3 Vol.-% Isofluran narkotisiert und auf der Wärmeplatte liegend mit eröffneter Haut 60 Minuten unter Temperatur- und EKG-Kontrolle ohne eine Intervention beobachtet.

## 2.3 Organbad

Wie unter 2.2 erwähnt, sind die Papillarmuskeln nach einer Ischämieinduktion in der beschriebenen Art und Weise überwiegend dem *remote* Myokard zugehörig. Zugleich stellen sie eine definierte, in jedem Herzen reproduzierbar identifizierbare Struktur dar. 24 Stunden nach der 60-minütigen Ischämie und somit in der Akutphase des Myokardinfarktes (beziehungsweise nach der Schein-Operation) wurden die hinteren Papillarmuskeln der linken Ventrikel isoliert. Das Panlab 2-Kammer Organbad (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) ermöglichte eine Messung der Kontraktilität *in vitro* ohne die Einflüsse neurohumoraler und vaskulärer Faktoren. Die Messungen fanden unter Basalbedingungen sowie unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin-hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und mechanischer Stimulation durch Steigerung der Vorspannung statt.

### 2.3.1 Vorbereitung der Nährlösung

Die für die Präparation des Papillarmuskels und das Organbad verwendete Nährlösung wurde nach dem Krebs-Henseleit-Puffer modifiziert und täglich frisch angesetzt. Es wurden alle Chemikalien, wie in Tabelle 1 aufgeführt, mit einer Feinwaage einzeln gewogen. Bis

auf das Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) wurden die Substanzen in einem Messzylinder mit Millipore-Wasser ( $\text{DdH}_2\text{O}$ ) auf 2 L aufgefüllt und mithilfe eines Magnetrührers binnen 10 Minuten gelöst. Nach Messung des Ausgangs-pH-Wertes wurde die Lösung 20 Minuten mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) äquilibriert, um ein pH-Wert von 7,40 einzustellen. Das Hydrogencarbonat in der Lösung bildet zusammen mit dem Carbogen ein Puffersystem. Nach der Begasung wurde zuletzt das  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben, um Calciumpräzipitationen zu verhindern. Von der fertigen Nährlösung wurden etwa 1,5 L für das Organbad genutzt und 0,5 L für die Präparation zurückbehalten.

Bezeichnung	Menge [g] auf 2 L	Konzentration [mM]	Firma
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	13,8	118	Carl Roth <sup>1</sup>
Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ )	0,7	4,7	Merck <sup>2</sup>
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	0,4	0,8	Carl Roth <sup>1</sup>
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	4,18	25	Merck <sup>2</sup>
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,32	1,2	Merck <sup>2</sup>
Glukose	3,6	10	Carl Roth <sup>1</sup>
nach Äquilibrierung mit Carbogen (95% $\text{O}_2$ , 5% $\text{CO}_2$ )			
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	0,74	2,5	Merck <sup>2</sup>

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Nährlösung** (modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer)

<sup>1</sup> Carl Roth (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

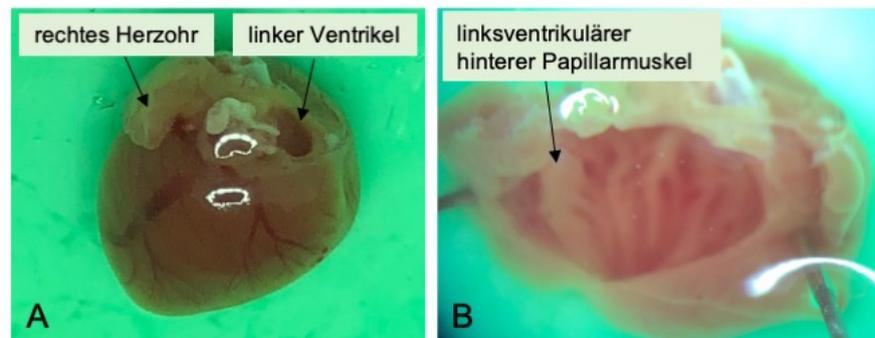
<sup>2</sup> Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

### 2.3.2 Isolation des Papillarmuskels

Vor der Entnahme des Herzens wurden zwei Petrischalen mit Nährlösung vorbereitet und auf Eis gelegt, um sie auf etwa 4°C zu kühlen. Eine der Petrischalen wurden vorher mit Kautschuk beschichtet, um das Fixieren von Gewebe mit Einmalkanülen (Sterican® 27G x 3/4, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zu ermöglichen. Vor Beginn wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 µM, 10 µM und 100 µM Isoprenalin-hydrochlorid, gelöst in der Nährlösung, vorbereitet.

Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der I/R durch zervikale Dislokation getötet und auf dem Rücken fixiert. Nachdem die Haut eröffnet wurde, wurde der Thorax durch zwei seitliche Schnitte durch die Rippen und einer transversalen Durchtrennung des Zwerchfells zügig eröffnet. Das restliche Perikard wurde entfernt, sodass freie Sicht auf das Herz entstand. Das

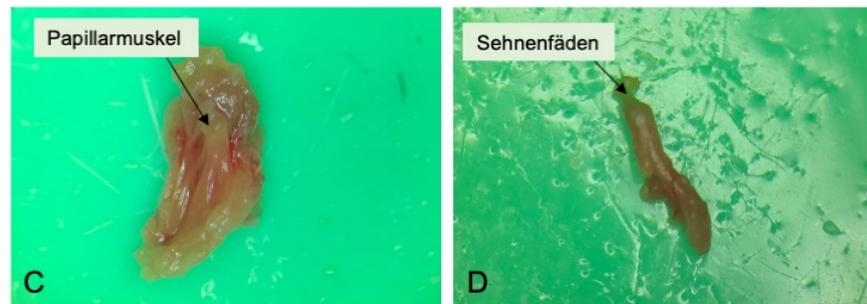
Herz wurde von allen zu- und wegführenden Gefäßen getrennt, von der Lunge und dem umgebenden Gewebe gelöst und in eine der vorbereiteten Petrischalen gelegt. Nachdem das Herz einige Sekunden das restliche Blut ausgepumpt hat, gelang durch die Kühlung ein Herzstillstand, welches die weitere Präparation erleichterte. Es wurden beide Vorhöfe auf atrioventrikulärer Ebene abgetrennt und die Ventrikel in die zweite Petrischale mit Bodenbeschichtung überführt, um eine frische Nährlösung zu gewährleisten (Abb. 9 A). Ab diesem Schritt wurde mithilfe eines Leica M50 Stereomikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) präpariert. Erst wurde der rechte Ventrikel, dann über den rechten Ventrikel durch einen Schnitt durch das Septum der linke Ventrikel eröffnet. Der linke Ventrikel wurde nun mithilfe von Einmalkanülen vorsichtig fixiert, ohne die beiden Papillarmuskel zu verletzen (Abb. 9 B).



**Abb. 9: Präparationsschritte des linksventrikulären hinteren Papillarmuskels in lichtmikroskopischer Aufnahme in 40-facher Vergrößerung**

A: Isoliertes Mäuseherz nach Entfernung eines Großteils der Vorhöfe. B: Eröffnung des linken Ventrikels.

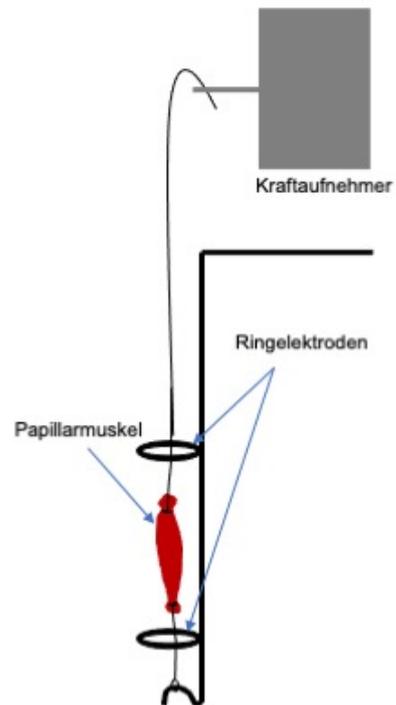
Der linksventrikuläre hintere Papillarmuskel wurde identifiziert und vorsichtig präpariert (Abb. 10 A). Ohne mechanischen Druck aufzuwenden wurde die Herzwand durch gezielte Schnitte vom Papillarmuskel gelöst, wobei zu beachten war, dass am Ursprung und Ansatz genug Gewebe bleibt, um den Muskel anzuknoten (Abb. 10 B). Mithilfe von zwei Seidenfäden der Stärke 7-0 wurde der Papillarmuskel vorsichtig sowohl an den Sehnenfäden (*Chordae tendinae*) als auch am Muskelursprung angeknötet. Während dieser Schritte ist es wichtig, keinen Zug oder Druck auf den Papillarmuskel auszuüben und den Muskel mit der Pinzette und Schere möglichst nicht zu berühren.



**Abb. 10: Weitere Präparationsschritte des linksventrikulären, hinteren Papillarmuskels in lichtmikroskopischer Aufnahme in 40-facher Vergrößerung**

C: Identifizierung des hinteren Papillarmuskels und Dissektion der restlichen Herzwand. D: Isolierter Papillarmuskel mit valvulären Sehnenfäden oben und muskulärem Anteil unten.

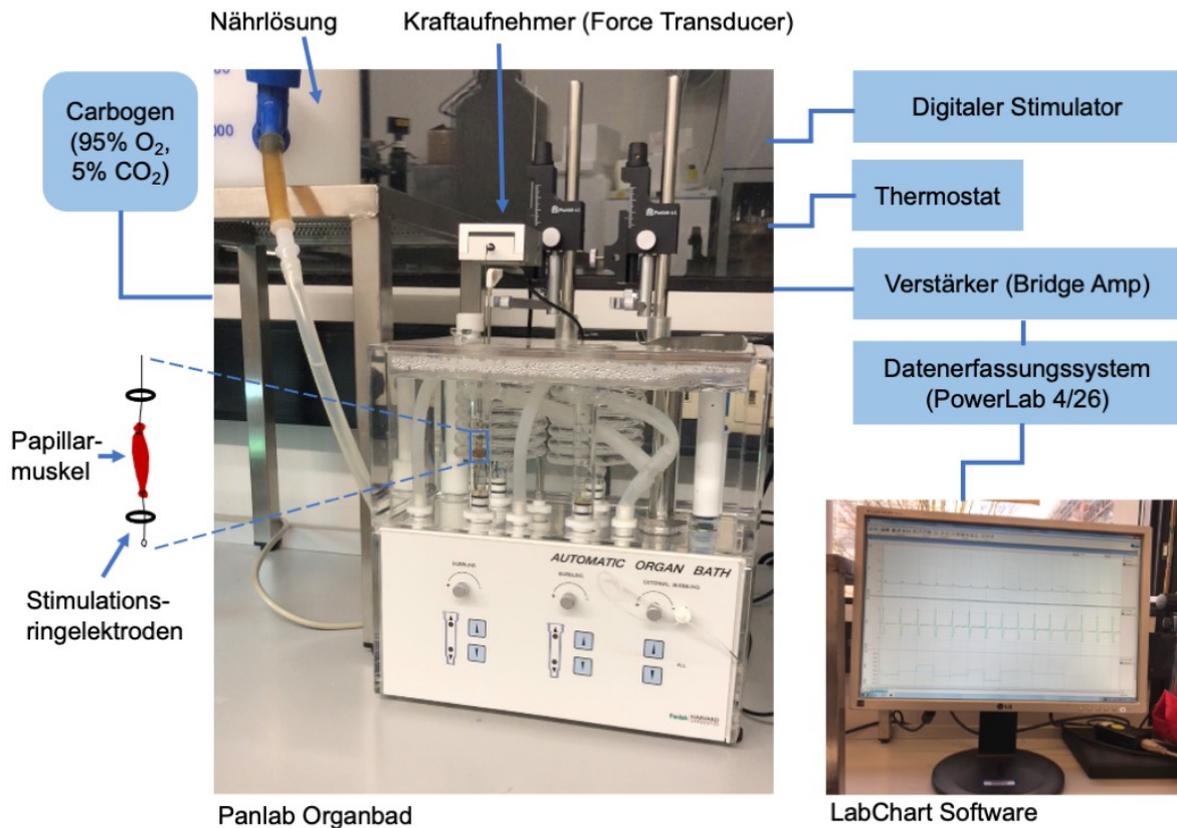
Der Papillarmuskel wurde, so wie in Abb. 11 dargestellt, in die auf 37°C vorgeheizte Organbadkammer mit 10 ml Nährlösung und ständiger Carbogenzufuhr zwischen zwei Ringelektroden (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) eingehängt. Oben wurden die angeschlungenen Sehnenfäden mithilfe von Histoacryl® Gewebekleber (B. Braun Melsungen GmbH & Co. KG Betriebsstätte Tuttlingen, Deutschland) über den Faden an einem geeichten Draht befestigt und dieser wiederum an einem Kraftaufnehmer (*Force Transducer* 20g; ADInstruments Ltd, Oxford, UK) angebracht. Unten wurde der muskuläre Teil, der in Richtung Herzspitze zog, mithilfe einer Fadenschleife eingehängt. Es wurde beachtet, dass vom Tod der Maus bis zum Fixieren des Muskels im Organbad und Beginn der elektrischen Stimulation nicht mehr als 10 Minuten vergingen.



**Abb. 11: Schematische Darstellung des eingehängten Papillarmuskels in der Organbadkammer**

Der Muskel (in rot) wurde über zwei Seidenfäden zwischen den beiden Ringelektroden eingehängt und an dem Kraftaufnehmer angebracht.

## 2.3.3 Aufbau des Organbads



**Abb. 12: Schematischer Aufbau des Organbads**

Der isolierte Papillarmuskel ist über einen Draht und einen Haken zwischen den Ringelektroden in der Nährlösung eingehängt. Bei elektrischer Stimulation werden Kontraktion und Relaxation des Muskels erfasst und über die Software LabChart aufgezeichnet.

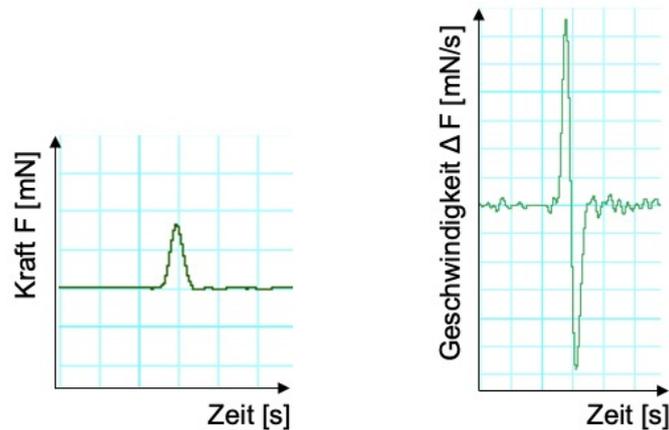
Wie in Abb. 12 schematisch dargestellt befinden sich in dem Organbad zwei Kammern. Die Organbadkammer, in die der Papillarmuskel eingehängt wurde, wurde mit 10 ml Nährlösung aufgefüllt, die über einen Zu- und Ablauf regelmäßig ausgetauscht wurde. Die Lösung wurde mithilfe eines Carbogenanschlusses (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) über Öffnungen am Boden der Kammer oxygeniert und mithilfe eines Thermostats (LE 13206, ADInstruments Ltd, Oxford, UK) auf 37°C erwärmt, um möglichst physiologische Verhältnisse zu erzeugen und den Muskel über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde vital zu halten. Mit einem digitalen Stimulator (LE12206, Panlab-Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, US) wurden über zwei Ringelektroden elektrische Impulse an den Papillarmuskel abgegeben und somit *in vitro* Muskelkontraktionen induziert. Der Stimulator wurde auf eine Impulsfrequenz von 1 Hz mit einer Stromstärke von 50 mA und einer

Impulsdauer von 10 ms voreingestellt. Über den Kraftaufnehmer wurde die generierte Kraft durch die Kontraktion und Relaxation des Muskels erfasst und über das Datenerfassungssystem PowerLab 4/26 (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) mit der Software LabChart v5.4 (ADInstruments Ltd, Oxford, UK) aufgezeichnet, sodass die Daten zur späteren Analyse zur Verfügung standen. Da der Muskel mithilfe eines Drahtes eingehängt wurde, wurde vor Beginn der Messungen das Messsystem mit diesem und einem Eichgewicht geeicht. Die Kalibrierung wurde in LabChart als Datei gespeichert, sodass sie als Grundlage für alle Messungen genutzt werden konnte.

#### 2.3.4 Kontraktilitätsmessungen

Der Papillarmuskel wurde unmittelbar nach Fixation in der Organbadkammer auf 1 mN vorgespannt und über den digitalen Stimulator mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Impulsdauer von 10 ms stimuliert. Die erfolgreiche Stimulation wurde mithilfe der Software LabChart parallel kontrolliert. Wie in Abb. 13 zu sehen, wurden mit der Software der maximal generierte Kraftausschlag (links) und die Kraftänderung (rechts) in den einzelnen Kontraktionszyklen des Papillarmuskels aufgezeichnet. Dabei dient die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs als Maß für die Kontraktionskraft (Inotropie) und die des Kraftabfalls als Maß für die Relaxationskraft (Lusitropie). Nach einem festen Protokoll wurde der Papillarmuskel zunächst 8 Minuten im Organbad äquilibriert. Nach 8 Minuten wurde die Kammer zweimal gespült, indem jeweils die Nährlösung aus der Kammer abgelassen und 10 ml von der frischen Lösung aus dem Vorrat in die Kammer zugeführt wurde, um einen regelmäßigen Austausch zu gewährleisten. Der Papillarmuskel wurde, falls notwendig, auf 1 mN nachgespannt und in der neu aufgefüllten Nährlösung erneut 10 Minuten äquilibriert.

Die Muskelkraftausschläge nach der 10-minütigen Äquilibration wurden als Basalwerte angenommen und in der Software markiert. Um die maximale Kraftantwort zu detektieren, wurde der Muskel daraufhin zwei verschiedenen Belastungsbedingungen ausgesetzt, zum einen pharmakologischem Stress durch Isoprenalin und zum anderen mechanischem Stress durch Steigerung der Vorspannung.



**Abb. 13: Aufzeichnung eines einzelnen Kontraktions-/ Relaxationszyklus eines Papillarmuskels in der Software LabChart**

Links: Kraft in mN; Rechts: Änderung der Kraft pro Zeiteinheit in mN/s.

### 2.3.4.1 Kontraktilitätsmessungen unter Einfluss von Isoprenalin

Zur Untersuchung der Kraftsteigerung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation wurde Isoprenalin verwendet. Isoprenalin bindet als Agonist an die  $\beta$ -Adrenorezeptoren in der Membran der Herzmuskelzellen und wirkt positiv inotrop, steigert also dosisabhängig die Kontraktilität der Sarkomere.

Es wurde im Vorfeld eine Stock-Lösung mit Isoprenalin angesetzt. Hierzu wurde 2,48 mg Isoprenalin-hydrochlorid in 1 ml destilliertem  $H_2O$  gelöst, sodass eine Stoffmengenkonzentration von 10 mM entstanden ist. Diese wurden dann in 10  $\mu$ l Aliquots bei 20°C gelagert.

Am Versuchstag wurde für jede Maus jeweils ein Aliquot, entsprechend 10  $\mu$ l, Isoprenalin benutzt und eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1 mM, 10 mM und 100 mM in drei Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet. Nach dem Äquilibrieren des Papillarmuskels in der Organbadkammer wurde unter fortbestehender Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz nach einem festen Protokoll die Stoffmengenkonzentration an Isoprenalin stufenweise erhöht. In 90-sekündigem Abstand wurde mithilfe der Verdünnungsreihe in der Organbadkammer mit 10 ml enthaltener Nährlösung eine Isoprenalin-Konzentration von 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM hergestellt. Über eine Konzentration von 1000 nM Isoprenalin hinaus kam es bei Vorversuchen häufig zu irreversiblen Muskelflimmern oder sonstigen Schädigungen des Papillarmuskels, weshalb 1000 nM als Obergrenze festgelegt wurde. Die Kraftsteigerung des Papillarmuskels wurde währenddessen durchgehend in der Software LabChart aufgezeichnet. Nach Zugabe von

Isoprenalin wurden jeweils nach 60 Sekunden 10 Kraftausschläge markiert, deren Durchschnitt in die Auswertungen aufgenommen wurde.

Im Anschluss an die Versuchsreihe wurde die Organbadkammer viermal mit Nährlösung gespült, indem die Nährlösung jeweils durch einen Ablauf abgelassen und die Kammer mit 10 ml frischer Nährlösung aus dem Vorratsbehälter aufgefüllt wurde, um Restbestände des Isoprenalin in der Kammer zu entfernen. Darauf folgte eine erneute 10-minütige Äquilibration des Papillarmuskels in der Nährlösung.

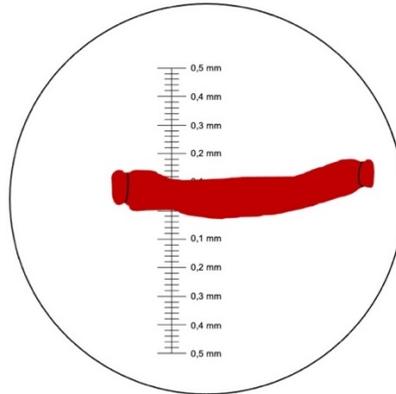
#### 2.3.4.2 Kontraktilitätsmessungen unter Steigerung der Vorspannung

Als eine weitere, mechanische, Belastungsmethode wurde die Steigerung der Vorspannung des Papillarmuskels gewählt. Dazu wurde an dem Kraftaufnehmer die Spannung vorsichtig manuell verändert und mithilfe von LabChart kontrolliert.

Nach der Isoprenalin-Versuchsreihe und anschließender 10-minütiger Äquilibration wurde unter kontinuierlicher Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz und fortwährender Aufzeichnung der entwickelten Kraft mit einer Vorspannung von 1 mN begonnen. Die Vorspannung wurde mit jeweils 90-sekündigem Abstand auf 2 mN, 3 mN und 5 mN erhöht. 60 Sekunden nach Steigerung der jeweiligen Vorspannung wurden 10 Kraftamplituden in LabChart markiert, deren Durchschnitt als Messwert in die Auswertungen aufgenommen wurde. In Einzelfällen wurde die Vorspannung bis auf 10 mN erhöht. Da es jedoch nach 5 mN vermehrt zu Muskelabrissen oder Muskelflimmern kam, wurden nur die Werte bis 5 mN ausgewertet.

### 2.4 Normierung der Messwerte

Das Papillarmuskelpräparat wurde nach Beenden der Kontraktilitätsmessungen aus dem Organbad entfernt und in einer Petrischale etwa 60 min getrocknet. Wie in Abb. 14 schematisch dargestellt, wurde der Durchmesser  $d$  des Papillarmuskels an seiner dünnsten Stelle mithilfe eines Mikrometers auf einem Objektträger unter dem zuvor benutzten Leica M50 Stereomikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) gemessen und ausgelesen (Abb. 14). Die Muskelquerschnittsfläche wurde mithilfe der Formel für die Berechnung einer Kreisfläche  $A_K = \pi \cdot (d/2)^2$  berechnet. Alle Messwerte wurden durch die jeweiligen Muskelquerschnittsflächen  $A_K$  dividiert, um für eine bessere Vergleichbarkeit eine Normalisierung der Werte zu erreichen.



**Abb. 14: Schematische Darstellung der Messung der Muskelquerschnittsfläche**

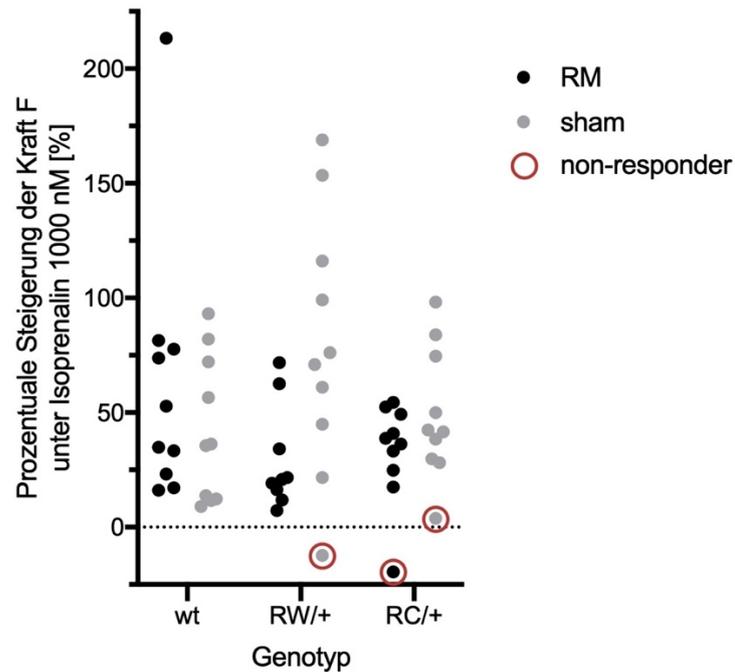
Der Papillarmuskel (in rot) wurde an seiner dünnsten Stelle auf einem Mikrometer lichtmikroskopisch ausgemessen.

## 2.5 Ausschlusskriterium

Von insgesamt 60 untersuchten Tieren sind die Messwerte derer mit in die Auswertung aufgenommen worden, die eine Kraftentwicklung gezeigt haben. Einflussfaktoren, wie eine Verletzung des Herzmuskelgewebes während der Induktion der Ischämie oder der Präparation sowie technische Probleme bei der Fixierung und Stimulation im Organbad, können zur Folge haben, dass vereinzelte Papillarmuskeln nicht adäquat bis hin zu gar nicht auf die Stimulation reagieren. Durch die sowohl pharmakologische als auch mechanische Stimulation ist jedoch eine Reaktion der Papillarmuskel zu erwarten, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

Um dies prüfen zu können, wurde die prozentuale Kraftsteigerung der Papillarmuskel unter maximaler Konzentration von Isoprenalin (1000 nM) und unter maximaler Steigerung der Vorspannung (5 mN) im Vergleich zum Basalwert unter elektrischer Stimulation berechnet. Auf alle berechneten Werte wurde ein *Cut-off*-Wert von 4% festgelegt. Damit wurden Tiere identifiziert, die durch die zuvor beschriebenen Einflussfaktoren als *non-responder* zu bezeichnen sind (Abb. 15).

Unter diesen definierten *Cut-off*-Wert fallen 3 von 60 Mäusen. Dabei handelt es sich um eine scheinoperierte RC/+ *knock-in* Maus, eine RC/+ *knock-in* Maus nach I/R sowie eine scheinoperierte RW/+ *knock-in* Maus.



**Abb. 15: Non-Responder Mäuseherzen**

Dargestellt wird die prozentuale Kraftsteigerung der Papillarmuskel der unterschiedlichen Genotypen nach I/R bzw. ohne Ischämie unter 1000 nM Isoprenalin im Vergleich zum Basalwert. Die rot umkreisten Mäuse fallen mit ihrer Reaktion unter den *Cut-off*-Wert von 4%.

## 2.6 Auswertung und Statistik

Die Rohdaten wurden in Excel-Tabellen (Microsoft Excel, Redmond, Washington, USA) zusammengefasst. Die statistische Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA).

Zum Vergleich von jeweils zwei Datensätzen wurde eine *two-way Analysis of Variance* (*two-way ANOVA*) benutzt, da beispielsweise auf die Variable „Kraft“ sowohl der Genotyp als auch die Isoprenalinkonzentration bzw. die Vorspannung als zwei verschiedene Faktoren einwirken, mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*.

Um die Beeinträchtigung des *remote* Myokards zwischen den Genotypen darzustellen (siehe Kapitel 3.2.4) wurde die Differenz zwischen der generierten Kraft der Papillarmuskeln nach I/R und dem Durchschnitt aller scheinoperierten Papillarmuskel des jeweiligen Genotyps für die einzelnen Messpunkte berechnet und mittels *two-way ANOVA* verglichen.

Für den Vergleich der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) von Isoprenalin zwischen den Versuchsgruppen wurde für jede Maus einzeln der  $EC_{50}$ -Wert berechnet. Dies bedeutet, es wurde die Konzentration von Isoprenalin ermittelt, die benötigt wird um 50% der maximal

möglichen Wirkung zu erreichen. Anschließend wurden die Mittelwerte der EC<sub>50</sub> der jeweiligen Versuchsgruppen mittels *one-way Analysis of Variance (one-way ANOVA)* verglichen (siehe Kapitel 3.2.5).

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) auf das *remote* Myokard, dem nicht-ischämischen Areal des Herzmuskels, 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion (I/R) untersucht.

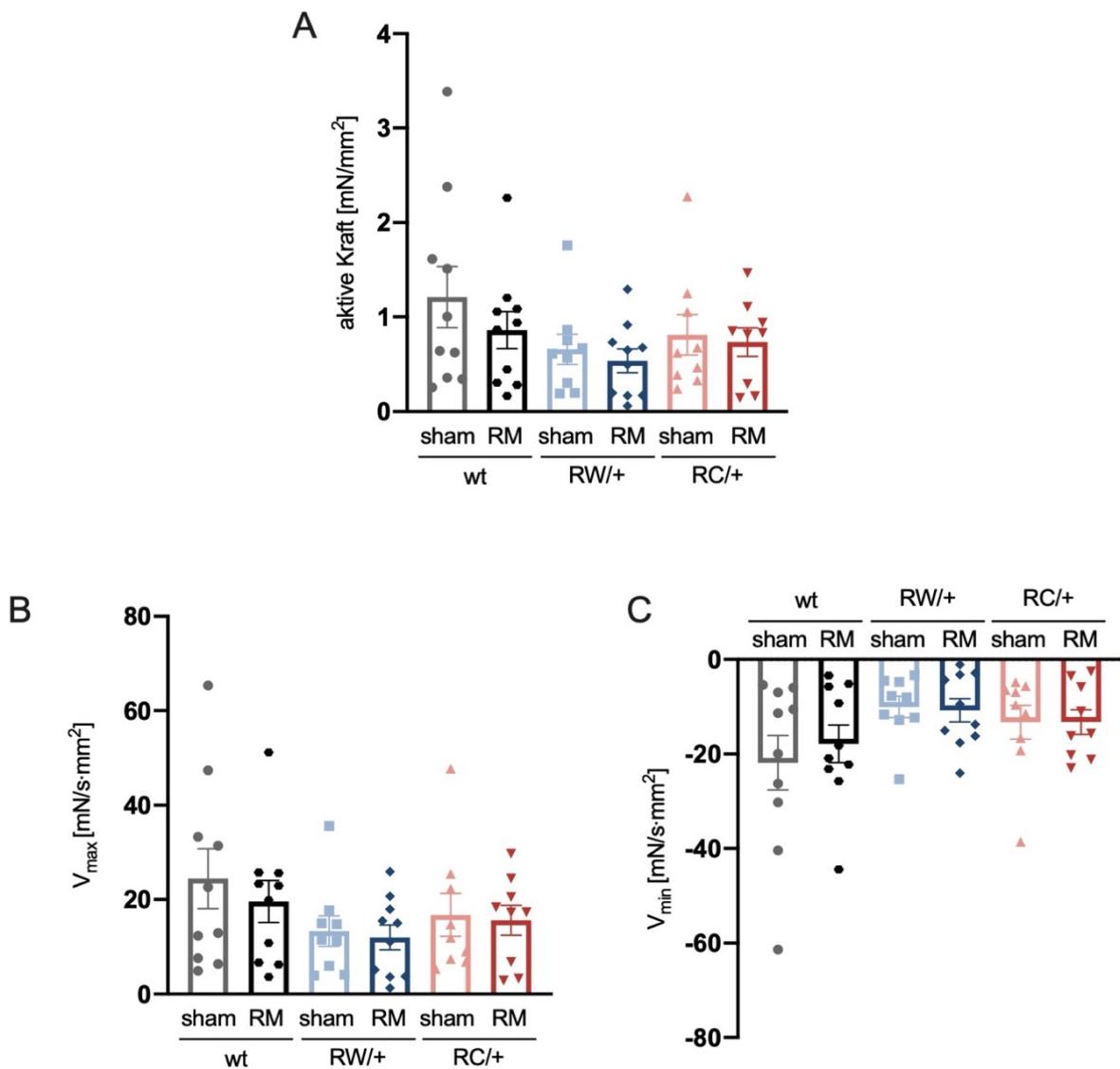
Wie zuvor in Kapitel 2.1 beschrieben, wurden hierzu zwei *knock-in* Mausmodelle mit humanen HCM-auslösenden Punktmutationen im *Myh6* Gen (RC/+ und RW/+) und ein Wildtyp-Mausmodell verwendet. Nach Ausschließen der Ausreißer (siehe Kapitel 2.5), wurden insgesamt 20 Wildtypen, 19 RW/+ Mutanten und 18 RC/+ Mutanten des Stammes 129/SvEv untersucht. Nach für alle Tiere identischen Vor-Operationen wurde eine Hälfte der jeweiligen Versuchsgruppe einer 60-minütigen Myokardischämie unterzogen, während bei der anderen Hälfte unter den gleichen Narkose-Bedingungen keine Ischämie induziert wurde (siehe Kapitel 2.2).

Um die Kraftreserven im jeweiligen Mausmodell zu charakterisieren, wurden 24 Stunden nach der jeweiligen Intervention die aktive Kraft, die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs sowie die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der isolierten Papillarmuskeln der Versuchstiere gemessen (siehe Kapitel 2.3). Nach Erhebung der Basalwerte wurde deren Entwicklung unter zusätzlichen pharmakologischen und mechanischen Belastungsbedingungen untersucht. Für eine Vergleichbarkeit der einzelnen Werte der Papillarmuskeln wurde auf die jeweilige Muskelquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup> normalisiert (siehe Kapitel 2.4).

### 3.1 Kraftmessungen unter Basalbedingungen

In Abb. 16 wird die maximale aktive Kraftentwicklung des linksventrikulären hinteren Papillarmuskels der verschiedenen Mausmodelle im Organbad 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. ohne Ischämie (*sham*) unter durchgehender elektrischer Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz verglichen. Es zeigte sich basal kein signifikanter Unterschied, jedoch tendenziell eine geringere Kraft der Papillarmuskeln aus Herzen von HCM-Mausmodellen (RC/+ und RW/+) im Vergleich zu Wildtypmäusen. Auch zeigte sich unter Basalbedingungen tendenziell eine reduzierte Kraftentwicklung des *remote* Myokards im Vergleich zur jeweiligen *sham*-Gruppe der Genotypen. Bei den Messungen der Geschwindigkeit des Muskelkraftanstiegs als weiteres Maß für Inotropie sind ähnliche Tendenzen zu beobachten. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls als Maß für die Lusitropie ist bei den Wildtypen ähnlich tendenziell geringer nach I/R als ohne Ischämie. Die HCM-

Mausmodelle dagegen zeigten nahezu identische Messwerte der Kraftabfallsgeschwindigkeit nach I/R sowie ohne Ischämie.



**Abb. 16: Vergleich der aktiven Kraftentwicklung von Papillarmuskeln aus Wildtyp- und HCM-Mäusen unter Basalbedingungen**

Aktive Kraft (A), Geschwindigkeit des Kraftanstiegs  $V_{\max}$  (B) und Geschwindigkeit des Kraftabfalls  $V_{\min}$  (C) von Papillarmuskeln von Wildtypen (wt) nach I/R (remote Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (sham; n=10), von RW/+-Mutanten nach I/R (n=10) und ohne Ischämie (n=9), von RC/+-Mutanten nach I/R (n=9) und ohne Ischämie (n=9) unter Basalbedingungen. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> bzw. mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche

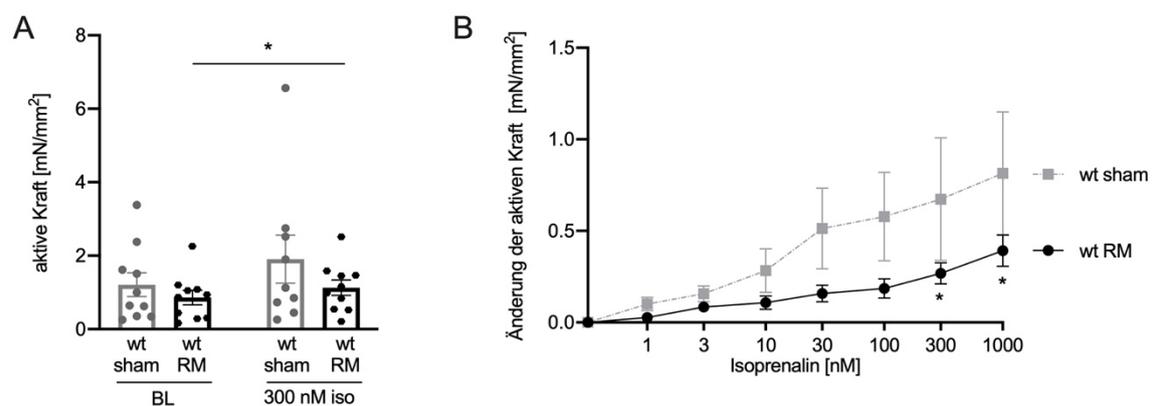
## 3.2 Aktive Kraftentwicklung unter Stimulation mit Isoprenalin

Wie in Kapitel 2.3.4.1 beschrieben, wurden die Papillarmuskel im Anschluss an die Basalmessungen nach einem festen Protokoll schrittweise mit dem beta-adrenergen Agonisten Isoprenalin stimuliert, um so dosisabhängig die Kontraktilität der Sarkomere zu erhöhen. Während der Messungen wurden jeweils die Muskelkraft, die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und die Geschwindigkeit des Kraftabfalls erhoben.

### 3.2.1 Kraftentwicklung der Wildtypen unter Isoprenalin

Unter Stimulation mit dem beta-Rezeptoragonisten Isoprenalin zeigte sich bis zu einer Konzentration von 1000 nM kein signifikanter Unterschied der Muskelkraft zwischen den Wildtypen nach I/R und den Wildtypen der *sham*-Gruppe. Jedoch liegen die Messwerte der *sham*-Gruppe, wie auch Abb. 17 zu entnehmen ist, durchgehend höher als die der Tiere nach Ischämie. Betrachtet man die Kraftentwicklung der einzelnen Gruppen, so ist festzustellen, dass das *remote* Myokard ab einer Gabe von 300 nM Isoprenalin einen signifikanten Anstieg der aktiven Kraft um  $0,27 \pm 0,06$  mN/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,03$ ) im Vergleich zur Muskelkraft unter Basalbedingungen zeigte. Die Wildtyp-Mäuse, die nicht einer Ischämie unterzogen wurden, zeigten durchgehend die Tendenz eines Anstiegs, jedoch keine Signifikanzen bis zu der Endkonzentration von 1000 nM Isoprenalin.

Wichtig festzuhalten ist hier bei den Wildtypen der *sham*-Gruppe eine breite Streuung der Messwerte.

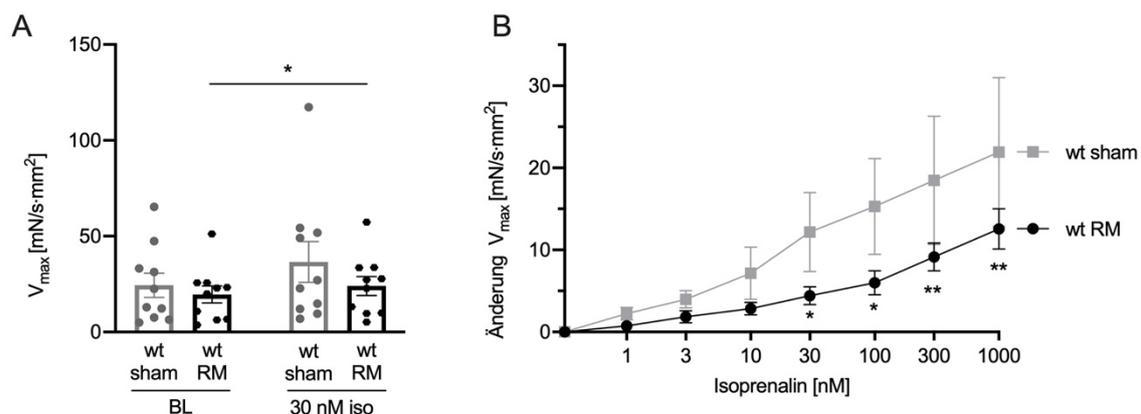


**Abb. 17: Aktive Kraftentwicklung von Wildtyp-Papillarmuskeln unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

A: Absolute Kraft von Wildtyp-Papillarmuskeln (wt) nach I/R (remote Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (sham; n=10) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 300 nM Isoprenalin (iso). B:

Relativer Anstieg der maximalen aktiven Kraft unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in  $\text{mN}/\text{mm}^2$  Muskelquerschnittsfläche; \* $p < 0,05$  vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

Als weiterer Messparameter für die Inotropie, also der Kontraktionskraft des Herzens, diene neben der maximalen aktiven Kraft die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs. Die Wildtyp-Mäuse der *sham*-Gruppe zeigten höhere Geschwindigkeitsmessungen als die Mäuse nach I/R, wenn auch keine signifikanten Unterschiede zu finden sind (siehe Abb. 18). Betrachtet man die Entwicklung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs, so zeigten die Wildtypen ohne Ischämieinduktion unter maximaler Stimulation einen Anstieg um  $21,92 \pm 9,07 \text{ N}/\text{s}\cdot\text{mm}^2$  im Vergleich zum Basalwert, wie in Abb. 18 zu sehen ist. Die Wildtypmäuse nach I/R hingegen reagierten unter  $1000 \text{ nM}$  Isoprenalin mit einem signifikanten Anstieg von  $12,55 \pm 2,47 \text{ mN}/\text{s}\cdot\text{mm}^2$  ( $p=0,01$ ) im Vergleich zum Basalwert. Bereits unter  $30 \text{ nM}$  Isoprenalin ist die Kraftanstiegsgeschwindigkeit im *remote* Myokard um  $4,43 \pm 1,09 \text{ mN}/\text{s}\cdot\text{mm}^2$  signifikant erhöht verglichen mit dem Basalwert ( $p=0,04$ ) (siehe Abb. 18). Es fällt erneut eine breite Streuung der Messwerte der *sham*-Mäuse auf.



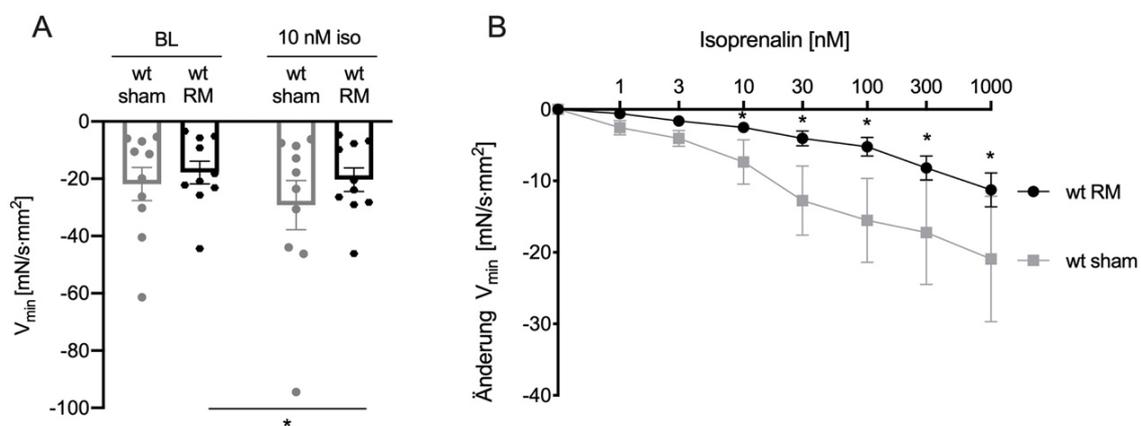
**Abb. 18: Maximale Geschwindigkeit der Kraftgenerierung von Wildtyp-Papillarmuskeln unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ( $V_{\max}$ ) von Wildtyp-Papillarmuskeln (wt) nach I/R (*remote* Myokard, RM;  $n=10$ ) und ohne Ischämie (*sham*;  $n=10$ ) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit  $30 \text{ nM}$  Isoprenalin (iso). B: Relativer Anstieg der maximalen Geschwindigkeit der Kraftgenerierung unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in  $\text{mN}/\text{s}\cdot\text{mm}^2$  Muskelquerschnittsfläche; \* $p < 0,05$  vs. Baseline-Wert, \*\* $p < 0,01$  vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

Die Stimulation der Papillarmuskeln mit dem beta-adrenergen Isoprenalin bewirkt nicht nur eine positive Inotropie, sondern auch eine positive Lusitropie, also Steigerung der Relaxationsfähigkeit. Daher wurde als dritter Parameter die maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls herangezogen. Hierbei sind unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit

Isoprenalin bei den Wildtypen der *sham*-Gruppe eine stärkere Abnahme der Kraftabfallsgeschwindigkeit als bei den Tieren nach I/R zu sehen (siehe Abb. 19). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind auch hier nicht zu verzeichnen.

Die Wildtypen nach einstündiger Intervention ohne Ischämieinduktion zeigten einen stärkeren Abfall der Geschwindigkeit des Kraftabfalls bis zu einer Stimulation mit der Endkonzentration von 1000 nM Isoprenalin, wobei dieser Abfall nicht signifikant ist im Vergleich zum Basalwert (siehe Abb. 19). Unter 1000 nM Isoprenalin ist die Geschwindigkeit des Kraftabfalls der *sham*-Gruppe um  $20,92 \pm 8,77$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p = 0,35$ ) niedriger als initial ohne Stimulation. Die Wildtypmäuse nach I/R dagegen reagierten unter 1000 nM Isoprenalin mit einer signifikanten Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls um  $11,26 \pm 2,36$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p=0,01$ ) im Vergleich zum Basalwert, wie in Abb. 19 zu sehen ist. Bereits ab einer Isoprenalin Konzentration von 10 nM ist beim *remote* Myokard ein signifikanter Abfall um  $2,52 \pm 0,64$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p=0,04$ ) im Vergleich zur Geschwindigkeitsmessung unter Basalbedingungen zu beobachten.



**Abb. 19: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls von Wildtyp-Papillarmuskeln unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

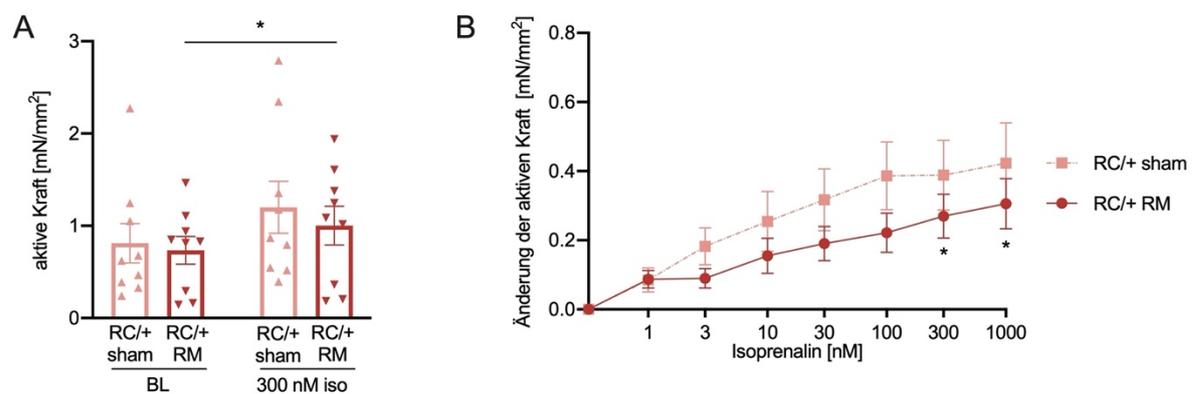
A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls ( $V_{min}$ ) von Wildtyp-Papillarmuskeln (wt) nach I/R (*remote* Myokard, RM;  $n=10$ ) und ohne Ischämie (*sham*;  $n=10$ ) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 10 nM Isoprenalin (iso). B: Relative Entwicklung der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \* $p<0,05$  vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

### 3.2.2 Kraftentwicklung der RC/+ Mutanten unter Isoprenalin

Auch die zwei untersuchten HCM-Mausmodelle zeigten in den Organbadversuchen unterschiedliche Reaktionen. Bei den RC/+ *knock-in* Mäusen der *sham*-Gruppe sind über

den gesamten Stimulationszeitraum höhere Mittelwerte der Kraftmessungen zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den RC/+ Mutanten nach I/R und ohne Ischämieinduktion zeigten sich jedoch nicht (siehe Abb. 20).

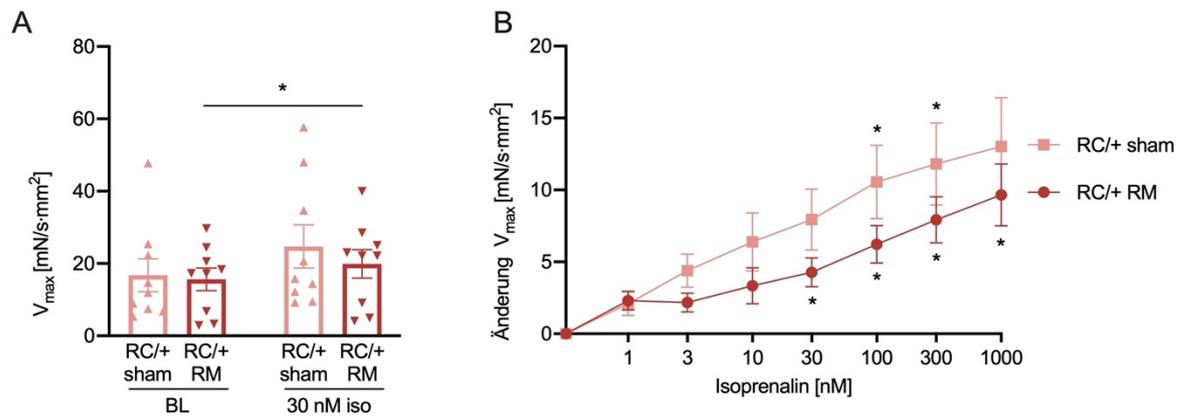
Unter 1000 nM Isoprenalin zeigten die Mutanten der *sham*-Gruppe einen Kraftanstieg von  $0,42 \pm 0,12$  mN/mm<sup>2</sup> verglichen mit dem Basalwert. Dabei handelt es sich nahezu um einen signifikanten Anstieg mit  $p = 0,08$ . In der Kraftentwicklung des *remote* Myokards RC/+ Mäuse fällt jedoch bereits unter 300 nM Isoprenalin ein signifikanter Anstieg mit  $0,27 \pm 0,06$  mN/mm<sup>2</sup> ( $p=0,04$ ) im Vergleich zum Basalwert auf.



**Abb. 20: Aktive Kraftentwicklung von Papillarmuskeln aus RC/+ *knock-in* Mäusen unter Basalbedingungen und unter Isoprenalin-Stimulation**

A: Aktive Kraft von R453C-mutierten Papillarmuskeln (RC/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=9) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 300 nM Isoprenalin (iso). B: Relativer Anstieg der maximalen aktiven Kraft unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \* $p < 0,05$  vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

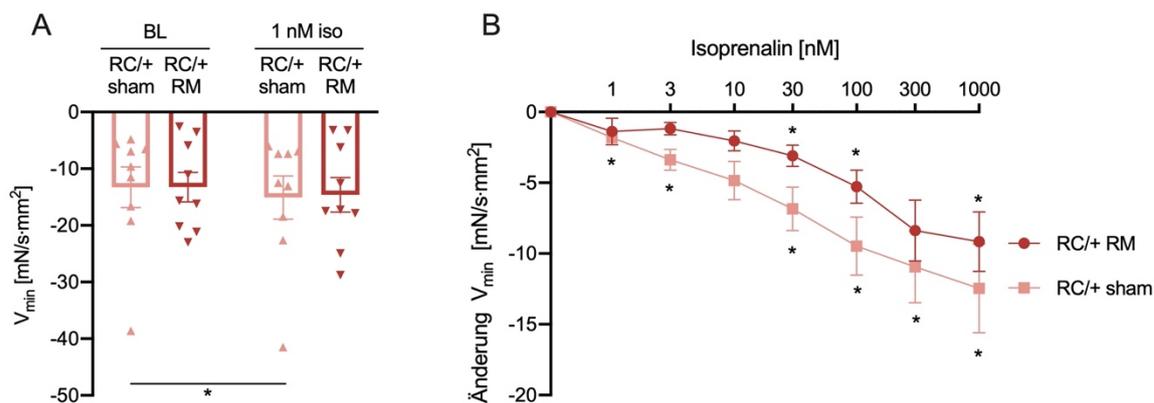
Betrachtet man die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs, so zeigten sich erneut höhere mittlere Messwerte bei der *sham*-Gruppe. Jedoch ist auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen dem *remote* Myokard und dem Myokard ohne Ischämie zu sehen (siehe Abb. 21). Bei den RC/+ Mausmutanten ohne Ischämie zeigte sich nach einer Gabe von 100 nM Isoprenalin eine signifikante Zunahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit von  $10,56 \pm 2,55$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p=0,04$ ) zum Basalwert. Bei den RC/+ Mäusen nach einstündiger Ischämie hingegen betrug die Geschwindigkeitszunahme unter 100 nM Isoprenalin signifikant  $6,21 \pm 1,31$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p=0,02$ ). Bereits unter einer Isoprenalinkonzentration von 30 nM reagierte das *remote* Myokard mit einer signifikanten Zunahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit von  $4,28 \pm 1,01$  mN/s·mm<sup>2</sup> ( $p=0,03$ ) im Vergleich zum Basalwert (siehe Abb. 21).



**Abb. 21: Maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs von RC/+ Papillarmuskeln unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalalin**

A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ( $V_{max}$ ) von R453C-mutierten Papillarmuskeln (RC/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=9) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 30 nM Isoprenalalin (iso). B: Relative Entwicklung der maximalen Geschwindigkeit der Kraftgenerierung unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \*p<0,05 vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

Bei Betrachtung der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls fällt bei den RC/+ *knock-in* Mäusen der *sham*-Gruppe bereits unter 1 nM Isoprenalalin eine signifikante Abnahme um  $1,82 \pm 0,36$  N/s·mm<sup>2</sup> (p=0,01) im Vergleich zum Basalwert auf. Die maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskel aus dem *remote* Myokard hingegen zeigte erst unter einer Stimulation mit 30 nM Isoprenalalin eine signifikante Änderung von  $3,10 \pm 0,75$  N/s·mm<sup>2</sup> (p=0,04) im Vergleich zum Basalwert (s. Abb. 22).

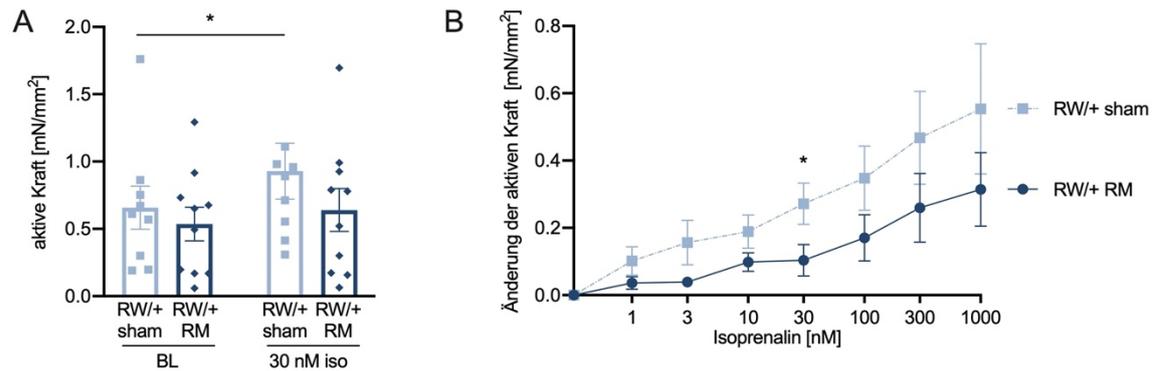


**Abb. 22: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls von RC/+ Papillarmuskeln unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls ( $V_{\min}$ ) von R453C-mutierten Papillarmuskeln (RC/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=9) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 1 nM Isoprenalin (iso). B: Entwicklung der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \* $p < 0,05$  vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

### 3.2.3 Kraftentwicklung der RW/+ Mutanten unter Isoprenalin

Die RW/+ *knock-in* Mäuse wurden als zweites HCM-Modell zum Vergleich herangezogen. Auch hier zeigten die Papillarmuskeln, die einer einstündigen Narkose ohne Ischämie ausgesetzt wurden, unter Isoprenalin-Stimulation durchgehend höhere Mittelwerte als die Papillarmuskeln aus Herzen nach I/R. Ähnlich wie im anderen HCM-Modell zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten nach I/R und ohne Ischämie. Die RW/+ Mutanten der *sham*-Gruppe reagierten unter 30 nM Isoprenalin verglichen mit dem Basalwert mit einem signifikanten Anstieg der aktiven Kraft um  $0,27 \pm 0,06$  mN/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,03$ ). Die Papillarmuskeln nach I/R hingegen zeigten durchgehend bis zu der letzten Konzentrationsstufe von 1000 nM Isoprenalin zwar einen tendenziellen Anstieg, jedoch keine Signifikanzen, im Vergleich zum Messwert unter Basalbedingungen (siehe Abb. 23).

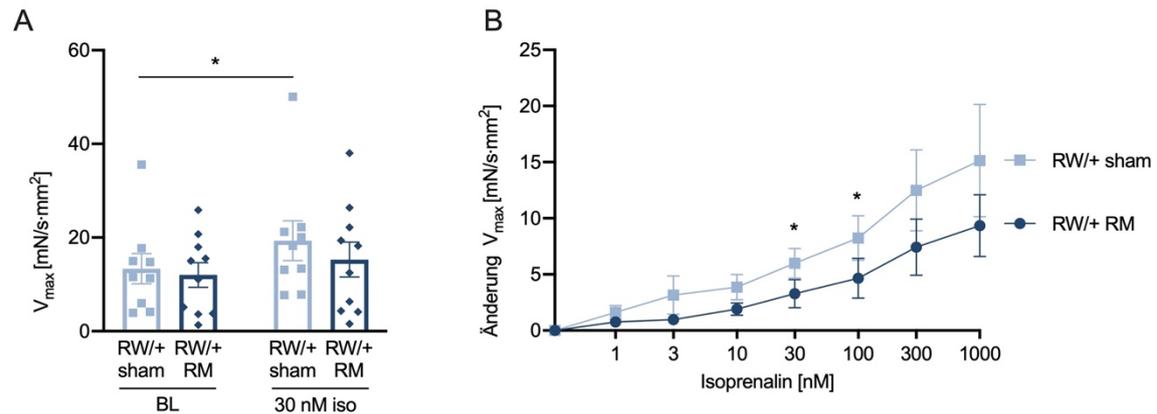


**Abb. 23: Aktive Kraftentwicklung von Papillarmuskeln aus RW/+ *knock-in* Mäusen unter Basalbedingungen und unter Isoprenalin-Stimulation**

A: Aktive Kraft von RW/+-Papillarmuskeln (RW/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 30 nM Isoprenalin (iso). B: Relativer Anstieg der maximalen aktiven Kraft unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \*p < 0,05 vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

Die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs der Papillarmuskeln der RW/+ Mutanten der *sham*-Gruppe stieg ab einer Konzentration von 30 nM Isoprenalin signifikant um  $5,98 \pm 1,33$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,03) im Vergleich zum Basalwert an. Unter 1000 nM betrug der Geschwindigkeitsanstieg  $15,14 \pm 5$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,16). Die RW/+ - mutierten Mäuse nach I/R zeigten unter der Isoprenalin-Stimulation einen ansteigenden Trend der Kraftanstiegsgeschwindigkeit, jedoch keine signifikante Änderung im Vergleich zum Basalwert, wie Abb. 24 zu entnehmen ist. Unter 1000 nM Isoprenalin betrug der Anstieg der Kraftanstiegsgeschwindigkeit des *remote* Myokards  $9,34 \pm 2,75$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,09) im Vergleich zum Basalwert.

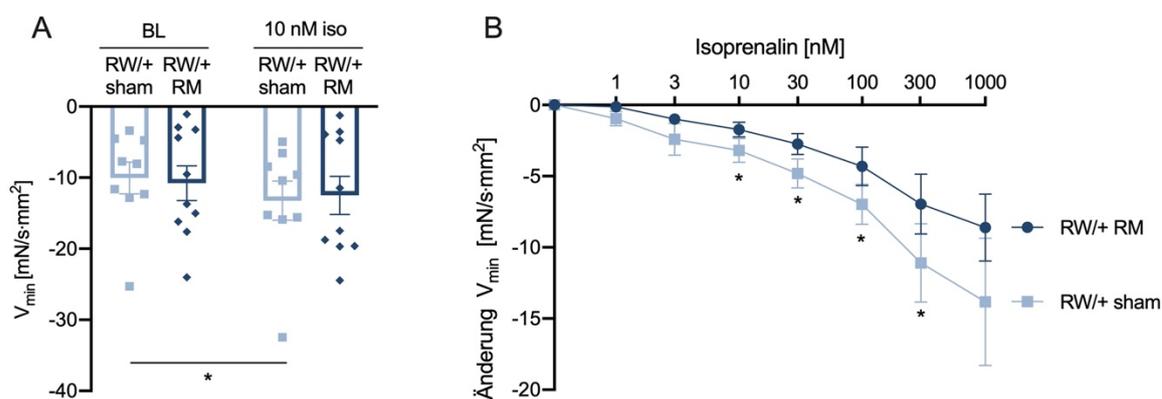
Vergleicht man die Mutanten nach I/R und ohne Ischämieinduktion direkt zu den einzelnen Messpunkten, so ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen.



**Abb. 24: Maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs von Papillarmuskeln aus RW/+ *knock-in* Mäusen unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ( $V_{max}$ ) von RW/+-Papillarmuskeln (RW/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 30 nM Isoprenalin (iso). B: Relative Entwicklung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \*p < 0,05 vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

Betrachtet man die maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls der RW/+ *knock-in* Mäuse in Abb. 25, so ist bei den Tieren der *sham*-Gruppe bereits unter 30 nM Isoprenalin eine signifikante Abnahme in der Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln im Vergleich zum Ausgangswert ( $4,82 \pm 1,02$  mN/s·mm<sup>2</sup>; p=0,02) festzustellen. Insgesamt zeigte die *sham*-Gruppe niedrigere Mittelwerte während der gesamten Stimulationszeit. Aber auch das *remote* Myokard reagierte in der Geschwindigkeit des Kraftabfalls mit einem abnehmenden Trend. Unter 1000 nM Isoprenalin ist nahezu signifikante Änderung der Kraftabfallsgeschwindigkeit des *remote* Myokards um  $8,61 \pm 2,36$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,07) zu verzeichnen (siehe Abb. 25).

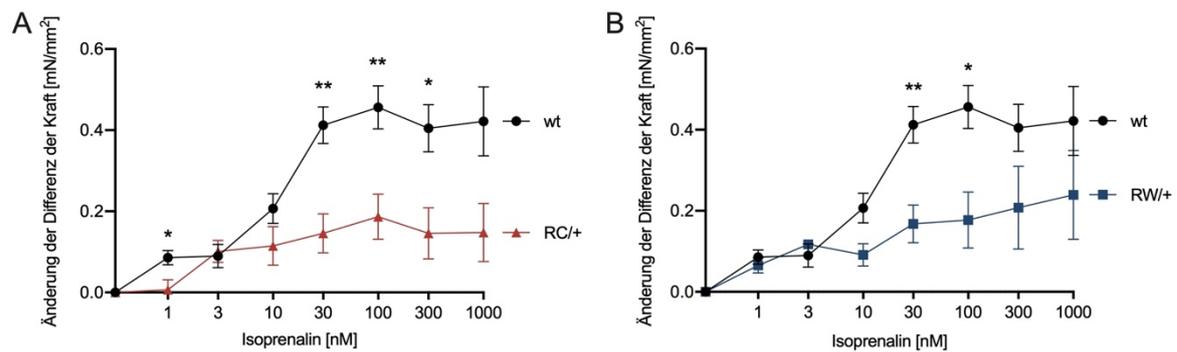


**Abb. 25: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls von Papillarmuskeln RW/+ *knock-in* Mäusen unter Basalbedingungen und unter Stimulation mit Isoprenalin**

A: Maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls ( $V_{\min}$ ) von RW/+ Papillarmuskeln (RW/+) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter Basalbedingungen (BL) und unter Stimulation mit 10 nM Isoprenalin (iso). B: Relative Entwicklung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter schrittweiser Stimulation mit Isoprenalin. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \*p < 0,05 vs. Baseline-Wert; *two-way ANOVA*.

### 3.2.4 Vergleich der Beeinträchtigung der Kraftentwicklung nach Ischämie und Reperfusion zwischen den Mausmodellen

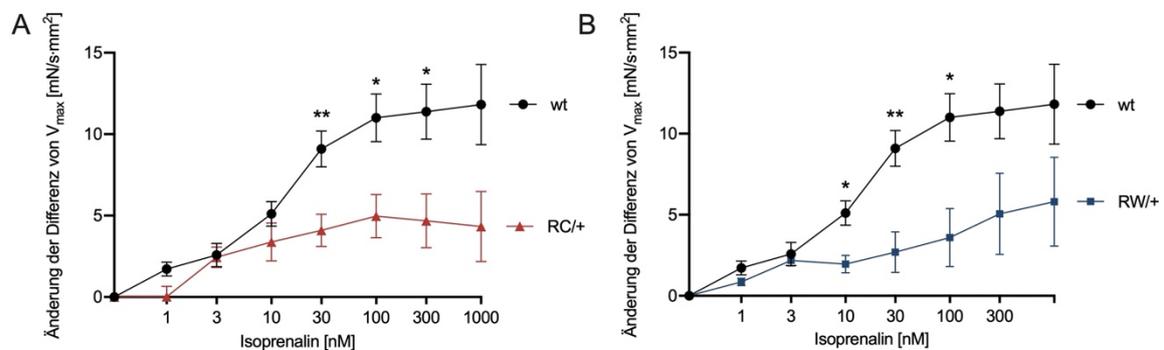
Um die Beeinträchtigung, die durch die einstündige Ischämie im *remote* Myokard hervorgerufen wurde, hervorzuheben und einen Vergleich zwischen den Mausmodellen zu erstellen, wurde für jede Versuchsbedingung die Differenz zwischen der maximal generierten Kraft der Papillarmuskel nach I/R und ohne I/R berechnet. Als Beispiel, unter 30 nM Isoprenalin zeigte sich eine Kraftdifferenz zwischen dem *remote* Myokard und dem gesunden Myokard der Wildtypen von  $0,41 \pm 0,04$  mN/mm<sup>2</sup>. Die RW/+ mutierten Mäuse wiesen eine Kraftdifferenz von  $0,16 \pm 0,04$  mN/mm<sup>2</sup> und die RC/+ Mäuse eine Kraftdifferenz von  $0,14 \pm 0,04$  mN/mm<sup>2</sup> auf. In Abb. 26 sind diese Werte für beide HCM-Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe aufgetragen. In Abb. 26 A ist zu sehen, dass unter 30 nM Isoprenalin eine um  $0,27 \pm 0,07$  mN/mm<sup>2</sup> (p=0,002) signifikant geringere Beeinträchtigung der maximal generierten Kraft der RC/+ Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen zu verzeichnen ist. Auch die RW/+ Mutanten zeigten unter einer Stimulation mit 30 nM Isoprenalin eine signifikant geringere Beeinträchtigung der Kraftgenerierung im *remote* Myokard als Wildtypen mit einer Differenz von  $0,24 \pm 0,06$  mN/mm<sup>2</sup> (p=0,004) (siehe Abb. 26 B). Der p-Wert ist bei den RW/+ *knock-in* Mäusen gering höher als bei den RC/+ Mäusen. Jedoch ist bei den RW/+ Mäusen insbesondere unter höherer Isoprenalin-Konzentration eine breitere Streuung der Messwerte zu beobachten.



**Abb. 26: Vergleich der Änderung der Kraftdifferenz des *remote* Myokards und des Myokards der *sham*-Gruppe zwischen Wildtyp-Mäusen und RC/+ Mutanten (A) bzw. Wildtyp-Mäusen und RW/+ Mutanten (B) unter Stimulation mit Isoprenalin**

Abgebildet sind in Wildtypen (wt) (n=10 RM und n=10 *sham*) und RC/+ *knock-in* Mäuse (n=9 RM und n=9 *sham*) (A) bzw. RW/+ *knock-in* Mäuse (n=10 RM und n=9 *sham*) (B) unter Isoprenalin Stimulation. Es wurde zu jedem Messzeitpunkt die Differenz des Durchschnitts der aktiven Kraft aller Mäuse der *sham*-Gruppe und der aktiven Kraft des *remote* Myokards im jeweiligen Mausmodell berechnet. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; \*\*p<0,01, \*p<0,05 RC/+ vs. wt oder RW/+ vs. wt; *two-way ANOVA*.

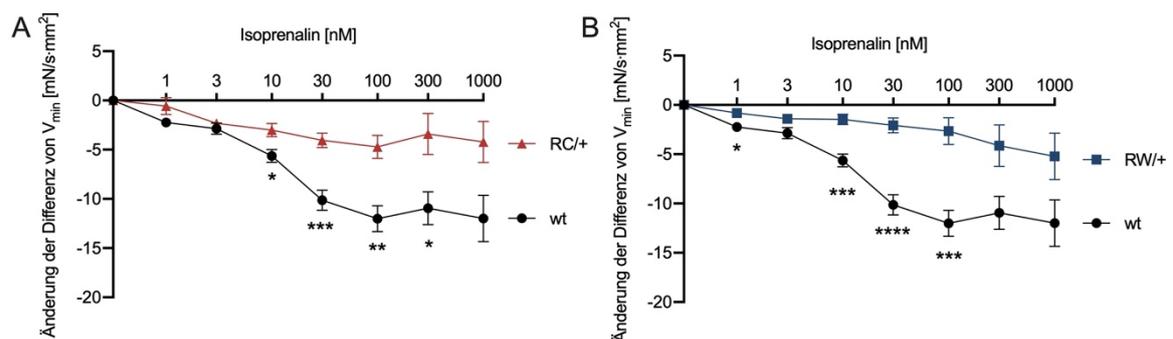
Auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs ist im *remote* Myokard der HCM-Mausmodelle (in Relation zum gesunden Myokard der HCM-Mausmodelle) geringer beeinträchtigt als im *remote* Myokard der Wildtypen. Unter 30 nM Isoprenalin zeigte sich eine um  $5,00 \pm 1,48$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,009) signifikant geringere Beeinträchtigung der RC/+ Mäuse nach I/R im Vergleich zu den Wildtypen nach I/R (siehe Abb. 27 A). Die RW/+ Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtypen bereits nach einer Gabe von 10 nM Isoprenalin eine um  $3,14 \pm 0,93$  mN/s·mm<sup>2</sup> (p=0,01) signifikant geringere Beeinträchtigung des *remote* Myokards auf (siehe Abb. 27 B).



**Abb. 27: Vergleich der Änderung der Differenz der Kraftanstiegsgeschwindigkeit des *remote* Myokards und des Myokards der *sham*-Gruppe zwischen Wildtyp-Mäusen und RC/+ Mutanten (A) bzw. Wildtyp-Mäusen und RW/+ Mutanten (B) unter Stimulation mit Isoprenalin**

Abgebildet sind in Wildtypen (wt) (n=10 RM und n=10 *sham*) und RC/+ *knock-in* Mäuse (n=9 RM und n=9 *sham*) (A) bzw. RW/+ *knock-in* Mäuse (n=10 RM und n=9 *sham*) (B) unter Isoprenalin Stimulation. Es wurde zu jedem Messzeitpunkt die Differenz des Durchschnitts der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs aller Mäuse der *sham*-Gruppe und der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs des *remote* Myokards im jeweiligen Mausmodell berechnet. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in  $\text{mN/s}\cdot\text{mm}^2$  Muskelquerschnittsfläche;  $***p<0,01$ ,  $*p<0,05$  RC/+ vs. wt oder RW/+ vs. wt; *two-way ANOVA*.

Vergleicht man die Beeinträchtigung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls im *remote* Myokard sind bereits unter niedrigerer Isoprenalin-Konzentration Unterschiede mit höheren Signifikanzen zu finden. Nach Gabe von 10 nM Isoprenalin zeigte sich bei den RC/+ Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant geringere Beeinträchtigung der Kraftabfallgeschwindigkeit um  $2,75 \pm 1,04 \text{ mN/s}\cdot\text{mm}^2$  ( $p=0,04$ ) (siehe Abb. 28 A). Bei den RW/+ Mutanten ist unter 10 nM Isoprenalin im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine sogar um  $3,27 \pm 0,08 \text{ mN/s}\cdot\text{mm}^2$  ( $p=0,002$ ) signifikant geringere Beeinträchtigung der Kraftabfallgeschwindigkeit festzustellen (siehe Abb. 28 B).



**Abb. 28: Vergleich der Änderung der Differenz der Kraftabfallgeschwindigkeit des *remote* Myokards und des Myokards der *sham*-Gruppe zwischen Wildtyp-Mäusen und RC/+ Mutanten (A) bzw. Wildtyp-Mäusen und RW/+ Mutanten (B) unter Stimulation mit Isoprenalin**

Abgebildet sind in Wildtypen (wt) (n=10 RM und n=10 *sham*) und RC/+ *knock-in* Mäuse (n=9 RM und n=9 *sham*) (A) bzw. RW/+ *knock-in* Mäuse (n=10 RM und n=9 *sham*) (B) unter Isoprenalin Stimulation. Es wurde zu jedem Messzeitpunkt die Differenz des Durchschnitts der Geschwindigkeit des Kraftabfalls aller Mäuse der *sham*-Gruppe und der Geschwindigkeit des Kraftabfalls des *remote* Myokards im jeweiligen Mausmodell berechnet. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in  $\text{mN/s}\cdot\text{mm}^2$  Muskelquerschnittsfläche;  $****p<0,0001$ ;  $***p<0,001$ ,  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  RC/+ vs. wt oder RW/+ vs. wt; *two-way ANOVA*.

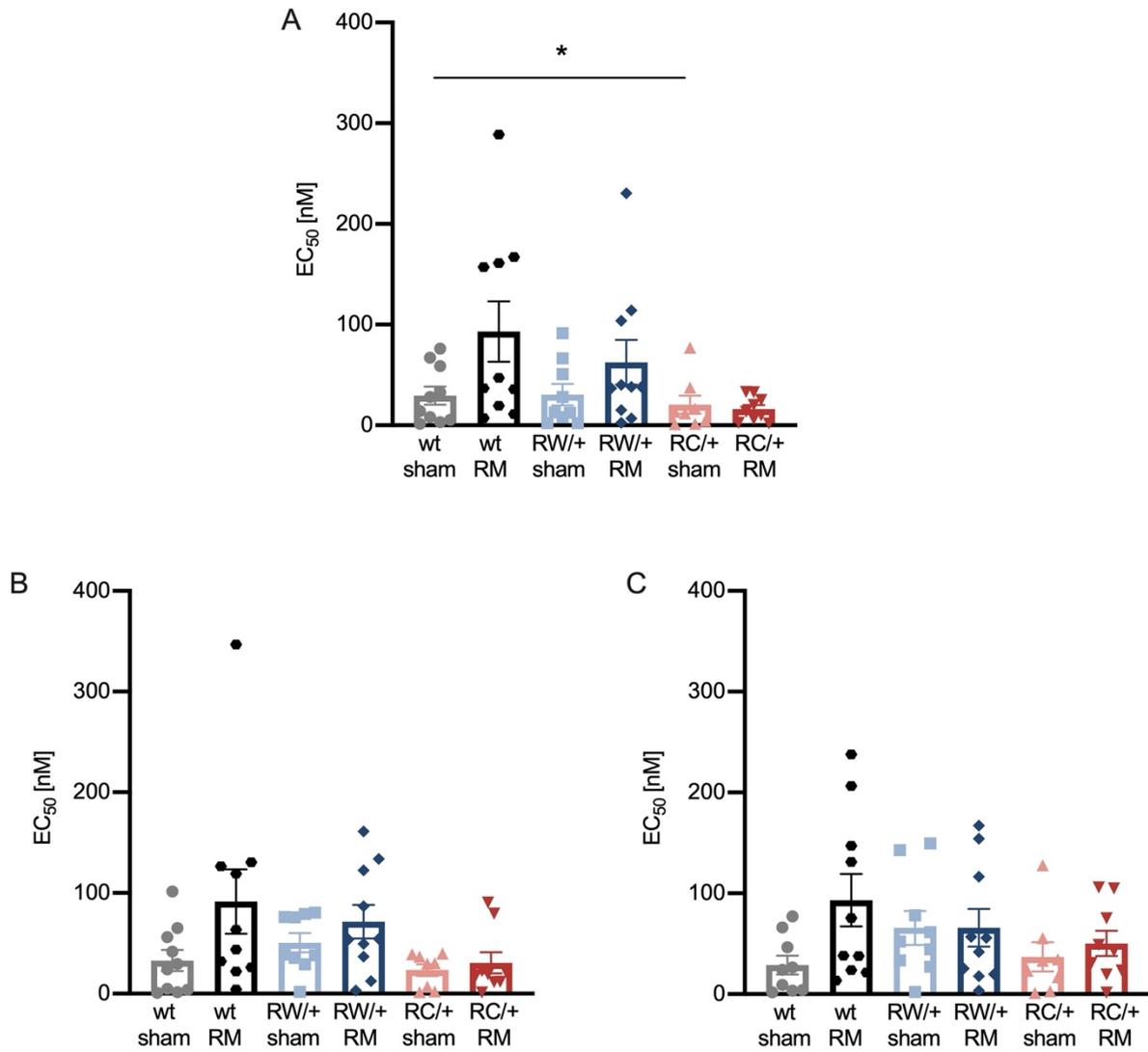
### 3.2.5 Vergleich der EC<sub>50</sub> der Mausmodelle

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung charakterisieren zu können, wurden die jeweiligen mittleren effektiven Konzentrationen (EC<sub>50</sub>) zwischen den Mausmodellen verglichen. Die EC<sub>50</sub> gibt an, welche Isoprenalin-Konzentration benötigt wird um 50 % der maximalen Kraft, der maximalen Geschwindigkeit des Kraftanstiegs bzw. der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls der Papillarmuskeln im jeweiligen Mausmodell zu erreichen.

In Abb. 29 A ist zu sehen, dass die HCM-Mäuse insgesamt tendenziell geringere Isoprenalin Konzentrationen benötigen, um eine halbmaximale Kraftentwicklung zu erzielen, als die Wildtypen. Für das *remote* Myokard der RC/+ Mutanten ist mit  $16,15 \pm 4,11$  nM sogar eine signifikant geringere halbmaximale effektive Konzentration erforderlich als für das *remote* Myokard der Wildtyp-Mäuse mit  $93,20 \pm 29,95$  nM ( $p=0,04$ ). Die RW/+ Mutanten bedürfen mit  $62,64 \pm 22,08$  nM eine deutlich höhere mittlere EC<sub>50</sub> und weisen somit keinen signifikanten Unterschied zu den Wildtypen auf.

Zudem zeigen die *sham*-Mäuseherzen tendenziell geringere EC<sub>50</sub> als das jeweilige *remote* Myokard der drei Mausmodelle, wobei keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind.

Betrachtet man die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und des Kraftabfalls sind analoge Tendenzen wie bei der Kraftentwicklung zu finden (siehe Abb. 29 B und C). Die Isoprenalin Konzentration, die benötigt wird, um die halbmaximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs im *remote* Myokard der Wildtypen zu erreichen, liegt im Mittel bei  $91,43 \pm 31,96$  nM und liegt somit tendenziell höher als bei den HCM-Modellen. Die EC<sub>50</sub> für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit des *remote* Myokards der RC/+ Mutanten liegt bei  $30,61 \pm 10,56$  nM und die der RW/+ Mutanten bei  $71,48 \pm 16,73$  nM (siehe Abb. 29 B). Die EC<sub>50</sub> für die Geschwindigkeit des Kraftabfalls liegt bei den Wildtypen nach I/R bei  $93,25 \pm 26$  nM und auch hier somit im Mittel vergleichsweise höher als bei den RC/+ Mutanten nach I/R mit  $50,29 \pm 12,44$  nM und bei den RW/+ Mutanten nach I/R mit  $65,91 \pm 18,67$  nM (siehe Abb. 29 C). Signifikante Unterschiede lassen sich nicht finden.



**Abb. 29: EC<sub>50</sub> Werte von Wildtyp- und HCM-Mäusen unter Wirkung von Isoprenalin**

EC<sub>50</sub> Werte für die maximale Kraft, Kraftanstiegsgeschwindigkeit und Kraftabfallsgeschwindigkeit von Wildtypen (wt) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und der *sham*-Gruppe (n=10), von RW/+-Mutanten nach I/R (n=10) und der *sham*-Gruppe (n=9) und von RC/+-Mutanten nach I/R (n=9) und der *sham*-Gruppe (n=9). Dargestellt als Mittelwert ± SEM in nM; \*p<0,05 wt RM vs. RC/+ RM; *one-way ANOVA*.

### 3.3 Aktive Kraftentwicklung unter Steigerung der Vorspannung

Nach der pharmakologischen Stimulation mit dem beta-Sympathomimetikum Isoprenalin wurde dieses aus dem Organbad ausgespült. Im Anschluss wurden die Papillarmuskel in einem zweiten Versuchsabschnitt mechanisch unter schrittweiser Steigerung der Vorspannung stimuliert, ausgehend von einer Vorspannung von 1 mN als Basalwert, um so gemäß des Frank-Starling-Mechanismus die Kontraktilität der Sarkomere zu erhöhen und zugleich die Muskelpräparate auf ihre Kompensationsfähigkeit von mechanischem Stress zu testen.

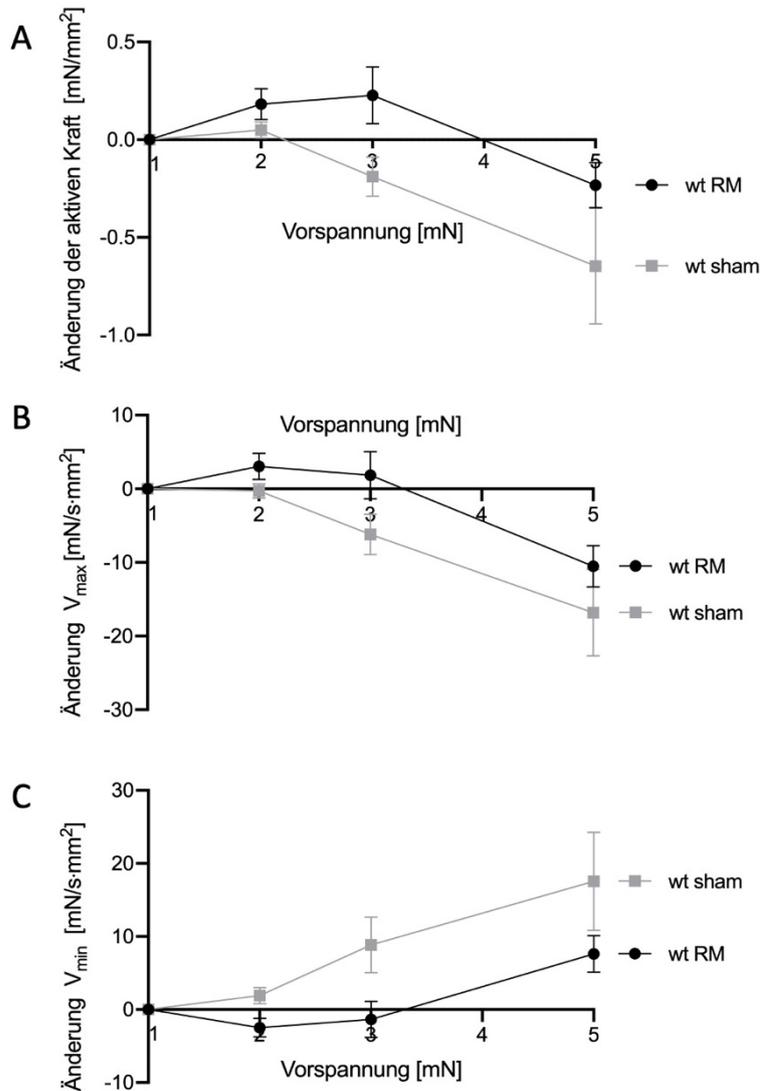
#### 3.3.1 Kraftentwicklung der Wildtypen unter Steigerung der Vorspannung

Die Wildtypen der *sham*-Gruppe reagierten unter Steigerung der Vorspannung auf 2 mN mit einem Kraftanstieg von  $0,05 \pm 0,04$  mN/mm<sup>2</sup> im Vergleich zum Basalwert unter einer Vorspannung von 1 mN. Danach folgte ein tendenzieller Abfall der aktiven Kraft. Bei den Wildtyp-Papillarmuskeln nach I/R zeigte sich bis zu einer Vorspannung von 3 mN die ein Kraftanstieg von  $0,23 \pm 0,15$  mN/mm<sup>2</sup>. Auch hier folgte danach ein tendenzieller Kraftabfall unterer weiterer Steigerung der Vorspannung. Signifikante Änderungen im Vergleich zum Ausgangswert in der aktiven Kraft fanden sich in beiden Versuchsgruppen nicht (siehe Abb. 30 A). Die Messwerte des *remote* Myokards der Wildtypen waren durchgehend unter Steigerung der Vorspannung größer als die des *sham*-Myokards der Wildtypen. Ein signifikanter Unterschied der Mäuse nach I/R zu der *sham*-Gruppe ist jedoch nicht zu finden (siehe Abb. 30 A).

Analog zu den Isoprenalin-Messungen wurde die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs als zusätzlicher Parameter für die Inotropie untersucht. Bis zu einer Vorspannung von 2 mN ist eine Zunahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit der Wildtypen nach I/R mit  $3,00 \pm 1,78$  mN/s·mm<sup>2</sup> im Vergleich zum Basalwert zu verzeichnen. Die Wildtypmäuse ohne Ischämie zeigten unter Steigerung der Vorspannung von 2 bis 5 mN die Tendenz einer Abnahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit. Danach zeigte sich eine Tendenz der Abnahme der aktiven Kraft. Auch hier liegen die Mittelwerte der Tiere nach I/R durchgehend höher als die ohne Ischämie (siehe Abb. 30 B).

In der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls, als Parameter für die Lusitropie, zeigten sich unter Steigerung der Vorspannung auf 2 mN zunächst ein stärkerer Kraftabfall der Wildtypen nach I/R um  $1,35 \pm 1,40$  mN/s·mm<sup>2</sup> im Vergleich zum Basalwert, gefolgt von anschließender Tendenz eines Rückgangs der Kraftabfallsgeschwindigkeit. Die Wildtypen

der *sham*-Gruppe zeigten unter Steigerung der Vorspannung hingegen durchgehend einen geringeren Kraftabfall (siehe Abb. 30 C). Signifikante Unterschiede zu den Basalmessungen zeigten sich auch hier nicht.



**Abb. 30: Entwicklung der aktiven Kraft (A), der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) von Wildtyp-Papillarmuskeln unter Steigerung der Vorspannung**

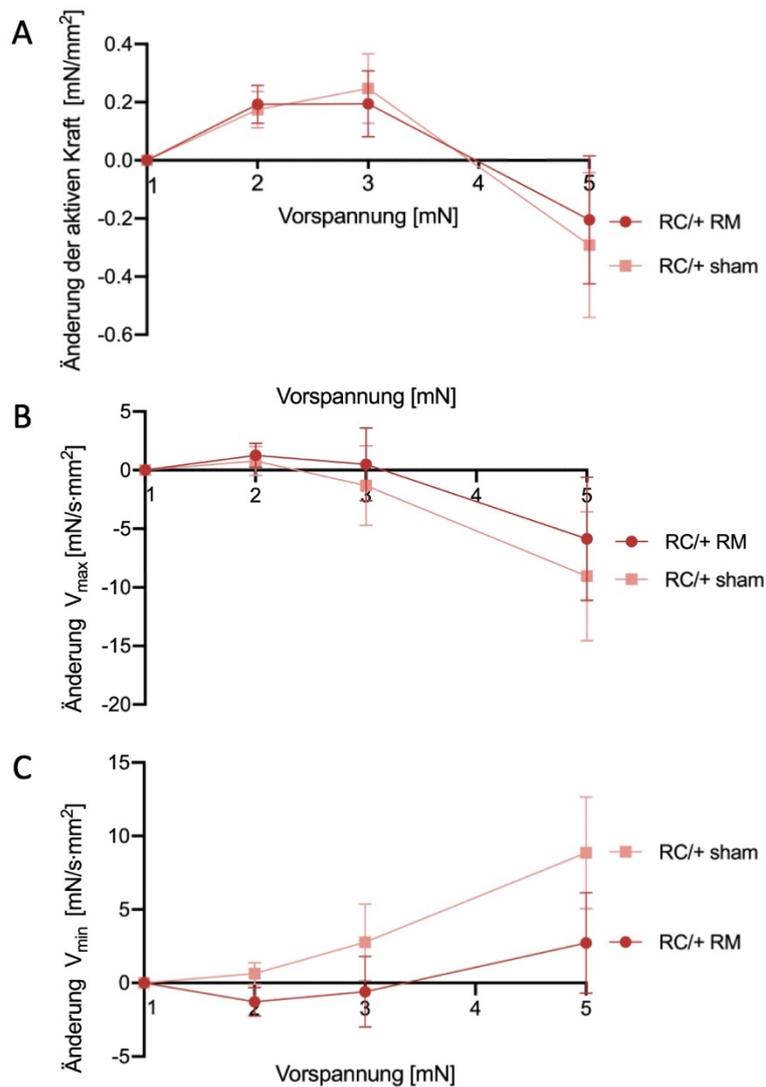
Aktive Kraftentwicklung (A), Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) von Papillarmuskeln aus Wildtyp-Mäuseherzen (wt) nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (*sham*; n=10) unter schrittweiser Steigerung der Vorspannung. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> bzw. mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; *two-way ANOVA*.

### 3.3.2 Kraftentwicklung der RC/+ Mutanten unter Steigerung der Vorspannung

Im RC/+ Mausmodell reagierten beide Versuchsgruppen bis zu einer Vorspannung von 3 mN mit einem tendenziellen Anstieg der Kraft. Unter 2 mN Vorspannung zeigte sich ein Kraftanstieg um  $0,17 \pm 0,06$  mN/mm<sup>2</sup> (p=0,09) im Vergleich zum Basalwert. Das *remote* Myokard der RC/+ Mäuse hingegen zeigte unter einer Vorspannung von 2 mN einen Kraftanstieg um  $0,19 \pm 0,07$  mN/mm<sup>2</sup> (p=0,07) im Vergleich zum Ausgangswert unter 1 mN. Unter Steigerung der Vorspannung auf 5 mN folgte ein tendenzieller Abfall der aktiven Kraft der Papillarmuskel. Signifikante Veränderungen konnten im RC/+ Modell unter Steigerung der Vorspannung nicht beobachtet werden (siehe Abb. 31 A).

Betrachtet man die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Steigerung der Vorspannung, so zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der RC/+ Mutanten der *sham*-Gruppe und der RC/+ Mutanten nach I/R im Vergleich zum Basalwert. Es zeigten sich analoge Tendenzen zu den Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 31 B).

Auch die maximale Geschwindigkeit des Kraftabfalls der RC/+ Mäuseherzen unter Steigerung der Vorspannung weist analoge Trends zu den Wildtypen auf (siehe Abb. 31 C).



**Abb. 31: Entwicklung der aktiven Kraft (A), der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) von RC/+ Papillarmuskeln unter Steigerung der Vorspannung**

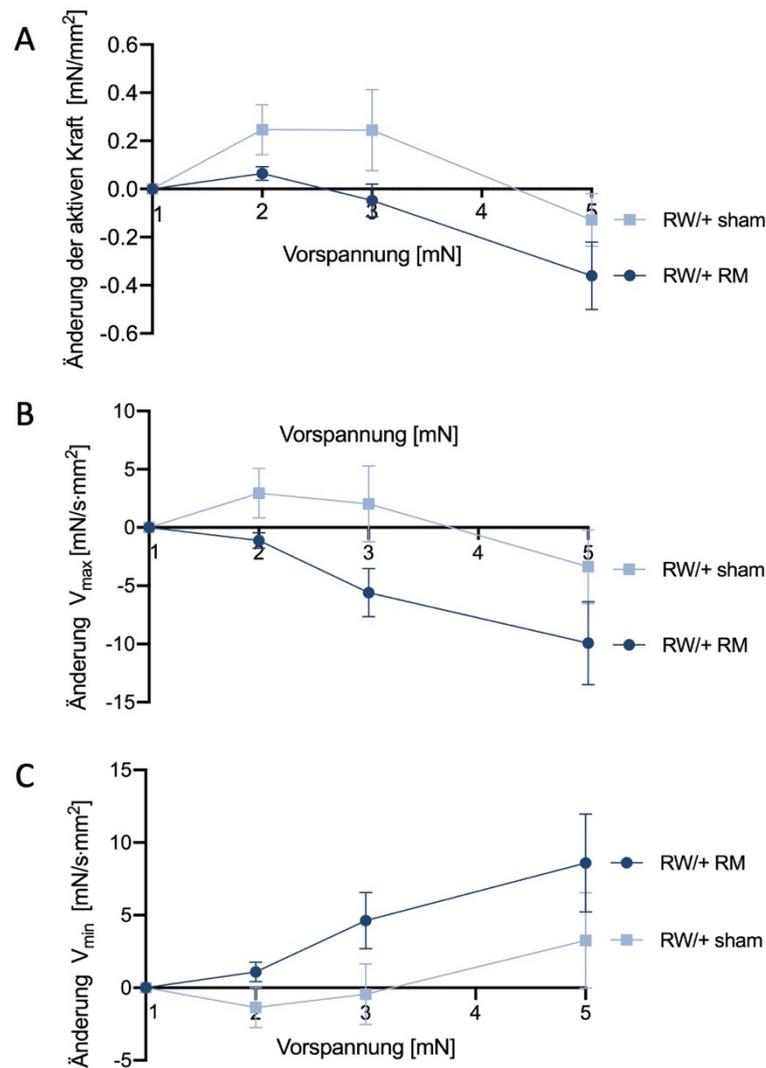
Aktive Kraftentwicklung (A), Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) von Papillarmuskeln aus RC/+ Mäuseherzen nach I/R (remote Myokard, RM; n=9) und ohne Ischämie (sham; n=9) unter schrittweiser Steigerung der Vorspannung. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> bzw. mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; *two-way ANOVA*.

### 3.3.3 Kraftentwicklung der RW/+ Mutanten unter Steigerung der Vorspannung

Die Papillarmuskel der RW/+ Mutanten ohne Ischämieinduktion zeigten bis zu einer Vorspannung von 2 mN die Tendenz eines Anstieges der aktiven Kraft um  $0,05 \pm 0,04$  mN/mm<sup>2</sup> im Vergleich zum Basalwert. Die Papillarmuskel der RW/+ Mutanten nach I/R zeigten dagegen bis zu einer Vorspannung von 3 mN eine Anstiegstendenz um  $0,23 \pm 0,15$  mN/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kraftmessung unter 1 mN. Danach folgte eine tendenzielle Abnahme der aktiven Kraft bis zu einer Vorspannung von 5 mN (siehe Abb. 32 A). Signifikante Veränderungen in der Kraftentwicklung unter schrittweiser Steigerung der Vorspannung konnten in beiden Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man die maximale Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Steigerung der Vorspannung in Abb. 32 B, so sind analoge Tendenzen sowohl der RW/+ Mutanten nach I/R als auch der *sham*-Gruppe zu den Wildtypen und den RC/+ Mutanten festzustellen.

Ähnlich sind in der maximalen Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Steigerung der Vorspannung keine signifikanten Veränderungen der RW/+ Mutanten ohne Ischämie und der RW/+ Mutanten nach I/R im Vergleich zum Basalwert zu sehen. Erneut lassen sich, wie in Abb. 32 C zu sehen, analoge Tendenzen zu den Wildtyp-Mäusen und den RC/+ Mäusen beschreiben.



**Abb. 32: Entwicklung der aktiven Kraft (A), der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und der Geschwindigkeit des Kraftabfalls (C) von RW/+ Papillarmuskeln unter Steigerung der Vorspannung**

Aktive Kraftentwicklung (A), Änderung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs (B) und Änderung der Geschwindigkeit des Kraftabstiegs (C) von Papillarmuskeln aus RW/+ Mäuseherzen nach I/R (*remote* Myokard, RM; n=10) und ohne Ischämie (*sham*; n=9) unter schrittweiser Steigerung der Vorspannung. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM in mN/mm<sup>2</sup> bzw. mN/s·mm<sup>2</sup> Muskelquerschnittsfläche; *two-way ANOVA*.

## 4 Diskussion

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine meist autosomal-dominant vererbte, heterogene Erkrankung des Herzmuskels, die häufig über Jahre unentdeckt bleibt [5, 9]. Sie verläuft langsam progredient, ist aber auch häufig ursächlich für einen plötzlichen Herztod, Herzrhythmusstörungen oder eine Herzinsuffizienz [21]. Die funktionellen Eigenschaften der hypertrophen Kardiomyopathie rücken in der Forschung immer mehr in den Fokus. Inzwischen ist bekannt, dass, bevor sich die typische linksventrikuläre Wandverdickung entwickelt, bereits eine Hyperkontraktilität des Myokards sowie eine diastolische Dysfunktion vorliegt [5, 73].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, wie sich die genetisch vorbelastete Herzmuskulatur nach einem akuten Ereignis, wie einem Myokardinfarkt, funktionell verhält. Dabei ist der Zeitraum 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R) besonders interessant, weil dann das kardiale *Remodeling* einsetzt und entscheidende Weichenstellungen für den weiteren klinischen Verlauf stattfinden. Nach der Ischämie leidet das reperfundierte Myokard noch unter einem Funktionsverlust (*Stunning*) [74], den das nicht-ischämische *remote* Myokard kompensieren muss.

### 4.1 Kraftentwicklung des *remote* Myokards unter beta-adrenerger Stimulation

Nicht nur das ischämische Gebiet des Herzens, sondern auch das nicht-ischämische *remote* Myokard entwickelt nach einem Myokardinfarkt eine gestörte Herzfunktion. Dies wurde bereits 1976 durch Wyatt et al. beschrieben [42] und dennoch war im Gegensatz zum ischämischen Teil des Herzens lange wenig über die funktionellen Eigenschaften des *remote* Myokards bekannt. Das *remote* Myokard muss den Funktionsverlust des I/R-Gebietes kompensatorisch ausgleichen, um eine ausreichende Pumpfunktion und Durchblutung gewährleisten zu können. Diese Belastung ist möglicherweise mitursächlich für die hohe Mortalität in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt [75].

In den zuvor beschriebenen Organbadversuchen wurden Papillarmuskel, die dem *remote* Myokard zugehörig sind, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur aktiven Kraftgenerierung untersucht. Es ist die Tendenz einer reduzierten Kraftentwicklung des *remote* Myokards unter Basalbedingungen im Vergleich zu der *sham*-Gruppe zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht (siehe Kapitel 3.1). Unter Stimulation mit Isoprenalin fällt das *remote* Myokard der Wildtypen zu allen Messzeitpunkten mit niedrigeren mittleren

Messwerten der aktiven Kraft, der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und der Geschwindigkeit des Kraftabfalls als die *sham*-Gruppe auf (siehe Kapitel 3.2).

Die reduzierte Kraftentwicklung im *remote* Myokard, obwohl das Gebiet nicht direkt durch die Ischämie/Reperfusion betroffen ist, lässt sich unter anderem durch eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik begründen [43]. Kronenbitter et al. haben die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten nach I/R untersucht. Die Kontraktilität einzelner Kardiomyozyten des *remote* Myokards ebenso wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik waren signifikant reduziert. Während die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Proteine unverändert waren, konnte als Ursache eine erhöhte Anzahl von unphosphorylierten Phospholamban-Monomeren im *remote* Myokard nachgewiesen werden. Demnach wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a vermehrt gehemmt und  $\text{Ca}^{2+}$  wird langsamer in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen [43]. Zwar ist in der vorliegenden Arbeit lediglich die Tendenz einer reduzierten Kraftentwicklung des *remote* Myokards zu beobachten, jedoch liegt die fehlende Signifikanz möglicherweise in dem hohen Standardfehler und damit der breiten Streuung der Messwerte der *sham*-Gruppe begründet (siehe Kapitel 3.2.1).

Da die Phosphorylierung von Phospholamban über die Proteinkinase A durch den Sympathikus gesteuert wird [76], konnte außerdem in den Versuchen von Kronenbitter et al. ein vermehrtes Ansprechen auf Isoprenalin beobachtet werden. Das Isoprenalin steigerte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik und damit die Sarkomerfunktion im *remote* Myokard stärker als im gesunden Myokard [43]. Vergleicht man diese Ergebnisse auf zellulärer Ebene mit den Ergebnissen der Papillarmuskelmessungen dieser Arbeit, so fällt auf, dass die Papillarmuskeln nach I/R ab einer Isoprenalin Konzentration von 300 nM mit einem signifikanten Kraftanstieg reagierten. Dagegen waren in der Kraftentwicklung der Papillarmuskeln ohne I/R keine Signifikanzen zu finden, wenn auch die Standardfehler sehr hoch sind. Auch die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs stieg ab 300 nM Isoprenalin im *remote* Myokard signifikant an. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalls zeigte bereits ab 30 nM Isoprenalin eine signifikante Änderung (siehe Kapitel 3.2.1). Da die verminderte Anzahl an Phospholamban im *remote* Myokard insbesondere die Diastole beeinflusst, kann hierdurch erklärt werden, dass die Relaxationsgeschwindigkeit bereits unter niedrigerer Isoprenalin Konzentration mit einer signifikanten Änderung reagierte.

Ein weiterer Erklärungsansatz für eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und reduzierte Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist in der Arbeit von Avner et al. zu finden. Hierbei wurden 3 Tage nach

Myokardinfarkt in einem murinen Modell posttranslationale Modifikationen von Sarkomerproteinen durch Phosphorylierungen und Glutathionylierungen festgestellt [77]. Auch eine Veränderung des Sarkomerproteins Titin ist als Anpassung an die hohe mechanische Belastung des *remote* Myokards beschrieben. Kötter et al. untersuchten in einem Langendorff-Mausmodell und einem Mausmodell mit permanenter Ligatur der linken vorderen Herzkranzarterie (LAD) die passive Spannung der Kardiomyozyten [44]. Eine deutliche Zunahme der Myokardsteifigkeit war bereits nach 3-tägiger permanenter Ischämie zu beobachten. In weiteren Untersuchungen zeigte sich eine Veränderung der Phosphorylierung des Titins ursächlich. Titin, als ein wichtiges Strukturprotein, ist für die Stabilität des Sarkomers verantwortlich. Hierbei scheint auch die durch die Ischämie induzierte Interleukin-6-Signalkaskade eine Rolle zu spielen. Es ist davon auszugehen, dass diese rapide Zunahme der Steifigkeit nach Ischämie der Prävention von Volumen-induzierter Überdehnung und Ruptur des *remote* Myokards dient [44]. Möglicherweise schränkt diese aus der Ischämie resultierende Steifigkeit der Myozyten mechanisch die Kraftentwicklung im *remote* Myokard unter Basalbedingungen ein.

## 4.2 Einfluss von HCM auf die Kraftentwicklung des *remote* Myokards unter beta-adrenerger Stimulation

In den zuvor beschriebenen Organbadversuchen zeigten sich unter Basalbedingungen tendenziell geringere Kraftparameter der RW/+ und RC/+Mutanten im Vergleich zu Wildtypen. Dabei war die aktive Kraft der RW/+ Mutanten im Mittel noch etwas geringer als die der RC/+ Mutanten. Signifikanzen zeigten sich jedoch nicht (siehe Kapitel 3.1).

Unter schrittweiser Isoprenalin-Stimulation waren weiterhin zwischen den Papillarmuskeln der HCM-Mutanten und der Wildtypen keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Kraft, Kraftanstiegsgeschwindigkeit und Kraftabfallsgeschwindigkeit (siehe Kapitel 3.2). Betrachtet man jedoch jeweils die Differenz der Papillarmuskeln mit und ohne I/R als Parameter für die Beeinträchtigung durch I/R, so ist eine signifikant geringere Beeinträchtigung der aktiven Kraft, der Kraftanstiegsgeschwindigkeit und der Kraftabfallsgeschwindigkeit im *remote* Myokard der HCM-Modelle im Vergleich zu den Wildtypen festzustellen. Analog sind auch die Kraftanstiegsgeschwindigkeit und Kraftabfallsgeschwindigkeit in den HCM-Modellen signifikant geringer beeinträchtigt (siehe Kapitel 3.2.4).

Weiterhin ist hervorzuheben, dass die HCM-Modelle tendenziell eine geringere Isoprenalin Konzentration als die Wildtypen benötigen, um die halbmaximale Kraft, Geschwindigkeit

des Kraftanstiegs oder Geschwindigkeit des Kraftabfalls des Papillarmuskels zu erreichen. Insbesondere für das *remote* Myokard der RC/+ Mäuse war eine signifikant geringere Konzentration zum Erreichen der halbmaximalen Kraft im Vergleich zum *remote* Myokard der Wildtypmäuse erforderlich. Dies spricht für eine höhere Isoprenalin-Sensitivität der HCM-Modelle (siehe Kapitel 3.2.5).

Im vorherigen Abschnitt wurden bereits als Erklärung für die tendenziell reduzierte Kraftentwicklung im *remote* Myokard Veränderungen der Strukturproteine des Sarkomers und eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik diskutiert. Zu den Auswirkungen von HCM auf das *remote* Myokard ist in der Literatur wenig zu finden. Im Folgenden werden verschiedene Erklärungsansätze für die funktionellen Veränderungen des *remote* Myokards im HCM-Modell diskutiert.

Bei Vorliegen von HCM-auslösenden Mutationen ist noch vor dem hypertrophischen *Remodeling* eine Hyperkontraktilität der Kardiomyozyten und diastolische Dysfunktion beschrieben [73]. Die Hyperkontraktilität wurde bereits 2001 durch Seidman und Seidman et al. beschrieben [5]. Die tatsächliche Ausbildung eines HCM-Phänotyps findet in den verschiedenen mutationstragenden Mausmodellen in unterschiedlichem Alter statt [78]. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutationen R453C and R719W beschreiben Blankenburg et al. im Alter von 8 Lebenswochen noch kaum Fibrose oder Hypertrophie des murinen Myokards. Erst im Alter von 26 Wochen war eine signifikante Fibrosierung zu erkennen [79]. Somit ist in dem gewählten Alter der Versuchstiere von 10 bis 12 Wochen noch von keiner linksventrikulären Hypertrophie durch die Mutation auszugehen, jedoch kann eine Hyperkontraktilität und diastolische Dysfunktion auftreten.

#### 4.2.1 Diastolische Dysfunktion

Ho et al. beschrieben 2002, dass MYH7-Mutationen die diastolische Funktion direkt beeinflussen. In echokardiographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die ventrikuläre Relaxation bereits ohne Auftreten einer Hypertrophie eingeschränkt ist [73]. Zu erwarten wäre daher insbesondere eine reduzierte Geschwindigkeit des Kraftabfalls in den HCM-Modellen. Wenn auch keine Signifikanzen vorliegen, so ist insbesondere bei den RW/+ Tieren der Trend einer reduzierten Kraftabfallsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Wildtypen festzustellen (siehe Kapitel 3.1).

Möglicherweise ist ein Grund hierfür die sehr früh beginnende Fibrosierung, wie 2010 Ho et al. gezeigt haben [80]. Profibrotische genetische Signalwege werden früh aktiviert, noch

bevor die myokardiale Hypertrophie einsetzt. Insbesondere MYH7-Mutationen lösen einen frühen Anstieg der Kollagensynthese aus, die jedoch zunächst durch den Abbau ausgeglichen wird, sodass die Fibrinogenese begrenzt bleibt und möglicherweise daher auch in den Untersuchungen von Blankenburg et al. noch nicht sichtbar waren. Bei einer ausgeprägten hypertrophen Kardiomyopathie übersteigt die Synthese den Abbau und resultiert erst dann in einer manifesten Myokardfibrose [80]. Zu überlegen wäre hierbei, ob die Fibrosierung bereits vorher Einfluss auf die Kraftentwicklung hat und daher in den Versuchen der vorliegenden Arbeit basal die Kraftentwicklung in den HCM-Papillarmuskeln tendenziell reduziert ist.

Weiterhin konnte in der Studie von Ho et al. gezeigt werden, dass die erhöhte Kollagensynthese und reduzierte Relaxation bei der MYH7-Mutation im Vergleich zu der MYBPC3-Mutation stärker ausgeprägt waren [80]. Passend hierzu entwickelt sich im Krankheitsverlauf bei den MYH7-Mutanten früher eine linksventrikuläre Hypertrophie [81, 82]. Diese Eigenschaften sind einer der wenigen Genotyp-Phänotyp Korrelationen, die bisher nachgewiesen werden konnten, und zeigen dass Mutationen im MYH7-Gen, kodierend für die beta-Myosin-Schwere-Kette, vergleichsweise als maligne zu charakterisieren sind.

#### 4.2.2 Ca<sup>2+</sup>-Kinetik

Die diastolische Dysfunktion kann auch durch die Ca<sup>2+</sup>-Kinetik begründet werden. Mutationen der HCM sensibilisieren die Myofilamente gegenüber Ca<sup>2+</sup>, sodass eine verlängerte Relaxation und somit auch verzögerte Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum resultiert [83]. In Versuchen mit von induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten (*iPSC-CMs*) konnten Wu et al. eine zytosolische diastolische Ca<sup>2+</sup>-Überladung, eine reduzierte Ca<sup>2+</sup>-Kinetik (reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit) und erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Sensibilität des Myofilaments in HCM nachweisen [84]. Als Ursache wurde eine vermehrte Expression von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und TRP-Kanälen (engl.: *transient receptor potential channels*) gefunden. Als eine weitere Ursache wird eine verminderte Aktivität des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers in der Membran der Kardiomyozyten durch einen niedrigen Na<sup>+</sup>-Gradienten vermutet. Eine Besserung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und der diastolischen Funktion wurde dabei durch medikamentöse Blockade der Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>- Kanäle erreicht [84].

Hier ist erneut auf die reduzierte Ca<sup>2+</sup>-Kinetik des *remote* Myokards durch vermehrte Hemmung der SERCA2a während der Diastole zu verweisen (siehe Kapitel 4.1, Kronenbitter et al. [43]). Da unter Basalbedingungen die Kraftentwicklung im *remote*

Myokard der HCM-Modelle tendenziell geringer ausfällt, ist dies möglicherweise auf die additive Wirkung der reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik der HCM und des *remote* Myokards zurückzuführen. Den zusätzlichen Stress durch Isoprenalin kompensiert das *remote* Myokard der HCM-Modelle jedoch besser als das *remote* Myokard der Wildtypen. Eine Hypothese wäre, dass durch die beta-adrenerge Signalkaskade die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die im HCM-Modell bereits vermehrt exprimiert sind, weiter aktiviert werden (siehe Abb. 6, Kapitel 1.5.1) und die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung im Zytosol verstärkt wird. Eine Rückkopplung könnte die SERCA2a Aktivität während der Diastole steigern, wodurch die I/R-vermittelte Beeinträchtigung der Kraftgenerierung (siehe Kronenbitter et al. [43]) im HCM-Modell geringer ausgeprägt wäre. Diese Hypothese bietet einen Ansatz für zukünftige Studien zu Calcium-Messungen und Western blot Analysen u.a. der Phospholamban-Phosphorylierung im *remote* Myokard von HCM-Modellen.

#### 4.2.3 ATPase-Aktivität und ATP-Verbrauch

Es wird angenommen, dass unter physiologischen Bedingungen während der Diastole nur 10 % der Myosinmoleküle an Aktin gebunden sind. Während der Systole steigt der Anteil auf 30 %. Die Aktin-gebundenen Myosinmoleküle haben einen hohen ATP-Umsatz und erzeugen letztlich die Kraft für die Muskelkontraktion. Etwa 50 % bis 60 % der Myosinmoleküle sind ungebunden und haben daher einen niedrigen ATP-Umsatz. Diese befinden sich einem sogenannten super-relaxierten Zustand. Die dritte Gruppe sind die schwach an Aktin gebundenen Myosinmoleküle mit 30 % bis 40 %. Diese haben einen intermediären ATP-Umsatz [12, 85, 86].

Witjas-Paalberends et al. führten *in vitro* Messungen der Kraftentwicklung und ATPase-Aktivität von Herzmuskelstreifen mit Mutationen im MYBPC3-Gen und MYH7-Gen durch. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der ATPase-Aktivität, jedoch im Verbrauch von ATP. Die MYH7-Mutationen hatten in den Versuchen den größten ATP-Umsatz [87]. Möglicherweise ist dies auf die folgende Hypothese zurückzuführen, dass sich ein Teil der Myosinmoleküle bei Vorliegen von HCM vom super-relaxierten Zustand in Richtung Aktin-gebundenen Zustand verschieben und somit an der Muskelkontraktion teilnehmen [12, 88, 89]. Dieser Mechanismus könnte die geringere Beeinträchtigung des *remote* Myokards der HCM-Modelle nach I/R erklären. Während die Kraftmessungen des *remote* Myokards der Wildtypen eine deutliche Differenz zu dem gesunden Myokard zeigen, ist diese bei den HCM-Mutanten signifikant geringer. Die gesteigerte Anzahl an Aktin-gebundenen Myosinmolekülen und der höhere ATP-Verbrauch sind möglicherweise eine

Erklärung für die Hyperkontraktilität und diese wiederum für die vermehrten Kraftreserven unter Belastung, die sich bei den HCM-Mutanten nach I/R im Vergleich zu den Wildtypen nach I/R gezeigt haben.

### 4.3 Einfluss von HCM auf die Kraftentwicklung und den Frank-Starling-Mechanismus

In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden die Papillarmuskel mechanischen Belastungsbedingungen ausgesetzt. Eine Steigerung der Vorspannung wurde durch die Papillarmuskel der Wildtypmäuse und der HCM-Mutanten ähnlich kompensiert. Die aktive Kraft, Geschwindigkeit des Kraftanstiegs und Geschwindigkeit des Kraftabfalls stiegen bis zu einer Vorspannung von 2 mN (teilweise noch sehr gering bis 3 mN) tendenziell in allen Versuchsgruppen an. Danach folgte ein abnehmender Trend der Messwerte (siehe Kapitel 3.3). Diese Entwicklung der Kraft kann durch den Frank-Starling-Mechanismus erklärt werden. Durch kurzfristige Änderungen der Vor- und Nachlast des Herzens entsteht eine Vordehnung der Myofilamente. Dies schafft eine Änderung der Aktin-Myosin-Überlappung sowie eine dehnungsabhängige Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität. Letzteres wird auch als längenabhängige Aktivierung der Myofilamente bezeichnet [72]. Die optimale Vordehnung, um eine maximale Kraft zu erreichen, beträgt beim Menschen 2,2  $\mu\text{m}$ . Bei einer Überdehnung nimmt die Kraft wieder ab [71].

Sequeria et al. untersuchten Gewebe des linken Ventrikelseptums von HCM-betroffenen Patienten, welche nach Myektomie bei linksventrikulärer Ausflusstraktobstruktion gewonnen werden konnten. Es wurde eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität und eine reduzierte längenabhängige Aktivierung des Sarkomers durch HCM-auslösende *missense*-Mutationen festgestellt [90]. Nach Steigerung der Sarkomerlänge von 1,8 auf 2,2  $\mu\text{m}$  reagierte zwar das MYH7-mutierte Myokard mit einem signifikanten Kraftanstieg, jedoch in geringerem Maße als die Kontrollgruppe. Als Ursache dessen wurden posttranslationale Modifikationen vermutet [90]. In der klinischen Studie von Radbill et al. konnten diese Ergebnisse jedoch nicht widerspiegelt werden und entsprechen eher den vorliegenden Ergebnissen, die unter steigender Vorspannung keinen Unterschied in der Kraftentwicklung zwischen HCM-Mutanten und Wildtypen gezeigt haben. Hierbei wurden bei betroffenen Patienten mit einem implantierbaren Schrittmacher unter EKG- und Blutdruck-Kontrollen steigende Schrittmacherfrequenzen aufgezeichnet. Es konnten keine Unterschiede in den Kontraktilitätsmessungen festgestellt werden, sodass von einer fehlenden längenabhängigen Aktivierung ausgegangen wurde [91].

#### 4.4 Limitationen der Arbeit

Mit 48,3 % aller zellbasierten und Tier-Modelle sind Mausmodelle in der HCM-Forschung die am meisten verwendeten [78]. Nichtsdestotrotz sind aus Mausmodellen gewonnene Daten nicht unmittelbar auf Menschen übertragbar.

Zudem ist bezüglich der hier verwendeten Myosin-Mutanten ein genetischer Unterschied zwischen Maus und Mensch vorhanden. Die untersuchten humanen Mutationen befinden sich beide auf dem MYH7-Gen, welches für das beta-MHC (Myosin-Schwere-Kette) kodiert. Das beta-MHC ist mit > 90 % die Isoform, die am häufigsten im menschlichen Ventrikel vorkommt. Dagegen besteht der erwachsene Ventrikel von Mäusen nahezu nur aus alpha-MHC, welches wiederum vom *Myh6*-Gen kodiert wird. Daher wurden die humanen MYH7-Mutationen durch homologe Rekombination im Mausmodell auf *Myh6* überführt, deren kodierte Aminosäuresequenz (alpha-MHC) im Bereich des Myosinkopfes zwar zu > 95 %, aber nicht vollständig, mit der von beta-MHC übereinstimmt [20].

Ferner schränkt die *ex vivo*-Situation der durchgeführten Untersuchungen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ein. Das Organbad bietet einerseits eine einzigartige Möglichkeit die Muskelkontraktilität *in vitro* hinsichtlich (patho-)physiologischer Eigenschaften und pharmakologischer Einflüsse zu untersuchen. Auch wenn dies beabsichtigt ist, ist andererseits zu beachten, dass metabolische, neurohumorale, vaskuläre und mechanische Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Die Umgebungsbedingungen bleiben artifiziell. Der Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffe in der Organbadkammer ist durch Diffusion begrenzt [64].

Eine weitere Limitation, die zu nennen ist, sind die oben beschriebenen hohen Standardfehler, insbesondere der *sham*-Versuchsgruppen. Möglicherweise wären bei Rekrutierung einer größeren Versuchskohorte mehr Signifikanzen aufgetreten. Jedoch sind die Kohortengrößen analog zu Vorversuchen der Arbeitsgruppe gewählt worden und insbesondere bei Tierversuchen spielt die ethische Vertretbarkeit stets eine wichtige Rolle, sodass die Gruppengröße niemals größer als nötig gewählt werden darf.

Auch das Alter der Tiere ist zu diskutieren. Die Tiere waren im Alter von 10 bis 12 Wochen recht jung. In dem Alter ist nach Ergebnissen von Blankenburg et al. noch kein HCM-Phänotyp ausgeprägt [79]. Ziel der Arbeit war durch die Untersuchung von HCM-Genotypen, den Fokus auf mögliche präventive Maßnahmen vor Auftreten einer Hypertrophie zu setzen. Um die Auswirkungen eines voll ausgeprägten HCM-Phänotyps auf das *remote* Myokard untersuchen zu können, müssten jedoch ältere Tiere gewählt werden.

Nach Blankenburg et al. wäre ab einem Lebensalter von 26 Wochen eine deutliche Hypertrophie und zunehmende interstitielle Fibrose des Myokards in den RW/+ und RC/+ Mausmodellen zu erwarten [79].

## 4.5 Schlussfolgerungen

Anhand der vorliegenden Ergebnisse zeigte sich in Mäusen aller Genotypen eine tendenziell geringere Kraftentwicklung des *remote* Myokards. Dies lässt sich durch eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik und durch Veränderung der Sarkomerproteine erklären.

Interessant ist, dass das HCM-Modell 24 Stunden nach I/R im Vergleich zu Wildtypen eine geringere Beeinträchtigung der Entwicklung der aktiven Kraft, der Kraftanstiegsgeschwindigkeit und der Kraftabfallsgeschwindigkeit unter Isoprenalin-Belastung aufweist. Dies spricht für mehr Kraftreserven der HCM-Modelle nach I/R. Weiterhin reagierten die Mäuse aus dem HCM-Modell, insbesondere die RC/+ *knock-in* Mäuse, sensitiver auf Isoprenalin. Dies kann unter anderem auf die in der Literatur viel diskutierte Hyperkontraktilität in frühen Stadien der HCM zurückgeführt werden.

Eine Steigerung der Vorspannung wurde durch das Myokard der Wildtypmäuse und die RC/+ und RW/+ *knock-in* Mäuse ähnlich kompensiert.

Wichtig ist hier noch anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit die Akutphase nach I/R untersucht wurde. Ob es im späteren Verlauf zu additiven Effekten von I/R und den HCM-Mutationen kommt, etwa zu einer stärkeren Fibrosierung, Arrhythmien oder Herzinsuffizienz, kann in der vorliegenden Studie nicht beantwortet werden.

## 4.6 Ausblick

Während sowohl die HCM als auch inzwischen das *remote* Myokard in ihren Eigenschaften zunehmend gut untersucht sind, ist über das zeitgleiche Auftreten beider Krankheitsentitäten kaum Literatur vorhanden. Dies weist eine Lücke in der Forschung auf. Die Wahrscheinlichkeit wiederum, dass beide Erkrankungen gleichzeitig auftreten, wird bei zunehmenden genetischen Testungen von HCM und der hohen Prävalenz des Myokardinfarktes immer höher.

Erfreulicherweise ist inzwischen durch neue Therapieoptionen die Mortalität von HCM von 6 % auf 0,5 % gefallen [11]. Es ist hervorzuheben, dass für die meisten Todesfälle (vor allem bei älteren Patienten) Komorbiditäten verantwortlich sind.

Des Weiteren verschiebt sich der Fokus im Umgang mit HCM immer mehr auf präventive Ansätze, was viele neue Möglichkeiten bietet. Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklung von Mavacamten als MYH7-Inhibitor, eine erste kausale Therapie der HCM zur Reduktion einer linksventrikulären Ausflusstraktobstruktion [92]. Weitere Ansätze, die entwickelt werden, sind Gentherapien, die sich beispielsweise CRISPR/Cas9 (MYBPC3-Mutation) oder Allel-spezifische Gen-Inaktivierung (MYH7-Mutation) zu Nutze machen [93].

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Maron, B.J., S.E. Epstein, and W.C. Roberts, *Hypertrophic cardiomyopathy: a common cause of sudden death in the young competitive athlete*. Eur Heart J, 1983. **4 Suppl F**: p. 135-44.
2. Braunwald, E., et al., *Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis. A Description Of The Disease Based Upon An Analysis Of 64 Patients* Circulation, 1964. **30**: p. Suppl 4:3-119.
3. Alcalai, R., J.G. Seidman, and C.E. Seidman, *Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2008. **19**(1): p. 104-10.
4. Teekakirikul, P., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: translating cellular cross talk into therapeutics*. J Cell Biol, 2012. **199**(3): p. 417-21.
5. Seidman, J.G. and C. Seidman, *The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms*. Cell, 2001. **104**(4): p. 557-67.
6. Maron, B.J., *Hypertrophic cardiomyopathy: an important global disease*. Am J Med, 2004. **116**(1): p. 63-5.
7. Maron, B.J., et al., *Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 785-9.
8. Semsarian, C., et al., *New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(12): p. 1249-1254.
9. Greaves, S.C., et al., *Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families*. Br Heart J, 1987. **58**(3): p. 259-66.
10. Geisterfer-Lowrance, A.A., et al., *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation*. Cell, 1990. **62**(5): p. 999-1006.
11. Maron, B.J., *Clinical Course and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2018. **379**(7): p. 655-668.
12. Marian, A.J., *Molecular Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy*. Circ Res, 2021. **128**(10): p. 1533-1553.
13. Elliott, P.M., et al., *2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2014. **35**(39): p. 2733-79.
14. Bloemink, M., et al., *The hypertrophic cardiomyopathy myosin mutation R453C alters ATP binding and hydrolysis of human cardiac  $\beta$ -myosin*. J Biol Chem, 2014. **289**(8): p. 5158-67.
15. Richard, P., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy*. Circulation, 2003. **107**(17): p. 2227-32.

16. Marian, A.J. and R. Roberts, *Molecular genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: genetic markers for sudden cardiac death*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1998. **9**(1): p. 88-99.
17. Anan, R., et al., *Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 280-5.
18. Morimoto, S., *Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 659-66.
19. Alpert, N.R., et al., *Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1446-54.
20. Geisterfer-Lowrance, A.A., et al., *A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy*. Science, 1996. **272**(5262): p. 731-4.
21. Spirito, P., et al., *The management of hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1997. **336**(11): p. 775-85.
22. Arbelo, E., et al., *2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies*. Eur Heart J, 2023. **44**(37): p. 3503-3626.
23. Maron, B.J. and M.S. Maron, *Hypertrophic cardiomyopathy*. Lancet, 2013. **381**(9862): p. 242-55.
24. Teekakirikul, P., et al., *Hypertrophic Cardiomyopathy: An Overview of Genetics and Management*. Biomolecules, 2019. **9**(12).
25. Ommen, S.R., et al., *2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines*. Circulation, 2020. **142**(25): p. e533-e557.
26. Marrakchi, S., et al., *Risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy*. Herz, 2020. **45**(1): p. 50-64.
27. *Servier Medical Art. Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.*
28. Klinke, R., H.-C. Pape, and S. Silbernagl, *Physiologie*, Thieme, Editor. 2005, Thieme: Thieme. p. 102-135.
29. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.
30. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Circulation, 2012. **126**(16): p. 2020-35.
31. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
32. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.

33. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
34. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2950-9.
35. *Statistisches Bundesamt (Destatis), Gesellschaft und Umwelt, Gesundheit*. 2023; Available from: [www.destatis.de](http://www.destatis.de).
36. Heusch, G., *Myocardial ischemia/reperfusion: Translational pathophysiology of ischemic heart disease*. Med, 2024. **5**(1): p. 10-31.
37. Stone, G.W., et al., *Relationship Between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI: Patient-Level Analysis From 10 Randomized Trials*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(14): p. 1674-83.
38. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
39. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
40. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
41. French, B.A. and C.M. Kramer, *Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling*. Drug Discov Today Dis Mech, 2007. **4**(3): p. 185-196.
42. Wyatt, H.L., et al., *Functional abnormalities in nonoccluded regions of myocardium after experimental coronary occlusion*. Am J Cardiol, 1976. **37**(3): p. 366-72.
43. Kronenbitter, A., et al., *Impaired Ca(2+) cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **119**: p. 28-39.
44. Kötter, S., et al., *Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction*. Circ Res, 2016. **119**(9): p. 1017-1029.
45. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
46. Francis Stuart, S.D., et al., *The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 114-22.
47. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
48. Baines, C.P., *How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 239-43.
49. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 255-65.
50. Liu, F., et al., *Long-Term Outcomes of Acute Myocardial Infarction in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy*. Angiology, 2018. **69**(10): p. 900-908.

51. Gößwald, A., et al., [*Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGSI)*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 650-5.
52. Yang, Y.J., et al., *Long-term survival after acute myocardial infarction in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Clin Cardiol, 2017. **40**(1): p. 26-31.
53. Wu, V.C., et al., *Outcomes of patients with hypertrophic cardiomyopathy and acute myocardial infarction: a propensity score-matched, 15-year nationwide population-based study in Asia*. BMJ Open, 2018. **8**(8): p. e019741.
54. De Villiers, C. and P.R. Riley, *Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion*. Dis Model Mech, 2020. **13**(11).
55. Gao, E., et al., *A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse*. Circ Res, 2010. **107**(12): p. 1445-53.
56. Michael, L.H., et al., *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. H2147-54.
57. Salimova, E., et al., *Variable outcomes of human heart attack recapitulated in genetically diverse mice*. NPJ Regen Med, 2019. **4**: p. 5.
58. Muthuramu, I., et al., *Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure*. J Vis Exp, 2014(94).
59. Bohl, S., et al., *Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(6): p. H2054-8.
60. De Celle, T., et al., *Long-term structural and functional consequences of cardiac ischaemia-reperfusion injury in vivo in mice*. Exp Physiol, 2004. **89**(5): p. 605-15.
61. Mitsos, S., et al., *A critical appraisal of open- and closed-chest models of experimental myocardial ischemia*. Lab Anim (NY), 2009. **38**(5): p. 167-77.
62. Nossuli, T.O., et al., *A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1049-55.
63. Upchurch, W.J. and P.A. Iaizzo, *In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart(®) Laboratories*. Exp Biol Med (Maywood), 2022. **247**(7): p. 584-597.
64. Uhl, S., M. Freichel, and I. Mathar, *Contractility Measurements on Isolated Papillary Muscles for the Investigation of Cardiac Inotropy in Mice*. J Vis Exp, 2015(103).
65. Tansey, E.M., *Henry Dale and the discovery of acetylcholine*. C R Biol, 2006. **329**(5-6): p. 419-25.
66. Klinke, R., H.-C. Pape, and S. Silbernagl, *Physiologie*, Thieme, Editor. 2005, Thieme. p. 131 - 133.
67. Sham, J.S., L. Cleemann, and M. Morad, *Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 121-5.

68. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
69. Bers, D.M., *Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction*. Circ Res, 2000. **87**(4): p. 275-81.
70. Marks, A.R., *Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 46-52.
71. Klinke, R., H.-C. Pape, and S. Silbernagl, *Physiologie*, Thieme, Editor. 2005, Thieme: Thieme. p. 155-157.
72. de Tombe, P.P., et al., *Myofilament length dependent activation*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 851-8.
73. Ho, C.Y., et al., *Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 2002. **105**(25): p. 2992-7.
74. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
75. Chitnis, N., S. Vooturi, and B. Hygriv Rao, *Sudden cardiac death early after ST elevation myocardial infarction with and without severe left ventricular dysfunction*. Indian Heart J, 2014. **66**(6): p. 569-73.
76. Wegener, A.D., et al., *Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11468-74.
77. Avner, B.S., et al., *Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification*. Mol Cell Biochem, 2012. **363**(1-2): p. 203-15.
78. van den Dolder, F.W., et al., *Experimental Models of Hypertrophic Cardiomyopathy: A Systematic Review*. JACC: Basic to Translational Science, 2025.
79. Blankenburg, R., et al.,  *$\beta$ -Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 227-37.
80. Ho, C.Y., et al., *Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2010. **363**(6): p. 552-63.
81. Niimura, H., et al., *Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. **338**(18): p. 1248-57.
82. Niimura, H., et al., *Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly*. Circulation, 2002. **105**(4): p. 446-51.
83. Davis, J., et al., *A Tension-Based Model Distinguishes Hypertrophic versus Dilated Cardiomyopathy*. Cell, 2016. **165**(5): p. 1147-1159.
84. Wu, H., et al., *Modelling diastolic dysfunction in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from hypertrophic cardiomyopathy patients*. Eur Heart J, 2019. **40**(45): p. 3685-3695.

85. Stewart, M.A., et al., *Myosin ATP turnover rate is a mechanism involved in thermogenesis in resting skeletal muscle fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 430-5.
86. Nag, S. and D.V. Trivedi, *To lie or not to lie: Super-relaxing with myosins*. Elife, 2021. **10**.
87. Witjas-Paalberends, E.R., et al., *Gene-specific increase in the energetic cost of contraction in hypertrophic cardiomyopathy caused by thick filament mutations*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(2): p. 248-57.
88. Anderson, R.L., et al., *Deciphering the super relaxed state of human  $\beta$ -cardiac myosin and the mode of action of mavacamten from myosin molecules to muscle fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(35): p. E8143-e8152.
89. McNamara, J.W., et al., *Ablation of cardiac myosin binding protein-C disrupts the super-relaxed state of myosin in murine cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **94**: p. 65-71.
90. Sequeira, V., et al., *Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations*. Circ Res, 2013. **112**(11): p. 1491-505.
91. Radbill, A.E., et al., *Assessment of dynamic cardiac repolarization and contractility in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. PLoS One, 2021. **16**(2): p. e0246768.
92. Heitner, S.B., et al., *Mavacamten Treatment for Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy: A Clinical Trial*. Ann Intern Med, 2019. **170**(11): p. 741-748.
93. Zampieri, M., et al., *Pathophysiology and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: New Perspectives*. Curr Heart Fail Rep, 2021. **18**(4): p. 169-179.

# Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schmitt für die großartige Betreuung dieser Arbeit. Die zahlreichen und hilfreichen fachlichen Diskussionen, seine wertvolle Unterstützung, seine stetige Erreichbarkeit, egal zu welcher Zeit, und sein unentwegtes Vertrauen haben diese Arbeit überhaupt ermöglicht.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger bedanke ich mich für die Mitbetreuung und Unterstützung der Promotionsarbeit. Frau Dr. Simone Gorreßen, Frau Susanne Hölzer und Herrn Dr. Florian Funk danke ich für die Einarbeitung und all die Hilfe im Labor. Herrn Prof. Dr. Jens Fischer danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu dürfen.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld bedanken. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir immer den Weg gebahnt und so vieles ermöglicht haben. Ohne euch wäre ich sicher nicht da, wo ich bin. Meinem Bruder möchte ich dafür danken, dass er mir immer Rückhalt gibt und stets die richtigen motivierenden Worte findet.

Natürlich gehört auch ein großer Dank meinen Freunden. Dafür, dass sie mich stets motivieren weiterzumachen, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen und ich mich ohne Ausnahme immer auf sie verlassen kann.